

RESULTATS PRELIMINAIRES METHODOLOGIE DE L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX DESINFECTANTS

1 Introduction

L'ensemble des méthodes utilisées pour mesurer la sensibilité des bactéries aux désinfectants sont des méthodes initialement élaborées pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Les méthodes de mesure de la sensibilité rejoignent les objectifs des méthodes de typage et doivent donc présenter les qualités suivantes :

- Elles doivent avoir un pouvoir discriminant suffisant pour permettre le classement des souches en sous-population sensible et résistante
- Elles doivent être répétables et reproductibles
- Elles doivent pouvoir être applicables à toutes les souches bactériennes de l'espèce ou du genre considéré
- Elles doivent être faciles à mettre en œuvre, pour un coût modéré

Les antibiotiques et les désinfectants présentent des modes d'action différents et les désinfectants sont beaucoup plus sensibles aux conditions physico-chimiques du milieu que les antibiotiques.

Ainsi, l'étude de la sensibilité aux désinfectants pose deux problèmes majeurs par rapport aux antibiotiques : l'un d'ordre terminologique et l'autre d'ordre méthodologique :

- Il n'existe pas pour l'instant de définition standardisée de la résistance aux désinfectants et les différentes définitions données dans la littérature sont le plus souvent propres aux auteurs qui les proposent. La définition de la résistance étant intrinsèquement liée à la méthode d'étude choisie, l'idéal serait de pouvoir disposer d'une méthode permettant la mise en évidence, sans avoir recours à un seuil arbitraire, de deux sous-populations ou plus, comme cela est souvent le cas pour les distributions de CMI des bactéries vis à vis des antibiotiques.
- Les désinfectants sont très sensibles à la présence de la matière organique. Lorsqu'ils sont mélangés dans un milieu de culture pour les bactéries on ignore quelle quantité de désinfectant est encore active et disponible dans le milieu et si le milieu est toujours favorable à la croissance bactérienne.

A l'heure actuelle, seule la méthode de mesure des CMB permet d'évaluer l'efficacité des désinfectants. Malheureusement, cette méthode ne permet pas de mettre en évidence de petites variations de sensibilité des bactéries aux désinfectants.

Les méthodes présentées dans ce chapitre, que nous avons évaluées, avaient pour objectifs :

- soit d'améliorer le pouvoir discriminant de méthodes disponibles pour l'évaluation de la sensibilité au désinfectant (diminution des pas de dilution, ajout de désinfectant dans un milieu sélectif),
- soit de mettre au point des méthodes permettant de s'affranchir des difficultés liées aux interactions entre les désinfectants et les milieux de culture (diffusion en milieu gélosé).

Figure 25. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de benzalkonium (gamme de dilutions de 2 en 2)

