

METHODE PRATIQUE D'EVALUATION DE LA QUALITE DE LA DECONTAMINATION DES POULAILLERS DE VOLAILLES AU SOL

Rose Nicolas, Drouin Pierre, Toux Jean-Yves

CNEVA - Unité de Recherche en Epidémiologie et Qualité en Aviculture
BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN

Résumé

La méthode des boîtes de contact a été utilisée pour évaluer la qualité de la décontamination des poulaillers de volailles élevées au sol. Cette méthode a été appliquée, avant la mise en place des poussins, à 10 poulaillers de poulets de chair et 10 poulaillers de poulettes futures pondeuses élevées au sol. Deux types de milieux de culture (VRBG et ENTEROCOUNT) ont été comparés ainsi que les lieux d'application des boîtes de contacts (mangeoires et bas de parois). Le niveau de contamination des poulaillers apprécié par la méthode des boîtes de contact a été comparé au statut hygiénique de ces mêmes poulaillers vis à vis de *salmonella*.

Les résultats obtenus avec les deux types de milieu étaient positivement corrélés. Les niveaux de contamination observés sur les mangeoires et les bas de parois n'étaient pas significativement différents. Le contrôle de décontamination effectué à l'aide des boîtes de type VRBG a présenté un lien significatif avec le statut hygiénique du bâtiment vis à vis de *salmonella*.

Introduction

La persistance de *salmonella* dans l'environnement des volailles est un risque important de recontamination des lots suivants (Baggesen et al., 1992 ; Davies et Wray, 1996a). Cependant, la détection de *salmonella* en poulailler vide décontaminé nécessite la réalisation de nombreux prélèvements qui doivent être associés pour augmenter la sensibilité de détection (Caldwell et al., 1994 ; Davies et Wray, 1996c). D'autre part le traitement bactériologique de ces échantillons nécessite un minimum de 72 heures avec les techniques classiques (Humbert et al., 1995). La mise au point d'une technique de contrôle de décontamination rapide, fiable et corrélée avec le statut sanitaire du poulailler vis à vis de *salmonella* serait d'une grande utilité pour les organisations professionnelles soucieuses de garantir la qualité sanitaire de leurs produits.

L'intérêt de l'utilisation des boîtes de contact pour l'appréciation de la qualité de la décontamination dans les poulaillers (Drouin et al., 1988) ou dans les locaux de sevrage des porcelets (Foucher et Madec, 1997) a déjà été mis en évidence. Cependant, l'utilisation d'une telle méthode dans le cadre du contrôle du statut hygiénique des poulailler vis à vis de *salmonella* est encore mal connue.

Matériel et méthodes

1. Echantillon

10 poulaillers de poulets de chair et 10 poulaillers de poulettes futures pondeuses élevées au sol ont été

enquêtés en Bretagne de novembre 1995 à juillet 1996. L'intervention avait lieu avant la mise en place des poussins, en poulailler équipé.

2. Contrôle bactériologique de décontamination

Des boîtes de contact de 25 cm² de surface ont été utilisées. Deux milieux de culture ont été employés : le milieu ENTEROCOUNT (AEB122710C, AES laboratoire, Combourg) pour la culture des streptocoques fécaux et le milieu VRBG (AEB153202, AES laboratoire, Combourg), additionné de neutralisant de désinfectant (507114, laboratoire LCB, Lugny), pour la culture des enterobactéries totales. Pour chacun de ces milieux, 16 boîtes ont été appliquées par poulailler en maintenant une pression moyenne pendant 5 secondes. Les lieux d'application étaient :

- 1) les bas de parois, à 20 cm du sol (2 boîtes par quartier pour chacun des milieux, soit 8 boîtes ENTEROCOUNT et 8 boîtes VRBG par poulailler)
- 2) les mangeoires (2 boîtes par quartier pour chacun des milieux, soit 8 boîtes ENTEROCOUNT et 8 boîtes VRBG par poulailler)

Après application, les boîtes de contact ont été transportées dans un container isotherme à +4°C. Elles ont été placées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les colonies de streptocoques fécaux apparaissaient roses violacées sur le fond jaune de la gélose ENTEROCOUNT, les colonies "enterobactéries totales" apparaissaient violacées sur le fond rose de la gélose VRBG. Les boîtes de contact ont été dénombrées ; au delà de

300 colonies les boîtes étaient considérées comme envahies. Les boîtes contenant des colonies mal délimitées ou à caractère confluant ainsi que les boîtes contenant des moisissures ont été éliminées.

