

Synthèse préliminaire du Projet Bravo (avril 2017-avril 2018)



Le projet Bravo visait à étudier l'impact des traitements de nettoyage et désinfection sur l'écologie microbienne et la résistance aux antibiotiques de bactéries pathogènes d'intérêt en abattoir porcin.

Objectifs

Le projet **Bravo** avait pour objectifs majeurs :

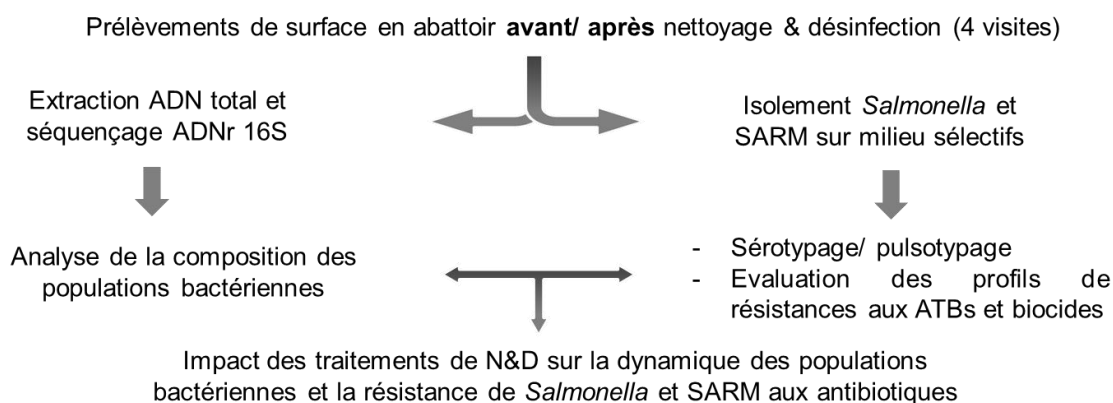
- d'obtenir une image des populations bactériennes présentes et de la prévalence de certains pathogènes d'intérêt pour la filière (*Salmonella* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)) dans un abattoir de porcs modèle ainsi que les niveaux de résistance aux antibiotiques et aux biocides
- d'évaluer l'effet des traitements de nettoyage désinfection appliqués sur le terrain sur la structure des communautés bactériennes indigènes et la modulation de la résistance aux biocides et aux antibiotiques de bactéries pathogènes d'intérêt

Démarche expérimentale



Biocides utilisés

- Alcalin chloré (quot.)
- Ethanol (quot.)
- Acide (hebdo.)



4 campagnes de prélèvements de surface ont été réalisées dans un abattoir de porcs de la Région Bretagne au niveau de 6 sites d'intérêt, avant et après désinfection sur une période de 2 mois environ (le 22/03, 03/04, 24/04 et 15/05). A partir de chacun des 48 prélèvements, un séquençage de l'ADNr 16S a été réalisé pour caractériser les populations bactériennes présentes et obtenir des informations sur l'évolution de leur composition en fonction des sites et des dates de prélèvements. En parallèle, des enrichissements et dénombrements sur milieux nutritifs (sélectifs et non sélectifs) ont été réalisés afin de quantifier la charge bactérienne totale et d'isoler et mesurer la prévalence de 2 pathogènes d'intérêt pour la filière, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Salmonella enterica*. La résistance aux antibiotiques et aux biocides de ces souches pathogènes isolées a également été mesurée avant/après nettoyage et désinfection en

déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) au moyen d'une technique de dilution standardisée en microplaque.

Principaux résultats

Les résultats présentés ici concernent uniquement les *Salmonella*, les analyses étant en cours de finalisation pour les SARM.

Prévalence des pathogènes *Salmonella* et SARM

Présence (X) des pathogènes ciblés selon la zone et la date de prélèvement

- 38 souches isolées (16 avant et 16 après nettoyage /désinfection (N&D) sur les 4 visites)
- 5 sérotypes différents: 4,5,12:i:- (50%), Typhimurium (16%), Rissen (16%), Infantis (10%), Derby (8%)

