

Validation d'indicateurs de mesure du biofilm dans les circuits d'eau en élevage porcin et comparaison de différents protocoles de décapage

Anne HEMONIC (1), Justine JEUSSELIN (2), Alexandre POISSONNET (1), Isabelle CORREGE (1), Franck BOUCHET (2)

(1) IFIP-Institut du porc, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35104, 35651 Le Rheu

(2) PORC.SPECTIVE, ZA de Gohélève, 56920 Noyal Pontivy

anne.hemonic@ifip.asso.fr

Validation of biofilm measurement indicators in water lines on pig farms and comparison of different pipe-cleaning protocols

A pipe-cleaning protocol is essential to limit development of biofilm and preserve animal health. However, pig farmers generally do not apply a protocol because they need to be convinced that it is efficient and useful. This study aimed to validate biofilm measurement indicators in water pipes on pig farms and compare different cleaning protocols. The trial was conducted in post-weaning rooms on 30 farms. Several indicators were compared: presence or absence of color in the water collected, visual level of cleanliness inside pipes recorded by endoscopy, results of bacteriological analysis of the water (colony count at 22°C and 37°C) and measurement of ATPmetry on the internal surface of the pipe. Three cleaning protocols were tested: FLUSHPIPE® (injection of water and air under pressure), HYDROCARE® (silver chelate stabilized hydrogen peroxide) and a sequence of base and acid with ALCANET® (alkaline detergent) and CID2000® (hydrogen peroxide and peracetic acid). All of the indicators tested were relevant because their results decreased significantly after applying the protocols. No protocol was significantly better than the others, but the base-acid protocol seemed to have a higher rate of success. Even though the protocols were successful, indicators often revealed the presence of a persistent biofilm, likely because a single application of a protocol was not enough to remove biofilm in pipes that had rarely or never been cleaned before. Finally, this study showed that several indicators could be used to raise farmers' awareness of the presence of a biofilm and to convince them to apply a cleaning protocol.

INTRODUCTION

L'entretien régulier des canalisations d'eau d'abreuvement est une étape clé pour limiter le développement de biofilm, préserver la qualité bactériologique de l'eau, la santé des animaux et l'état d'encrassement des équipements. Le biofilm peut avoir un rôle de réservoir et de diffusion d'antibiorésistance (Schwartz *et al.*, 2003) et d'agents pathogènes du porc comme les virus SDRP, PCV2 (Jacques *et al.*, 2015) ou *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Loera-Muro *et al.*, 2013). Or, comparés aux éleveurs de volailles de chair, les éleveurs de porcs appliquent très peu de protocoles de décapage de biofilm (Brilland *et al.*, 2015). Cette étude vise à comparer des indicateurs facilement applicables en élevage porcin pour objectiver la présence d'un biofilm et évaluer l'efficacité de différents protocoles de décapage.

1. MATERIEL ET METHODES

Les essais ont été menés sur des circuits d'eau de post-sevrage, dans des salles de 30 élevages volontaires localisés en Bretagne et en Normandie.

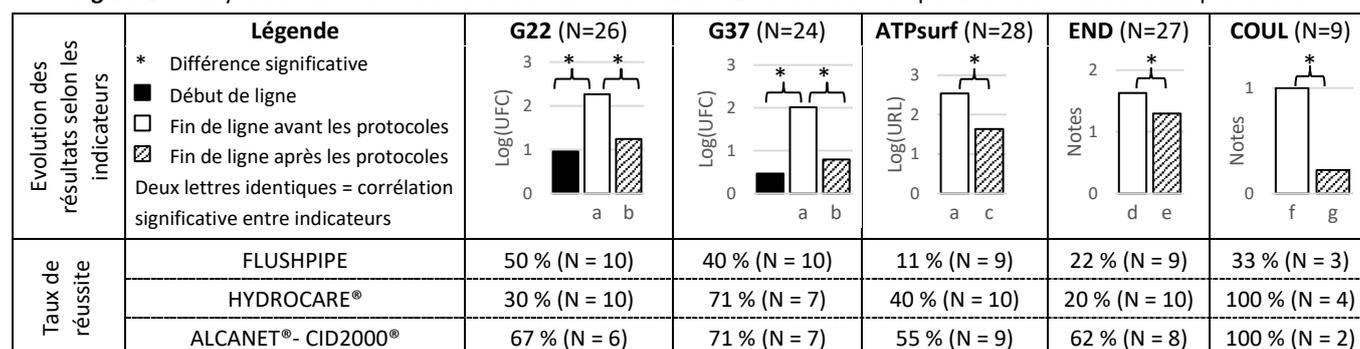
Plusieurs indicateurs ont été comparés :