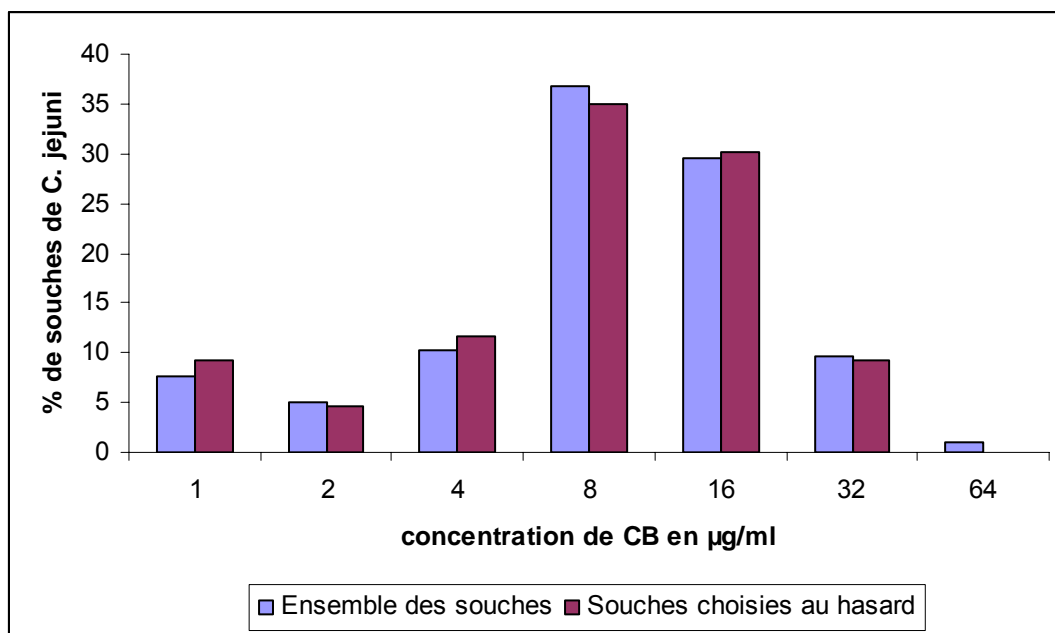
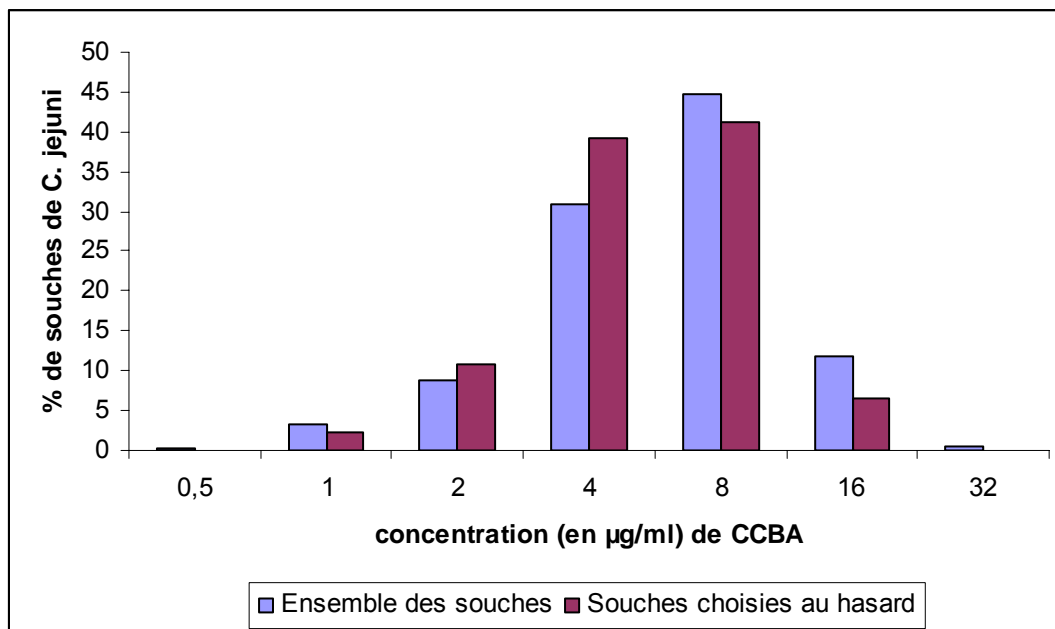


Figure 26. Distribution des CMI des souches de *C. jejuni* pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium (CDDA) (gamme de dilutions de 2 en 2)



2 Diminution des pas de dilution des solutions désinfectantes

La méthode de dilution en milieu gélosé utilisée dans notre étude pour les désinfectants est adaptée directement de la méthode utilisée pour les antibiotiques. Les pas de dilutions sont de 2 en 2, ce qui entraîne de grands écarts de concentrations pour les premières dilutions. Pour la majorité des antibiotiques, les courbes de distribution obtenues ont une allure bimodale ce qui permet aisément de distinguer deux sous-populations au sein de la population testée. Pour les composés d'ammoniums quaternaires, les courbes de distributions des CMI des souches de notre étude sont monomodales. Afin de vérifier qu'une courbe bimodale des distributions n'était pas masquée par de trop grands pas de dilution, une gamme de dilution a été reprogrammée avec des pas de dilution plus petits pour les valeurs de CMI les plus fréquemment observées.

2.1 Sélection des souches

Dans notre collection d'isolats (651 isolats), la majorité appartient à l'espèce *C. jejuni*, nous avons donc sélectionné au hasard 60 souches de *C. jejuni*. Les distributions de CMI de l'ensemble des souches de la collection et des souches sélectionnées pour le chlorure de benzalkonium (CB) et le didécyl-diméthyl ammonium (CDDA) sont représentées respectivement sur les figures 25 et 26. Les souches tirées au hasard sont représentatives de l'ensemble des souches de la collection.

2.2 Gammes de dilutions étudiées

2.2.1 Chlorure de benzalkonium

Pour le chlorure de benzalkonium, près de 70% des isolats de *C. jejuni* ont une valeur de CMI égale à 8 ou 16 µg/ml. Pour ce désinfectant, les concentrations testées sont : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 24 et 32 µg/ml.

2.2.2 Chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium

Pour le chlorure de didécyl-diméthyl-ammonium, près de 80% des isolats de *C. jejuni* ont une valeur de CMI égale à 4 ou 8 µg/ml. Pour ce désinfectant, la gamme de dilution est donc étendue entre 2 et 10 µg/ml. Les concentrations testées sont : 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 16 et 32 µg/ml.

Pour chaque mesure, l'expérience a été répétée deux fois.

2.3 Courbes de distribution des CMI avec des pas de dilution réduits

Les courbes de distribution sont présentées sur la figure 27 pour le chlorure de benzalkonium et sur la figure 28 pour le chlorure de didécyl-diméthyl ammonium.