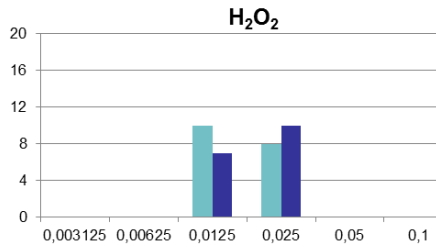
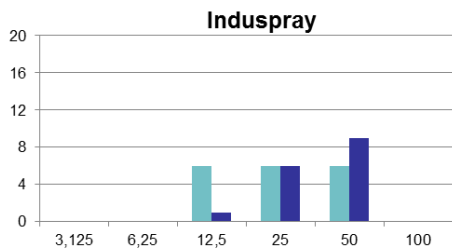
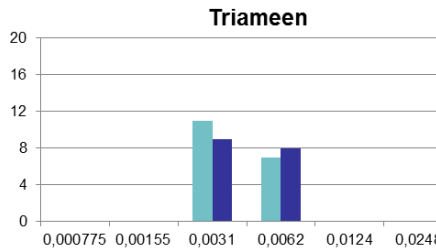
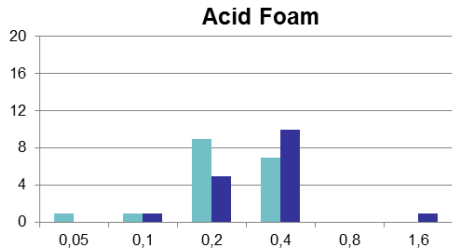
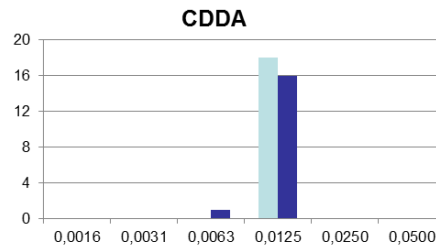
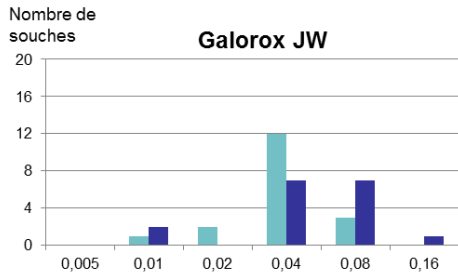
sérotype	S.4,5,12:i:- (50%)	Rissen (16%)	Typhimurium (16%)	Infantis (10%)	Derby (8%)
Code pulsotype	B01, B02, B04, B05, B06, B07, B15, B16, B09	B03, B10, B11	B09	B12	B08, B13, B14

	5-battes épileuse		7-lamelles flagelleuse		10-Coupe cou		12-Lame de coupe circulaire et structure		13-Goulotte abats blancs		16-Estrade levée abats rouges	
27-mars	B05	B05	B06 B11						B13	B06	B01 B15	B11
03-avr	B01	B01	B08 B14	B09 B16			B12	B12	B10	B01 B11		B10
24-avr	B09	B09						B12	B09	B09	B09	
15-mai	B04	B04	B01	B03 B01			B12	B04	B04	B02	B01	B01

- ➔ Certains pulsotypes sont retrouvés à plusieurs dates de prélèvements et au niveau de plusieurs sites (B01, B09).
- ➔ Certains pulsotypes sont également isolés pour un site donné et une date de prélèvement, avant et après nettoyage/désinfection, indiquant leur résistance vis-à-vis des traitements appliqués (B05, B04, B12, B01, B09).
- ➔ La présence du pulsotype B12 (*Salmonella enterica* serovar Infantis) de manière récurrente (3 prélèvement sur 4) au niveau du site 12 (scie circulaire) suggère une persistance de cette souche malgré les procédures de nettoyage et désinfection.