3. Statut sanitaire des poulaillers vis à vis de *salmonella*

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de chiffonnettes stériles additionnées de neutralisant de désinfectant. Chaque poulailler a été divisé en 4 quartiers et les chiffonnettes ont été appliquées sur 4 types de surface différents :

- 1) parois et bas de parois (1 chiffonnette par quartier appliquée sur une surface de 10 m², soit 4 chiffonnettes par poulailler)
- 2) mangeoires (1 chiffonnette par quartier appliquée sur 10 mangeoires, soit 4 chiffonnettes par poulailler)
- 3) abreuvoirs (1 chiffonnette par quartier appliquée sur 10 abreuvoirs ou 10 godets récupérateurs d'eau des pipettes, soit 4 chiffonnettes par poulailler)
- 4) admissions ou sorties d'air (1 chiffonnette par quartier appliquée sur 10 m linéaire de trappes ou chacun des ventilateurs, soit 4 chiffonnettes par quartier)

Les prélèvements ont subi une phase de pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée (22h à 37°C), suivie d'une étape d'enrichissement sur milieu semi-solide de Rappaport Vassiliadis et tétrathionate (24h à 42°C), puis isolement sur milieu Xylose Lysine Tergitol 4 (24h à 37°C). Le poulailler a été déclaré contaminé si au moins un prélèvement sur les 16 réalisés était positif.

3. Analyse statistique

Le logiciel Systat 5.1 sous Windows a été utilisé.

Les dénombrements effectués sur les boîtes de contact ont conduit à constituer 4 classes permettant la répartition la plus homogène possible de l'ensemble des boîtes de contact appliquées. Sur un total de 627 boîtes dénombrées, la répartition par classe a été la suivante :

- classe 1 : 0 colonie, $n_1 = 255$ boîtes
- classe 2 : 1 à 30 colonies, $n_2 = 194$ boîtes
- classe 3 : 31 à 120 colonies, $n_3 = 77$ boîtes
- classe 4 : plus de 120 colonies, $n_4 = 101$ boîtes.

Le test de corrélation des rangs de Spearman a été utilisé pour la comparaison des 2 milieux utilisés.

Le test du Chi-2 de Pearson a été utilisé pour la comparaison des niveaux de contamination selon la nature de la production ou les lieux d'application des boîtes. Ces comparaisons, ajustées sur la nature de la production (poulets de chair ou poulettes) ou du

milieu utilisé (VRBG / ENTEROCOUNT) ont été effectuées grâce au test du Chi-2 de Mantel-Haenszel, restreint à 2 classes:

- classe A : moins de 30 colonies par boîte
- classe B : plus de 30 colonies par boîte

Afin de comparer les résultats de contrôle de décontamination avec le statut sanitaire des élevages vis à vis de *salmonella*, le niveau de contamination résiduelle de chaque élevage a été défini par la médiane des dénombrements effectués sur l'ensemble des boîtes appliquées dans cet élevage. La distribution des 20 médianes obtenues pour chaque milieu de culture a été comparée aux résultats des recherches de *salmonella* grâce au test exact de Fisher.

Le niveau de signification retenu est de 5%.

Résultats

1. Différences de niveaux de contamination entre les deux productions (figure 1)

Sur l'ensemble des boîtes appliquées, les 10 poulaillers de poulets de chair ont présentés des niveaux de contamination plus élevés que les 10 poulaillers de poulettes. La proportion de boîtes correspondant à des niveaux de contamination élevés (>30 colonies par boîte) était plus importante pour la production de poulets de chair que de poulettes (chi-2 = 13.1, $p = 0.004$ pour le milieu VRBG et Chi-2 = 12.2, $p = 0.007$ pour le milieu ENTEROCOUNT). Cette même analyse ajustée sur la nature du milieu utilisé a conduit à la même conclusion (Chi-2 de Mantel-Haenszel = 19.3, $p < 1$ p.1000). Les comparaisons effectuées par la suite ont donc été ajustées sur la nature de la production pour neutraliser une éventuelle confusion introduite par les niveaux de contamination différents observés dans les 10 poulaillers de poulets et dans les 10 poulaillers de poulettes.

2. Comparaison des 2 types de milieux (tableau 1)

Les résultats de comptage réalisés sur les deux types de milieu ont présenté une corrélation positive significative (coefficient de corrélation de Spearman = 0.56, $p < 1$ p. 1000). Les boîtes ENTEROCOUNT en classe 4 (>120 colonies) correspondaient majoritairement à des boîtes VRBG très contaminées (> 120 colonies). Par contre les boîtes ENTEROCOUNT en classe 1 (0 colonie) correspondaient pour 38.4 % à des boîtes VRBG en classe 1 et pour 43 % à des boîtes VRBG en classe 2 (1 à 30 colonies). De même, les boîtes ENTEROCOUNT en classe 3 (31 à 120 colonies) correspondaient majoritairement à des boîtes VRBG en classe 4.