Pour le chlorure de benzalkonium, les souches qui présentaient une CMI de 8 ou 16 µg/ml sont dispersées sur les valeurs intermédiaires entre 4 et 12 µg/ml. Comme les pas de dilution sont petits (12 pas de dilution) et qu'il y a peu de souches testées (43 valeurs retenues pour le chlorure de benzalkonium), la distribution est étalée assez uniformément sur l'ensemble des valeurs étudiées.

Figure 27. Courbes de distribution des CMI du chlorure de benzalkonium (pas de dilution réduits)

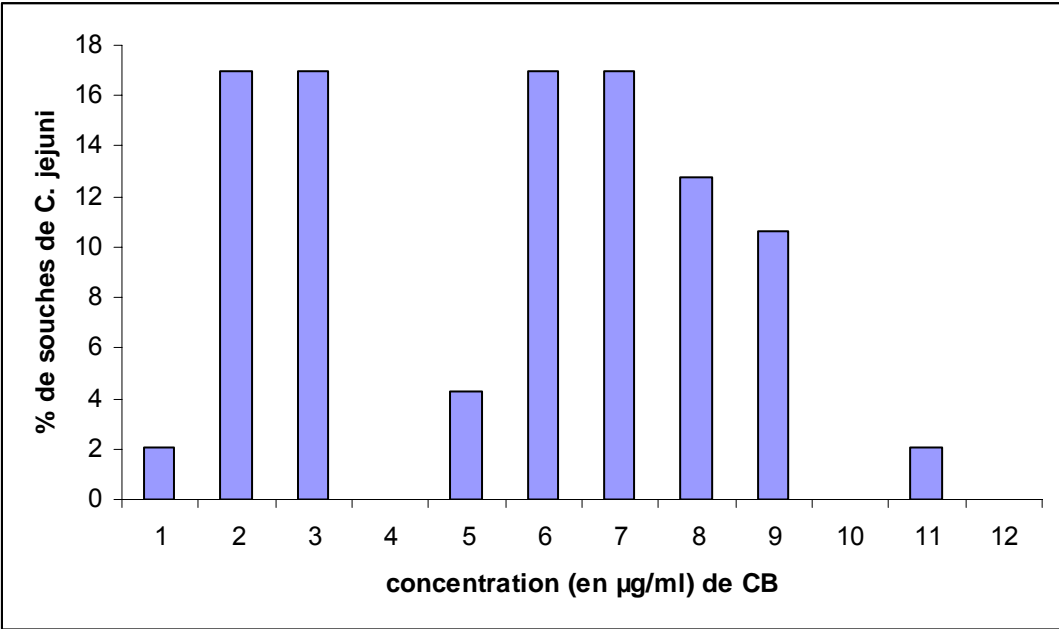
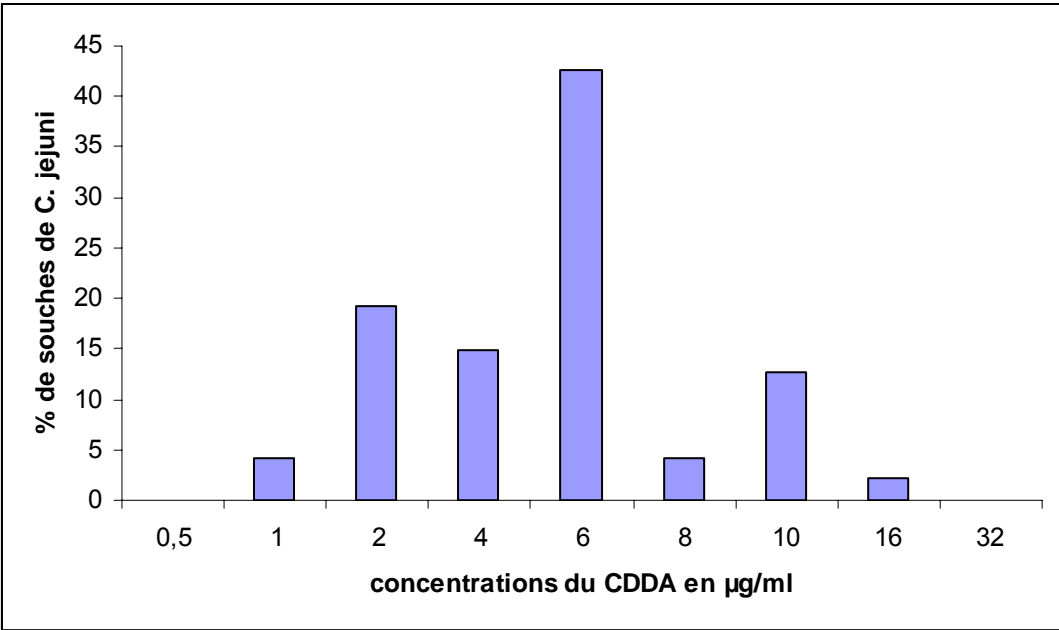


Figure 28. Courbes de distribution des CMI du chlorure de didécyl-diméthyl ammonium (pas de dilutions réduits)



Pour le chlorure de didécyl diméthyl ammonium, la courbe de distribution des CMI est proche de celle observée avec les pas de dilution de 2 et les souches qui étaient auparavant sur les valeurs 4 et 8 µg/ml se retrouvent sur les valeurs 4 et 6 µg/ml.