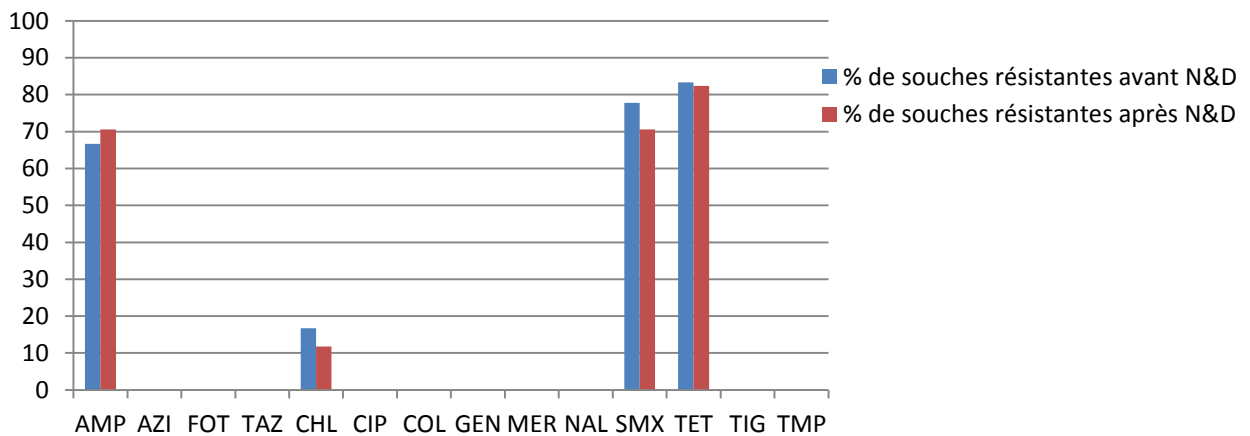
Résistance aux biocides

Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) avant (bleu clair) et après (bleu foncé) nettoyage/désinfection pour les 3 formulations commerciales biocides utilisées dans l'abattoir (Galorox JW, Acid foam et Induspray) et 3 substances actives biocides communément retrouvées dans les formulations commerciales biocides (Chlorure de didécylidiméthyl ammonium, CDDA – N-(3-Aminopropyl)-N-dodécylpropane-1,3-diamine, Triameen – peroxyde d'hydrogène, H2O2)



➔ On ne constate pas d'évolution significative (test de Student, $p > 0.05$) des CMI biocides après la procédure de nettoyage désinfection ni pour les 3 formulations commerciales biocides utilisées au sein de l'abattoir ni pour les trois autres substances actives biocides.

