

**LIMITER LA COLONISATION INTESTINALE PAR *SALMONELLA* ENTERITIDIS
CHEZ DES POULETS DE CHAIR WHITE LEGHORN SPF EN UTILISANT
DES ALIMENTS SUPPLEMENTES EN ACIDIFIANTS.**

**Elen Rondel¹, Attila Kovács², Renata Breitsma², Luca Vandi², Paola Massi³,
Giovanni Tosi³**

¹*Biomin France, Zoopôle, 5 rue Jean Rostand, 22440 Ploufragan, France*

²*Biomin Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg, Autriche*

³*Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,
"Bruno Ubertini", Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia, Italie*

attila.kovacs@biomin.net

RÉSUMÉ

Supplémenter l'aliment avec un additif adapté peut limiter les populations de *Salmonella* Enteritidis dans le caecum du poulet. Un essai de 25 jours a été mené afin d'étudier les effets d'une supplémentation avec un mélange d'acides acétique, propionique et formique, de cinnamaldéhyde et d'une substance perméabilisante (NGP, Biotronic® Top3, BIOMIN, Autriche) sur la population de *S. Enteritidis* dans le caecum de poulets White Leghorn SPF. Le jour de l'éclosion, 60 poussins ont été répartis aléatoirement dans 3 groupes de 20, placés dans des dispositifs adaptés. Le groupe témoin n'a reçu ni antibiotique ni additif, le groupe 1 (NGP1) a reçu 1 kg de NGP/tonne d'aliment et le groupe 2 (NGP 2) 2 kg de NGP/tonne. A 15 jours d'âge, les poussins ont été inoculés par voie oculaire avec 10⁵ unités formant colonies (UFC) de *S. Enteritidis* souche 208876/201. A J5 et J10 après infection (dpi, resp. 20 et 25 jours d'âge), 10 oiseaux ont été euthanasiés par groupe et le contenu caecal a été prélevé pour analyse bactériologique. L'UFC par gramme d'échantillon caecal a été déterminé en comptant les colonies bactériennes. Une réduction significative (P<0,05) en *S. Enteritidis* a été montrée dans les contenus caeaux : à J5 dpi, elle est de 61,3 % (P<0,05) dans le groupe NGP 1 et de 70,7 % (P<0,05) dans le groupe NGP 2 (vs témoin), à J10 dpi, elle est de 51,0 % (P<0,05) dans le groupe NGP 1 et de 60,1 % (P<0,05) dans le groupe NGP 2 (vs témoin). Suite à la supplémentation de la ration avec le NGP, les populations en *S. Enteritidis* ainsi que le processus de colonisation ont été significativement réduits dans le caecum.

ABSTRACT

Reducing *Salmonella* Enteritidis colonization in White Leghorn SPF chickens using a feed supplemented targeted natural additive

From day of hatch, 60 day-old White Leghorn SPF chickens were randomly assigned to 3 treatments of 20 chicks each and placed in poultry isolators. A control group received a commercial diet with no antibiotic or NGP, trial group 1 (NGP 1) received 1 kg NGP/ton of feed, and trial group 2 (NGP 2) 2 kg NGP/ton. At day 15, chickens were eye-drop inoculated with 10⁵ colony-forming units (CFU) of *S. Enteritidis* field strain 208876/201. At day 5 and day 10 post-infection (dpi, resp. at day 20 and 25), 10 chickens per group were euthanized and cecum content was taken for bacteriological analyses. The CFU per gram of cecum sample was determined by counting the bacterial colonies. A significant (P<0.05) reduction in *S. Enteritidis* counts in the cecal content of birds was observed: at day 5 dpi in NGP 1, it was 61.3 % (P<0.05) and in NGP 2, 70.7 % (P<0.05), vs control group, at day 10 dpi reduction in NGP 1 was 51.0 % (P<0.05) and in NGP 2, 60.1 % (P<0.05), vs control group. Due to the NGP supplementation in the diet, *S. Enteritidis* counts in the cecum and therefore colonization were significantly lower.