2.4 Intérêt de la diminution des pas de dilution des molécules désinfectantes pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Pour ces deux molécules, la diminution des écarts de dilution dans la gamme ne permet pas de mettre en évidence deux sous-populations distinctes. Il n'y a donc pas d'intérêt, pour *C. jejuni* et pour ces deux molécules d'ammoniums quaternaires d'augmenter le nombre de dilutions testées.

3 Utilisation de molécules désinfectantes dans le milieu sélectif de Virion

3.1 Principe

L'étude de la résistance aux désinfectants suppose de travailler sur un phénomène rare. Par conséquent, on peut supposer que les souches résistantes aux désinfectants sont peu représentées dans les populations de bactéries prélevées dans les abattoirs. En raison de la méthode d'isolement utilisée, seules les bactéries les plus compétitives sont détectables. Pour favoriser la détection de bactéries présentes en petit nombre au départ, un milieu sélectif additionné d'un désinfectant dédié à leur sélection a été utilisé.

3.2 Méthode

Les milieux sélectifs utilisés pour l'isolement des campylobacters à partir des prélèvements d'abattoir sont le milieu de Karmali et le milieu de Virion. Cette méthode n'a été utilisée qu'au cours de 2 visites.

3.2.1 Comparaison des CMI en milieu de Karmali par rapport à la GMH

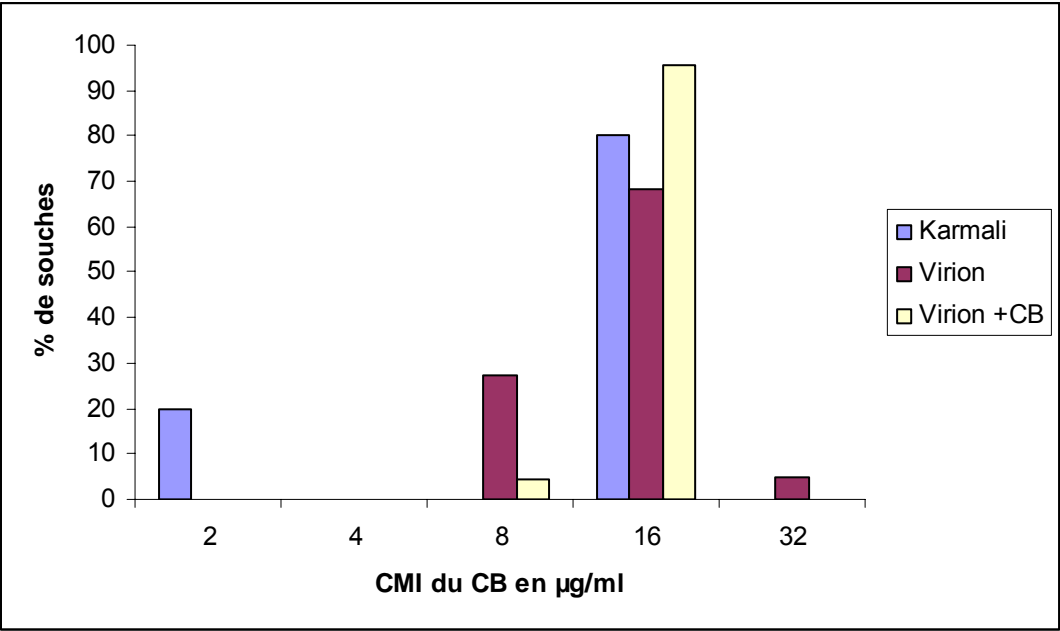
Le milieu de Karmali est un milieu contenant du charbon. Sur ce milieu contenant des concentrations croissantes de CB (de 0 à 25 µg/ml), 8 souches de *C. jejuni* présentant des CMI en GMH de 1.5 à 25 µg/ml ont été testées. Pour toutes les souches, la croissance était identique à la croissance dans la boîte témoin quelque soit la concentration de CB ajoutée au milieu de Karmali. Le CB n'est donc plus actif en milieu de Karmali.

3.2.2 Comparaison des CMI en milieu de Virion par rapport à la GMH

Le milieu de Virion est une gélose de Mueller-Hinton complémentée avec du sang de mouton défibriné (5%) et des antibiotiques. Les deux souches de référence *C. jejuni* ATCC 33560 (CMI du CB en GMH=6.25 µg/ml) et *C. coli* ATCC 33559 (CMI du CB en GMH=12.5µg/ml) ont été utilisées. De la même façon que pour le milieu de Karmali, le milieu de Virion a été additionné avec des concentrations croissantes de CB de 0 à 32 µg/ml. Les résultats obtenus montrent que :

- Le milieu de Virion reste sélectif en présence de chlorure de benzalkonium aux concentrations testées

Figure 29. Distribution des CMI du chlorure de benzalkonium en fonction du milieu d'isolement



- La CMI observée avec le milieu de Virion est augmentée d'une dilution par rapport à la CMI mesurée avec la GMH.