Résistance aux antibiotiques

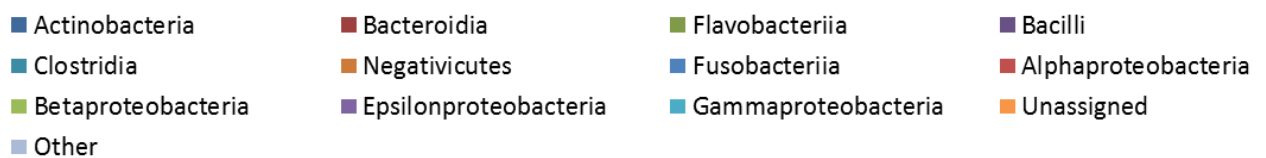
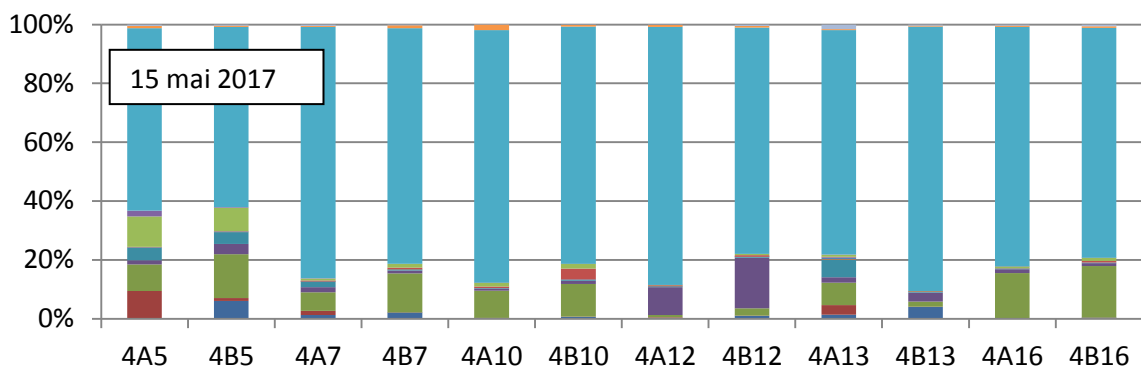
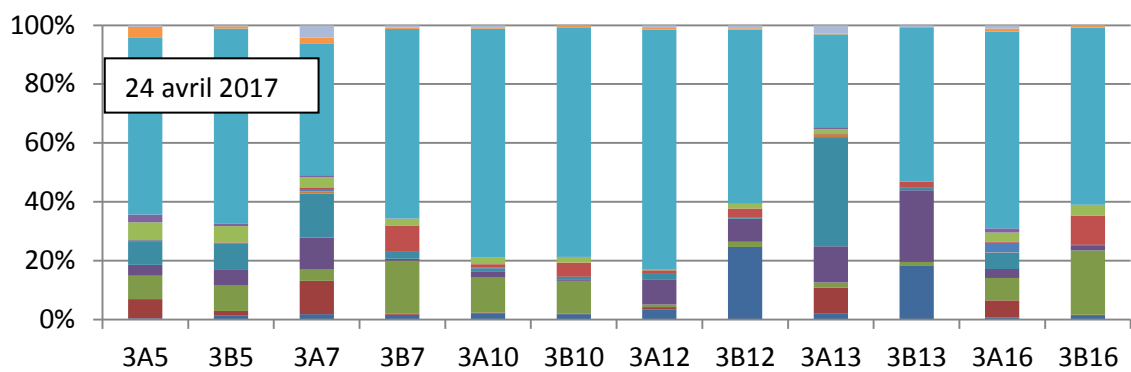
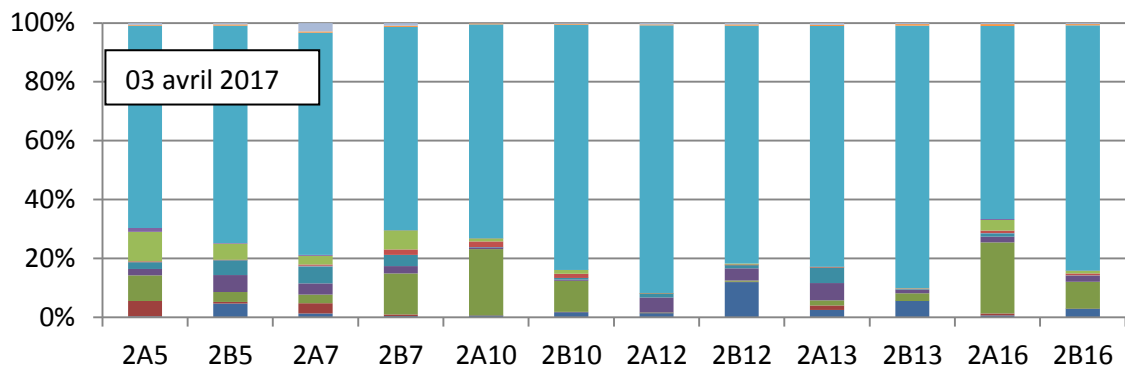
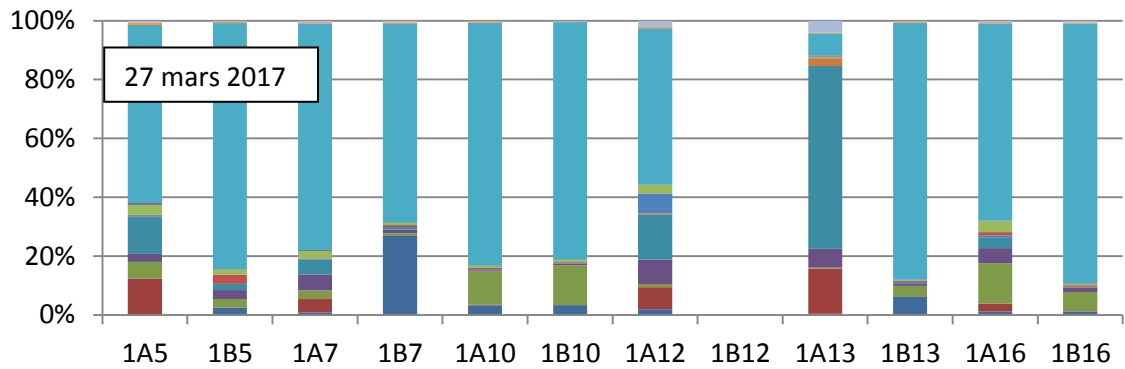


AMP (ampicilline), AZI (azithromycine), FOT (cefotaxime), CHL (chloramphénicol), CIP (ciprofloxacine), COL (colistine), GEN (gentamicine), MER (meropénème), NAL (acide nalidixique), SMX (sulfaméthoxazole), TAZ (ceftazidine), TET (tétracycline), TGC (tigecycline), TMP (triméthoprime)

➔ Forte prévalence de la résistance à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole et à la tetracyline en cohérence avec les données de la filière pour *Salmonella*

➔ La CMI antibiotiques pour les *Salmonella* n'évolue pas significativement après nettoyage/désinfection.