INTRODUCTION

Ces vingt dernières années, *Salmonella* Enteritidis était la cause la plus fréquente de toxi-infection bactérienne alimentaire dans les pays d'Europe (Baumler *et al.*, 2000). Les œufs et la viande de volaille sont les aliments les plus fréquemment impliqués (Hargis *et al.*, 1995). Il a été démontré que les réservoirs environnementaux, notamment les particules volatiles présentes dans les poulaillers, et les rongeurs jouent un rôle important dans l'introduction et la rémanence des infections dues à *S. Enteritidis* dans les élevages avicoles (Davies *et al.*, 1996). L'alimentation ne doit pas être négligée pour autant. Afin d'assurer une bonne hygiène de l'aliment, des acides organiques (OA) sont largement utilisés (Dibner *et al.*, 2002). Si l'utilisation d'acides organiques pris individuellement est efficace pour réduire le nombre de bactéries pathogènes de type *E. Coli* et *Salmonella*, des effets synergiques ont également été mis en évidence lors de combinaisons de plusieurs acides, avec pour résultat un effet inhibiteur supérieur à celui des acides pris séparément (Roth *et al.*, 2009). Les acides agissent sur les bactéries selon deux modes en fonction du pH environnant et de la valeur pKa des acides organiques. Soit ils sont sous forme dissociée et réduisent le pH environnant, soit ils sont sous forme non dissociée et entrent dans la bactérie en traversant la paroi cellulaire, perturbant ainsi la physiologie de la cellule (Brul *et al.*, 1999).

Les substances phytochimiques présentes naturellement dans les plantes ont des propriétés protectrices et préventives contre les maladies (Rosa *et al.*, 2010). Le cinnamaldéhyde (CA) est une substance phytochimique dont l'efficacité antimicrobienne a été prouvée. Il cible les protéines FtsZ, qui jouent un rôle important dans la division cellulaire, en inhibant la formation de l'anneau Z (Domadia *et al.*, 2007).

Il a été démontré que l'association d'acides organiques et de substances phytochimiques a une action antimicrobienne sélective réduisant ainsi les populations bactériennes pathogènes et promouvant la bonne microflore intestinale (Hellweg *et al.*, 2006).

Les substances perméabilisantes (PS) sont capables de désorganiser la membrane cellulaire externe des bactéries à coloration de Gram négative, facilitant de cette manière l'entrée des OA et du CA dans le cytoplasme bactérien (Alakomi, 2007). Il a été mis en évidence que certaines PS agissent comme boosters de l'activité des OA et du CA.

L'objectif de l'essai était de prouver que la combinaison des OA, du CA et de la PS (NGP, Biotronic® Top3, BIOMIN, Autriche) peut limiter la colonisation intestinale par *S. Enteritidis* des poulets White Leghorn SPF.

MATERIEL ET METHODES

L'essai a été réalisé à IZSLER Brescia, en Italie, sur 60 poussins White Leghorn SPF (Specific Pathogen Free, indemnes de *Salmonella*) âgés d'un jour répartis aléatoirement dans 3 groupes de 20, et isolés de toute contamination dans des dispositifs adaptés. L'essai a été mené sur une durée de 25 jours. Au premier jour d'âge, chaque groupe a été traité selon le protocole suivant:

Témoin: oiseaux inoculés avec *S. Enteritidis* et nourris avec une ration sans antibiotique ni additif ;

NGP 1 : oiseaux inoculés avec *S. Enteritidis* et nourris avec une ration sans antibiotiques supplémentée en NGP à hauteur d'1kg/t d'aliment ;

NGP 2 : oiseaux inoculés avec *S. Enteritidis* et nourris avec une ration sans antibiotiques supplémentée en NGP à hauteur de 2kg/t d'aliment.

A 15 jours d'âge, tous les poussins SPF ont été inoculés par voie oculaire avec 10⁵ unités formant colonies (UFC) de *S. Enteritidis* souche 208876/201. A J5 post-infection (dpi), 10 poussins de chaque groupe ont été euthanasiés par dislocation cervicale et les échantillons des contenus caecaux ont été prélevés pour analyses bactériologiques.

A 10 jours dpi (25 jours d'âge), les 10 poussins restants de chaque groupe ont été euthanasiés par dislocation cervicale et les échantillons caecaux ont aussi été prélevés pour analyses bactériologiques.