Le milieu retenu est donc le milieu de Virion.

3.2.3 Choix de la concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu de Virion

La concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu de Virion a été calculée en fonction de la CMI₉₀ déterminée à partir de l'ensemble des isolats issus des prélèvements réalisés dans les abattoirs. Cette CMI₉₀ est de 16 µg/ml. La CMI correspond à la première concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance, la concentration retenue a donc été de 8 µg/ml (CMI₉₀ diminuée d'une dilution).

3.3 Résultats

Lors du premier essai, à la concentration de chlorure de benzalkonium de 8 µg/ml, tous les isolements réalisés à partir des prélèvements positifs sur les milieux de Karmali et de Virion pour campylobacter étaient négatifs. La concentration de chlorure de benzalkonium ajoutée dans le milieu sélectif a donc été diminuée à 4 µg/ml. Cette concentration a été utilisée pour le traitement des prélèvements au cours d'une visite dans l'abattoir 3.

A 4 µg/ml, toutes les boîtes d'isolement contenant le milieu de Virion additionné de CB étaient positives pour campylobacter (si des campylobacters étaient présents sur les deux autres boîtes Karmali et Virion). Cette concentration a été utilisée pour le traitement des prélèvements collectés au cours d'une visite dans l'abattoir 4. Au cours de cette visite, 8 isolats ont été collectés sur milieu de Karmali, 22 sur le milieu de Virion et 23 sur le milieu de Virion additionné de CB (4 µg/ml). La distribution des CMI des isolats collectés, en fonction de leur milieu d'isolement, est indiquée sur la figure 29. Les isolats obtenus sur le milieu de Virion additionné de CB ne présentaient pas une CMI augmentée par rapport aux autres isolats obtenus dans le même prélèvement. Cependant, on peut noter que les souches présentant la CMI la plus élevée (32 µg/ml) n'ont pas été isolées à partir du milieu contenant le chlorure de benzalkonium.

3.4 Conclusion : intérêt des milieux sélectifs contenant un désinfectant pour la sélection des bactéries résistantes aux désinfectants

De la même façon que les résistances rares des bactéries aux antibiotiques peuvent être détectées en réalisant les isolements sur des milieux complétés en antibiotiques, il doit être possible de détecter les bactéries résistantes aux désinfectants sur des milieux additionnés en désinfectant. Pour des raisons matérielles (fin des prélèvements), la recherche de la concentration sélective de chlorure de benzalkonium à ajouter dans le milieu de Virion n'a pas pu être achevée, cependant, il aurait pu être intéressant de tester les concentrations intermédiaires (entre 4 et 8 µg/ml). Ces premiers résultats ne démontrent pas l'intérêt d'un milieu sélectif contenant du chlorure de benzalkonium.