3. Comparaison des lieux d'application (mangeoires et bas de parois)

Après ajustement sur la nature de la production, la localisation "bas de parois" n'était pas significativement plus contaminée que la localisation "mangeoire" (Chi-2 de Mantel Haenszel = 2.3, NS)

4. Lien avec la contamination salmonellique

Seul le milieu VRBG (enterobactéries totales) a permis de mettre en évidence un lien significatif entre le niveau de contamination résiduelle du poulailler et son statut sanitaire vis à vis de *salmonella* (tableau 2, $p = 0.02$)

TABLEAU 2 : table de contingence entre les résultats de contrôles de décontamination (boîtes VRBG) et le statut hygiénique du poulailler vis à vis de *salmonella*

		<i>salmonella</i>	
		Négatif	Positif
cfu / boîte (VRBG)	< 30	9	1
	≥ 30	3	7

Discussion

Pour des niveaux de contamination du poulailler équivalents, les informations fournies par les deux types de milieux se sont révélées être liées. Dans un environnement très contaminé les boîtes VRBG étaient rapidement envahies alors que les boîtes ENTEROCOUNT étaient encore dénombrables. Par contre, en milieu peu contaminé, les boîtes ENTEROCOUNT restées stériles ne permettaient pas de discerner les élevages non contaminés des élevages peu contaminés voire très contaminés. La méthode utilisant les boîtes ENTEROCOUNT s'est donc révélée être moins sensible au cours de cette étude.

Les deux lieux d'application (bas de parois et mangeoires) ont présentés peu de différences de niveau de contamination. Il a donc été difficile de définir une localisation "facteur limitant" pouvant constituer un bon indicateur du niveau de contamination globale du bâtiment. Drouin et al. (1988) ont observé que la contamination résiduelle était plus importante sur les surfaces rugueuses et difficiles à désinfecter (bas de parois). La différence observée ici selon la nature de la production (poulets de chair ou poulettes) pourrait s'expliquer par la nature des matériaux utilisés. Si les matériaux utilisés pour les bas de parois ne diffèrent pas ou peu, le matériel d'alimentation utilisé dans la production des poulettes est en général plus ancien et difficilement décontaminable (assiettes en métal galvanisé ou chaînes linéaires métalliques contre des assiettes en PVC en production de poulets). D'autre part, un

certain nombre de difficultés, dont la présence d'aliment et de poussières d'aliment sur les mangeoires rendant la lecture difficile, ont conduit à considérer le lieu "bas de parois" comme indicateur meilleur et préférable.

Les résultats des contrôles de décontamination réalisés à l'aide des boîtes de type VRBG ont présenté un lien significatif avec les résultats des recherches de salmonelles, même pour cet échantillon de taille relativement restreinte. Ceci confirme l'importance de la qualité de la décontamination pour l'assainissement des poulaillers contaminés par *salmonella* (Fris et Van den Bos, 1995 ; Davies et Wray, 1996b). Une telle méthode permettrait de détenir un indicateur prédictif du statut hygiénique du poulailler vis à vis des salmonelles, avant la mise en place des poussins. Cependant, l'inconvénient des boîtes de contact de type VRBG additionnées de neutralisant est leur non disponibilité dans le commerce et leur mauvaise conservation, ce qui n'est pas le cas des ENTEROCOUNT. Les 2 types de milieux ayant montré entre eux une liaison significative, il est possible que les résultats obtenus à l'aide des boîtes ENTEROCOUNT n'aient pas permis de mettre en évidence un lien significatif avec la contamination par *salmonella* du fait d'un manque de puissance lié à la petite taille de l'échantillon. Une telle comparaison menée sur un échantillon de taille plus importante mériterait d'être effectuée, d'une part pour confirmer les observations réalisées pour le milieu VRBG et d'autre part pour approfondir les résultats obtenus avec le milieu ENTEROCOUNT.

Références

- Baggesen D.L., Olsen J.E., Bisgaard M., 1992. Avian Path., 21, 569-579.
- Caldwell D.J., Hargis B.M., Corrier D.E., Williams J.D., Vidal L., DeLoach J.R., 1994. Avian Dis., 38, 461-466.
- Davies R.H., Wray C., 1996a. Brit. Poult. Scien., 37, 589-596.
- Davies R.H., Wray C., 1996b. Avian Dis., 40, 626-633.
- Davies R.H., Wray C., 1996c. Vet. Microb., 50, 117-127.
- Drouin P., Toux J.Y., Bennejean G., 1988. Proceedings of the 6th International Congress on animal Hygiene - Skara - Sweden - 14-17 June 1988.
- Foucher V., Madec F., 1997. 29èmes journées de la recherche porcine - Paris - 4, 5, 6 Février 1997.
- Fris C., Van Den Bos J., 1995. Avian Path., 24, 255-272.
- Humbert F., Morvan H., Lalande F., Colin P., 1995. 1ères journées de la recherche avicole - Angers - 28, 29, 30 mars 1995.