Analyse bactériologique

Les échantillons caecaux ont été homogénéisés et dilués 10 fois dans de l'eau peptonée tamponnée. Pour chaque dilution, 0,1 ml de la solution mère a été inoculé sur gélose Hektoen entérique (HEA), gélose sélective et différentielle pour *Salmonella*. Après une nuit d'incubation à 37°C, le nombre d'UFC par gramme de tissu a été déterminé par comptage des colonies bactériennes et les numérations ont été ensuite comparées entre les groupes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les deux groupes traités avec NGP, la population de *S. Enteritidis* dans le caecum a été significativement réduite ($P < 0,05$) à J5 et J10 après infection (dpi). A J5 dpi, la population de *S. Enteritidis* ont été réduites de 1,38 et 1,39 log UFC/g de caecum ($P < 0,05$) dans les groupes NGP 1 et NGP 2, supplémentés respectivement avec 1 kg/t et 2 kg/t de NGP dans la ration. De façon similaire, à J10 dpi, la population de *S. Enteritidis* était moins nombreuse dans le caecum, avec une baisse de 1,34 and 1,58 log d'UFC/g ($P < 0,05$) dans les groupes NGP 1 et NGP 2. Après conversion des log en pourcentages, une réduction de la population de *S. Enteritidis* de 90,0 %

($P < 0,05$) a été mise en évidence dans les groupes NGP 1 et NGP 2 (vs témoin, voir *Tableau 1*).

S. Enteritidis, bactérie Gram-négative, semble être affectée par NGP, et, un effet dose-dépendant peut être observé. L'augmentation du dosage en NGP a un effet positif sur la réduction bactérienne de la colonisation du caecum (tableau 1).

Les acides organiques peuvent être utilisés comme promoteurs de croissance pour améliorer la santé et l'état sanitaire des oiseaux infectés par *S. Enteritidis*, grâce à leurs effets positifs antimicrobiens.

Par ailleurs, les acides organiques ont un effet positif sur l'histologie de l'intestin grêle, améliorant ainsi l'absorption des nutriments et les performances de croissance des poulets (Sheikh *et al.*, 2010). La combinaison de plusieurs acides offre plus de bénéfices car le spectre d'activité est plus large comparé aux acides pris individuellement (Van Immerseel *et al.*, 2003).

La combinaison des acides organiques et des substances phytochimiques permet de protéger tout l'intestin des animaux des effets délétères des bactéries. La partie supérieure de l'intestin est protégée grâce à l'action des acides organiques alors que la partie distale est majoritairement protégée par

l'action de la substance phytochimique (Langhout, 2000).

C'est la capacité de la substance perméabilisante à endommager la membrane externe des bactéries Gram-négatives qui rend les bactéries sensibles aux antimicrobiens (Alacom, 2001).

CONCLUSION

La supplémentation des rations du poulet de chair en début de croissance en NGP et en situation expérimentale réduit la colonisation du caecum des oiseaux par *S. Enteritidis*.

L'inclusion à 1kg/t de NGP dans la ration suffit à montrer un effet positif. L'augmentation du dosage accroîtrait l'effet inhibiteur même si les différences ne sont pas statistiquement significatives. Cela indiquerait un effet dose-dépendant.

Limiter la colonisation intestinale par *S. Enteritidis* permettra de réduire également sa présence dans l'environnement proche et donc le risque de contamination.

Les pratiques d'élevage ainsi que les mesures de biosécurité jouent un rôle essentiel dans la prévention des contaminations par *Salmonella* mais l'utilisation de NGP constitue une aide supplémentaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alakomi H.L., 2001. PhD, Helsinki, Norvège.
2. Baumler A. J., Hargis B. M., Tsois R. M., 2000. Science, 287, 50–52. [Online.] <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/287/5450/50>.
3. Brul S., Coote P., 1999. Intl. J. Food Microbiology, 50 (1–2), 1–17.
4. Davies R. H., Wray C., 1996. Br. Poult. Sci., 37, 589–596.
5. Dibner J. J., Butin P., 2002. J. Appl. Poultry Res., 11 (4).
6. Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D., 2007. Biochem Pharmacol, 74, 831–840.
7. Hargis B. M., Caldwell D. J., Brewer R. L., Corrier D. E., Doloach J. R., 1995. Poult. Sci., 74, 1548–1552.
8. Hellweg P., Tats D., Männer K., Vahjen W., J. Zentek., 2006. Proceedings of the Society of Nutritional Physiology, 15: 63.
9. Roth N., Germ T., Klimitsch A., Urbaityte R., Nitsch S., 2009. BOKU Symposium.
10. Rosa L.A., Alvarez-Parrilla E., González-Aguilar G.A., 2010. In: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability. Wiley-Blackwell.
11. Sheikh A., Tufail B., Gulam Ahmad B., Masood Saleem M., Manzood R., 2010. Vet. Med. Int., Volume 2010, Article ID 479485, 7.
12. Van Immerseel F., Russel J.B., Flythe M.D., Gantois I., Timbermont L., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2006. Avian Pathol. Article ID CAVP-2006-0023.