Figure 30. Diamètres d'inhibition pour *C. jejuni*

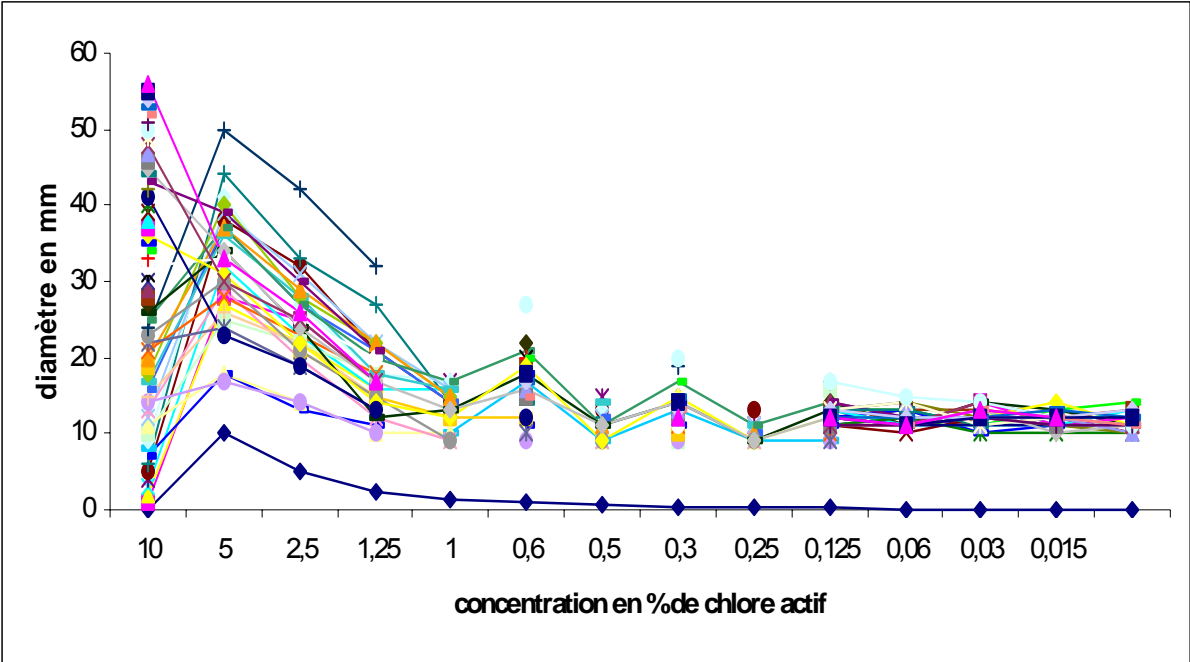
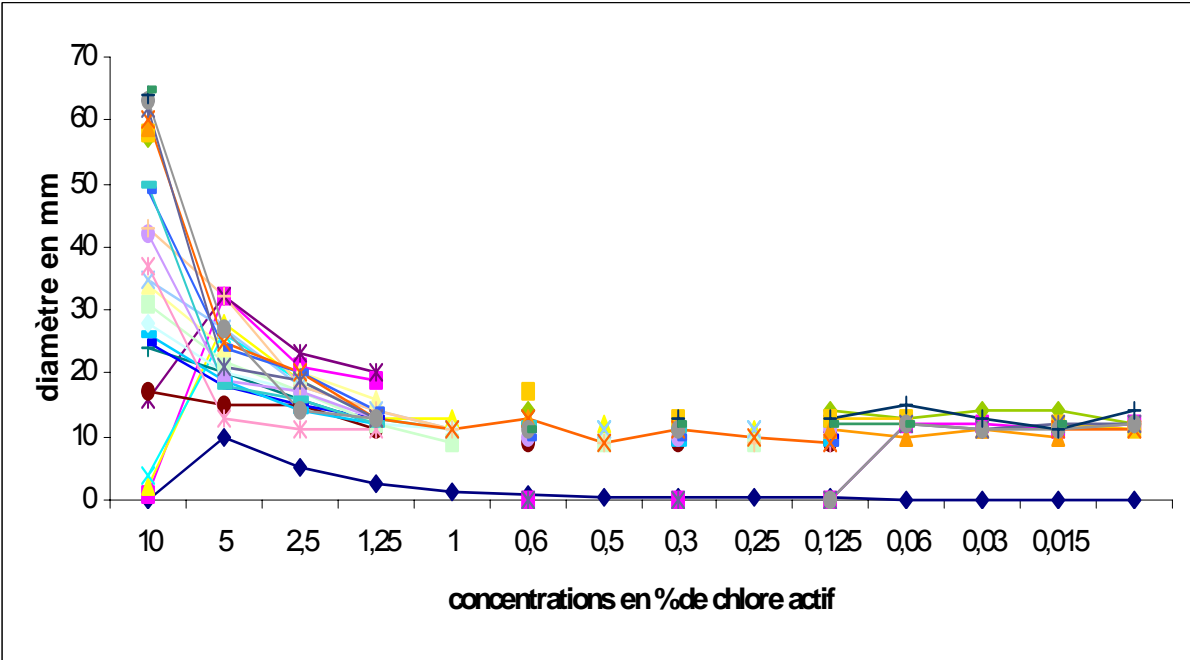


Figure 31. Diamètres d'inhibition pour *C. coli*



4 Mesure de la CMI de l'hypochlorite de sodium par la méthode de diffusion en milieu gélosé

La détermination des CMI de l'hypochlorite de sodium ne peut pas être mesurée en ensemençant les souches sur des géloses contenant ce désinfectant. En effet, le mélange de la gélose avec les produits chlorés entraîne une réaction gazeuse avec formation de mousse à la surface et décoloration de la gélose. Après incubation dans l'étuve à CO₂, les colonies ne présentent pas de croissance, ce qui est probablement lié à une altération du milieu de croissance. Nous avons donc tenté d'adapter pour cette molécule une méthode de diffusion utilisée pour les antibiotiques.

4.1 Souches de campylobacter utilisées

Pour l'étude de la sensibilité à l'hypochlorite de sodium, 56 souches de *C. jejuni* et 25 souches de *C. coli* ont été utilisées. Ces souches, d'origine aviaire, nous ont été fournies par l'AFSSA site de Ploufragan.

4.2 Courbes des diamètres d'inhibition

Les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres. L'expérimentation a été répétée à deux reprises pour 28 souches.