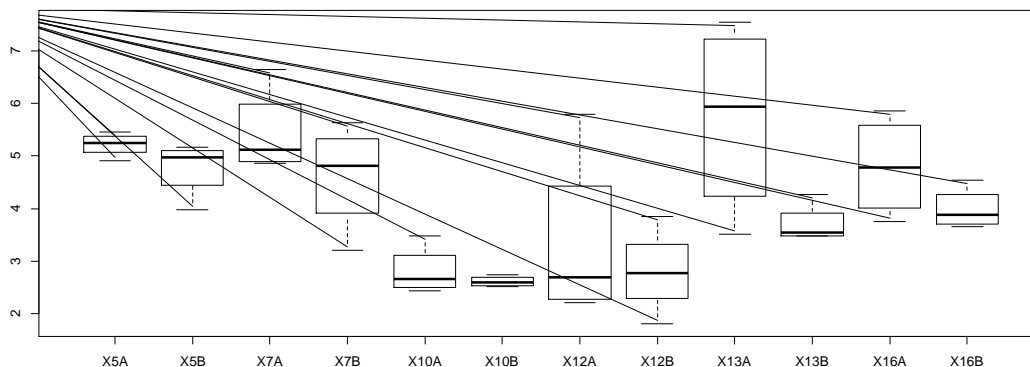
Etude de la diversité bactérienne



Les résultats de séquençage de l'ADNr 16s révèlent une large dominance des **Gammaproteobacteria** (bleu clair) sur l'ensemble des sites de l'abattoir (**5**=battes épileuse, **7**=lamelles flagelleuse, **10**=Coupe-cou, **12**=Lame de coupe circulaire, **13**=Goulotte abats blancs et **16**=Estrade abats rouges), et une relative stabilité des populations bactériennes majoritaires aux différentes dates de prélèvements et avant (**A**) / après (**B**) nettoyage et désinfection. Cela suggère que les procédures de nettoyage et désinfection ne semblent avoir qu'un impact limité sur l'équilibre des flores majoritaires. De plus, cette stabilité dans le temps suggère que les populations de surfaces sont probablement davantage des populations persistantes au sein de l'abattoir, que des populations introduites chaque semaine par les nouvelles bandes de porcs. On observe également pour certains sites une spécificité récurrente en termes de genre bactérien identifié comme le genre *Enhydrobacter* majoritaire au niveau du site 10 (coupe-cou) pour l'ensemble des dates de prélèvement (données non montrées).

Néanmoins, les procédures de nettoyage et désinfection tendent à réduire la diversité comme montré par le graphique en boxplots présentant les indices de Shannon calculés pour les différents sites de prélèvements avant (A) et après (B) nettoyage et désinfection comme indiqué ci-dessous.

Indices de Shannon



Conclusion et perspectives

Les procédures de nettoyage et désinfection appliquées dans l'abattoir ne semble pas impacter la résistance aux biocides et antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées. Les résultats obtenus sur la caractérisation des communautés bactériennes suggèrent que les populations étudiées sont plutôt des populations résidentes au sein de l'abattoir, avec des souches de *Salmonella* persistantes retrouvées à différentes dates de prélèvement. Les traitements de désinfection affectent les populations bactériennes en diminuant leur diversité (notamment vis-à-vis des espèces minoritaires) mais ne change pas globalement les équilibres des espèces majoritaires. De nouvelles souches peuvent être introduites par l'arrivée des nouvelles bandes d'animaux chaque semaine, mais cela ne semble pas modifier de manière marquée la diversité et les espèces majoritaires retrouvées sur les 2 mois pendant lesquels ont été effectués les prélèvements. Afin de réellement mesurer le risque de sélection de résistance aux antibiotiques via les procédures de nettoyage et désinfection, il conviendrait d'étudier l'ensemble des souches bactériennes et des gènes présents via une approche globale (métagénomique) permettant d'investiguer des marqueurs de la résistance.