FIGURE 1 : Distribution du nombre de boîtes de contact pour chacune des productions (poulets de chair ou poulettes) selon le niveau de contamination

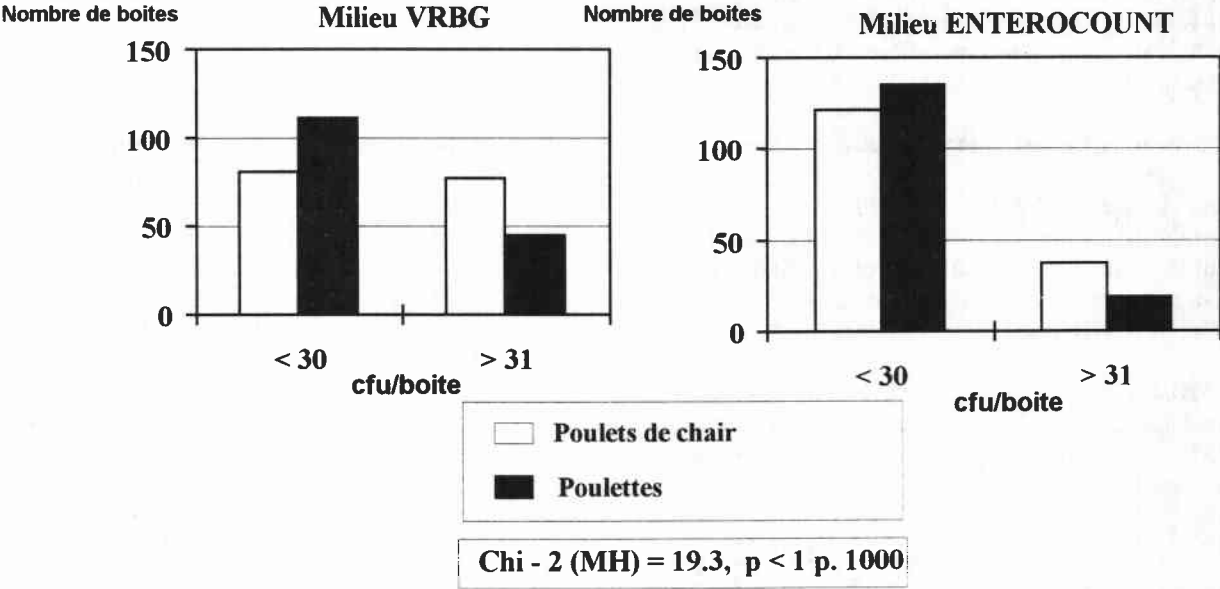


TABLEAU 1 : correspondance entre les résultats de comptage effectués sur 307 boîtes VRBG et 307 boîtes ENTEROCOUNT appliquées simultanément au même site.

		Milieu VRBG (cfu/boîte)				TOTAL
		0 (classe 1)	1 à 30 (classe 2)	31 à 120 (classe 3)	> 120 (classe 4)	
Milieu ENTEROCOUNT (cfu/boîte)	0 (classe 1)	n _{1,1} = 68 (38.4 %)	n _{1,2} = 76 (43.0 %)	n _{1,3} = 16 (9.0 %)	n _{1,4} = 17 (9.6 %)	n _e = 177 (100.0 %)
	1 à 30 (classe 2)	n _{2,1} = 7 (9.3 %)	n _{2,2} = 33 (44.0 %)	n _{2,3} = 21 (28.0 %)	n _{2,4} = 14 (18.7 %)	n _e = 75 (100.0 %)
	31 à 120 (classe 3)	n _{3,1} = 0 (0.0 %)	n _{3,2} = 4 (14.3 %)	n _{3,3} = 8 (28.6 %)	n _{3,4} = 16 (57.1 %)	n _e = 28 (100.0 %)
	> 120 (classe4)	n _{4,1} = 0 (0.0 %)	n _{4,2} = 3 (11.1 %)	n _{4,3} = 1 (3.7 %)	n _{4,4} = 23 (85.2 %)	n _e = 27 (100.0 %)
TOTAL		n _v = 75	n _v = 116	n _v = 46	n _v = 70	N = 307

légende : N = nombre total de paires VRBG-ENTEROCOUNT, n_v = nombre total de boîtes VRBG dans la classe considérée, n_e = nombre total de boîtes ENTEROCOUNT dans la classe considérée, n_{ij} = nombre de paires VRBG-ENTEROCOUNT correspondant à l'intersection des 2 classes considérées, les nombres entre parenthèses représentent les proportions de boîtes ENTEROCOUNT dans la case considérée par rapport au total en ligne (n_e).