Les courbes des diamètres d'inhibition pour l'espèce *C. jejuni* et *C. coli* sont indiquées sur les figures 30 et 31 respectivement. On observe pour les deux espèces que le diamètre d'inhibition est d'autant plus grand que la quantité d'hypochlorite de sodium déposée sur le disque est importante.

4.3 Distribution des diamètres

Pour l'espèce *C. jejuni*, les souches sont discriminées pour les concentrations comprises entre 1,25 et 10% de chlore (figure 30). Pour *C. coli*, il n'y a plus de différence de valeur de diamètre d'inhibition à partir de la concentration de 2.5% de chlore (figure 31).

Sur ces figures, les souches semblent se répartir sur les différentes valeurs des diamètres d'inhibition ce qui ne permet pas de séparer deux ou plusieurs sous-populations au sein des échantillons de souches de campylobacter testées.

4.4 Intérêts et inconvénients de la mesure des diamètres d'inhibition

Le chlore est une molécule très réactive qui ne peut être étudiée comme les autres molécules désinfectantes avec la méthode de dilution en milieu gélosé. La diffusion en milieu gélosé permet donc une première approche de la sensibilité à ce désinfectant. Cependant, elle ne permet pas plus que la méthode de dilution en milieu gélosé de distinguer des sous-population différentes. Cette méthode présente l'inconvénient par rapport à la méthode de mesure des CMI en milieu d'être très lourde à mettre en œuvre car elle nécessite beaucoup de matériel (deux boites de Petri par mesure et par souche) et elle est très chronophage.

5 Conclusion et conséquences pour la suite de l'étude

L'étude de la sensibilité des bactéries et de campylobacter en particulier aux désinfectants est délicate car nous ne possédons pas, pour l'instant, de méthode d'étude qui nous permette d'observer, comme pour les antibiotiques, des caractéristiques fondamentales permettant de distinguer des bactéries sensibles ou résistantes. Il semble que, de la même manière que ce qui est observé pour les antibiotiques, la résistance aux désinfectants doive se concevoir dans un contexte global d'écologie microbienne et non pas seulement au niveau de la cellule bactérienne.

Les résultats de ces pré-études nous ont permis d'éliminer certaines hypothèses : quelle que soit la méthode choisie, nous ne distinguons pas de sous-populations. Néanmoins, nous pouvons mettre en évidence des différences de sensibilité des bactéries qui se traduisent par des écarts entre les résultats observés.

Pour les désinfectants, quelles conclusions pouvons-nous tirer des observations faites au laboratoire ? Les molécules désinfectantes ne sont pas utilisées seules, mais le plus souvent au cours d'une procédure de nettoyage et de désinfection, qui implique l'utilisation de différentes molécules. La présence de souches bactériennes après nettoyage et désinfection sur le terrain est-elle le résultat d'une résistance spécifiquement orientée contre une molécule désinfectante ou d'une résistance provenant de la combinaison de mécanismes complexes non identifiés à ce jour et de toute façon impossible à élucider dans le cadre des études au laboratoire trop restrictives pour l'écologie microbienne.

Pour la suite de notre étude, la méthode retenue pour l'étude de la sensibilité des campylobacters aux désinfectants est la méthode de dilution en milieu gélosé. Ses principaux inconvénients sont que les concentrations de désinfectants réellement actives dans le milieu ne sont pas connues et elle ne permet pas de discrimination nette au sein de la population de campylobacter étudiée. De plus, les concentrations qui peuvent être testées sont très faibles par rapport aux concentrations utilisées sur le terrain. Mais elle présente l'avantage d'être très standardisée et applicable facilement à un grand nombre de souches. La conséquence de l'utilisation de cette méthode pour campylobacter est terminologique : le terme de « moindre sensibilité » semble le plus adapté pour décrire les souches qui présentent une CMI élevée par rapport aux autres souches.

CHAPITRE 4. ISOLEMENT DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* APRES NETTOYAGE ET DESINFECTION DANS LES ABATTOIRS DE VOLAILLES : ANALYSE D'UNE SOURCE POTENTIELLE DE CONTAMINATION DES CARCASSES

1 Introduction

En France, une étude réalisée en 1994 a montré que 60 à 100% des volailles entrant à l'abattoir étaient contaminées par campylobacter (Rivoal, Denis et al. 1999). Le plan de surveillance des campylobacters sur les volailles en 2004 a mis en évidence que 85% des prélèvements réalisés à l'abattoir étaient positifs pour campylobacter (Hellard and Kempf 2005).

Les sources de contamination des carcasses et les mécanismes de contamination croisée des carcasses par les campylobacters au cours de l'abattage des volailles ne sont pas complètement élucidés. Les sources de contamination identifiées des carcasses par campylobacter sont principalement le matériel de la chaîne d'abattage (Rivoal, Denis et al. 1999; Alter, Gaull et al. 2005) et les caisses de transport (Slader, Domingue et al. 2002; Hansson, Ederoth et al. 2005; Rasschaert, Houf et al. 2007).