Tableau 1. Populations de *S. Enteritidis* dans le contenu caecal des poulets de chair à J5 et J10 (log UFC/g)

DPI (jours post-infection)	Témoin	NGP 1 (1,0 kg/t)	NGP 2 (2,0kg/t)
J5	2,25 ^a ± 0,60	0,87 ^b ± 0,93	0,66 ^b ± 0,85
J10	2,63 ^a ± 0,95	1,29 ^b ± 0,75	1,05 ^b ± 1,13

^{a,b} Pour une ligne donnée, les valeurs non suivies des mêmes lettres sont significativement différentes ($P < 0,05$)

1205 Limiter la colonisation intestinale par *Salmonella* Enteritidis chez des poulets de chair White Leghorn SPF en utilisant des aliments supplémentés en acidifiants.

Elen Rondel¹, Attila Kovács², Renata Breitsma², Luca Vandi², Paola Massi³, Giovanni Tosi³

attila.kovacs@biomin.net

¹ BIOMIN France, Zoopôle, 5 rue Jean Rostand, 22440 Ploufragan, France

² BIOMIN Holding GmbH, 3130 Herzogenburg, Autriche

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia, Italie

Objectif

Etudier l'effet antimicrobien dose-dépendant d'un acidifiant amélioré composé d'un mélange d'acides organiques, d'une substance phytochimique et d'une substance perméabilisante (NGP, Biotronic® Top3, BIOMIN, Autriche) sur *S. Enteritidis* chez des poulets White Leghorn SPF chickens.

Protocole expérimental

Animaux: 60 poussins White Leghorn SPF

Groupe: 3 groupes

Groupe témoin: ration standard

NGP1: ration standard + 1,0 kg NGP/tonne d'aliment

NGP2: ration standard + 2,0 kg NGP/tonne d'aliment

Inoculation: A 15 jours d'âge, les poussins ont été inoculés par voie oculaire avec 105 UFC de *S. Enteritidis*, souche 208876/2011

Echantillothèque: A J5 et J10 post-infection (dpi, resp. à 20 et 25 jours d'âge), 10 poussins par groupe ont été euthanasiés et leur contenu caecal a été collecté pour analyses bactériologiques

Analyses bactériologiques: les échantillons caeaux ont été homogénéisés et dilués 10 fois dans une solution d'eau peptonée tamponnée. Pour chaque dilution, 0,1 ml a été inoculé sur gélose Hektoen entérique (HEA). Après incubation à 37 °C pendant toute une nuit, le nombre d'unités formant colonie par gramme de tissu a été déterminé en comptant les colonies bactériennes.

Durée: 1 - 25 jours d'âge (25 jours)

Résultats

Dans les deux groupes traités, le nombre de colonies de *S. Enteritidis* a été significativement réduit dans le caecum ($p < 0,05$) à J5 et J10 dpi (Figure 1).

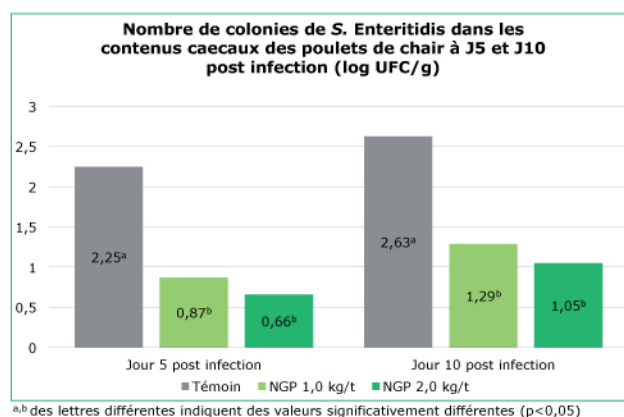


Figure 1. Nombre de colonies de *S. Enteritidis* dans les contenus caeaux des poulets de chair (log UFC/g)



Conclusions

Le nombre de colonies de *S. Enteritidis* dans le caecum des oiseaux a été significativement réduit dans les groupes traités avec NGP ($P < 0,05$). L'acidifiant amélioré peut être considéré comme un outil de gestion efficace du risque *S. Enteritidis*, une des principales causes des maladies aviaires.