La maîtrise de la contamination des carcasses de volaille pendant les procédés d'abattage, en particulier pour les lots de volailles initialement indemnes de campylobacter, pourrait être un moyen de diminuer le risque pour le consommateur. Cependant, en raison de l'automatisation et de la rapidité de l'abattage des volailles et de l'utilisation intensive d'eau pendant les procédés d'abattage, il est très difficile (voire impossible) d'empêcher la contamination croisée des carcasses (Borck and Pedersen 2005).

Une approche proposée pour empêcher la contamination des lots de volailles initialement indemnes pour campylobacter est de déterminer le statut du lot avant l'abattage et donc de faire abattre les lots négatifs avant les lots positifs (Wagenaar, Mevius et al. 2006). Cette approche nécessite d'avoir une méthode fiable pour la détermination du statut du lot, et ne prend pas en compte les risques de contamination des volailles au cours du transport par des caisses contaminées. Cette mesure sous-entend également que les campylobacters ne peuvent pas persister dans l'environnement de l'abattoir après les procédures de nettoyage et de désinfection.

Le peu d'études sur la sensibilité des campylobacters aux désinfectants montrent que les campylobacters sont sensibles aux désinfectants utilisés en industrie agroalimentaire (Blaser, Smith et al. 1986; Avrain, Allain et al. 2003). De plus, jusqu'à récemment (Johnsen, Kruse et al. 2007), les campylobacters n'avaient jamais été isolés de prélèvements réalisés dans les abattoirs de volailles après nettoyage et désinfection (Borck, Stryhn et al. 2002; Miwa, Takegahara et al. 2003; Cools, Uyttendaele et al. 2005; Malakauskas, Jorgensen et al. 2006).

L'objectif de cette étude est de déterminer si les campylobacters peuvent être isolés sur des surfaces en contact avec les carcasses pendant les procédés d'abattage, après les procédures de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Le deuxième objectif est de déterminer si les campylobacters isolés après nettoyage et désinfection sur la chaîne d'abattage sont une source potentielle de contamination des carcasses de volailles.

2 Publication

2.1 Résumé

Les campylobacters sont la première cause d'entérite d'origine bactérienne chez l'homme dans le monde. Ces bactéries sont généralement considérées sensibles à l'action des molécules désinfectantes utilisées en industrie agroalimentaire. L'objectif de cette étude est de déterminer si les campylobacters peuvent survivre aux opérations de nettoyage et désinfection dans les abattoirs de volaille et si les souches isolées après nettoyage et désinfection peuvent contaminer les carcasses pendant l'abattage des volailles. Des prélèvements ont été réalisés dans l'environnement de 4 abattoirs avant et après nettoyage et désinfection (caisses de transport, surfaces en contact avec les carcasses pendant l'abattage et eau du bac d'échaudage) et sur les volailles (fientes dans les caisses de transport et peaux de cou avant l'entrée en salle de ressuage des carcasses). Au total, 7 visites ont eu lieu dans les 4 abattoirs. Des souches de *C. jejuni* ont été isolées à partir de prélèvement de surfaces après nettoyage et désinfection dans 3 des 4 abattoirs visités (9 prélèvements étaient positifs sur les 51 prélèvements réalisés). La suite de l'étude a été restreinte à un seul abattoir afin d'étudier le passage des souches isolées après nettoyage et désinfection sur les carcasses pendant l'abattage. Le phénotype (P) de résistance aux antimicrobiens (6 antibiotiques et 2 molécules d'ammoniums quaternaires) des souches de *C. jejuni* collectées à partir des prélèvements des volailles et de l'environnement a été déterminé par la méthode de dilution en milieu gélosé. Sur l'ensemble des souches isolées dans cet abattoir, 9 phénotypes ont été observés dont trois qui étaient également identifiés sur des isolats collectés après nettoyage et désinfection. Le génotype (G) des souches présentant un de ces trois phénotypes d'intérêt a été déterminé par la technique de PCR-RFLP. La combinaison des résultats du phénotype et du génotype a conduit à l'identification de types (P*G) d'isolats. Ces isolats ont ensuite été comparés en fonction de leur origine (fientes, caisses de transport, peaux de cou, surfaces après nettoyage et désinfection) et de leur type (P*G). Un seul type (P*G) a été observé à la fois sur les surfaces après nettoyage et désinfection et sur les carcasses avant ressuage, mais ce type a également été détecté dans les prélèvements des caisses de transport. Nos résultats démontrent que les campylobacters sont capables de survivre aux opérations de nettoyage et de désinfection dans les abattoirs de volailles. Nos résultats suggèrent que ces souches puissent contaminer les carcasses de volailles pendant les procédés d'abattage mais l'hypothèse d'une contamination à partir des caisses de transport n'a pas pu être éliminée.

2.2 Article soumis à International Journal of Food Microbiology le 08 juin 2007