- Niveau de contamination en germes aérobies revivifiables à 22°C (G22) et 37°C (G37) dans un prélèvement d'eau ;
- Mesure d'Unités de Lumière Relative (URL) par ATPmétrie avec écouvillonnage de la surface interne de la canalisation (ATPsurf) avec l'appareil NG Luminometer Clean-Trace 3M ;

- Niveau de coloration de l'eau prélevée dans un pédisac (COUL) : note 0 = eau claire ; note 1 = eau colorée ;
- Niveau de propreté de l'intérieur des canalisations par endoscopie (END) avec l'appareil TESLONG Digital endoscope camera : note 0 = propre ; note 1 = léger dépôt à la surface ou présence de traces laissées sur le passage de la caméra ; note 2 = dépôt important obstruant rapidement la caméra.

Trois protocoles de décapage de biofilm ont été testés dans 10 élevages chacun : FLUSHPIPE® (injection d'eau et d'air sous pression), HYDROCARE® (peroxyde d'hydrogène stabilisé par des chélates d'argent) et protocole Base-Acide avec ALCANET® (détergent alcalin) puis CID2000® (peroxyde d'hydrogène - acide peracétique). Tous les indicateurs ont été mesurés sur des prélèvements réalisés en fin de ligne avant et après le protocole de décapage. Des prélèvements ont aussi été faits en début de ligne pour mesurer G22 et G37.

Les indicateurs de biofilm ont été considérés pertinents s'ils montraient une baisse significative de leurs résultats entre avant et après le protocole (test de Wilcoxon pour les paramètres COUL et END et test de Student pour les paramètres G22, G37 et ATPsurf après passage en log et validation de leur normalité, logiciel SAS®, $p < 0,05$). Les valeurs nulles avant protocole ont donc été exclues de l'analyse statistique, aucun effet du protocole ne pouvant être mis en évidence dans les élevages concernés. Les effectifs différents de 30 dans la figure 1 s'explique par l'exclusion de ces élevages dans l'analyse.

Figure 1 - Analyse de l'évolution des résultats selon les indicateurs étudiés et comparaison de l'efficacité des protocoles

Voir le texte pour la signification des abréviations

La réussite d'un protocole a été définie de la façon suivante : pour G22, G37 et ATPsurf, il fallait atteindre un résultat après protocole qui soit inférieur au résultat avant protocole dans un rapport de 10. Ce rapport de 10 est celui qui est utilisé pour démontrer une variation significative de la contamination en G22 et G37 dans les eaux destinées à la consommation humaine (Arrêté du 11 Janvier 2007). Pour END et COUL, l'objectif était de passer d'une note de 2 à 1 ou 0 ou d'une note de 1 à 0. La meilleure efficacité d'un protocole par rapport à un autre a été démontrée s'il permettait d'obtenir un pourcentage significativement supérieur d'élevages où le décapage du biofilm était réussi (test de Khi-2). Enfin, une recherche de corrélation a été faite entre les indicateurs avant et après protocole pour évaluer s'ils étaient cohérents et s'ils apportaient le même type d'information sur la composition du biofilm (bactéries, autres types de cellules, minéraux) (test de corrélation de Pearson pour les variables quantitatives et test de Spearman pour les variables ordinales).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Avant protocole, G22 et G37 ont significativement augmenté entre le début et la fin de ligne témoignant d'un accroissement du biofilm le long de la canalisation (Figure 1).

Tous les indicateurs ont montré une différence significative en fin de ligne entre avant et après le protocole et sont donc pertinents pour démontrer à l'éleveur la présence d'un biofilm et l'efficacité d'un protocole de décapage (Figure 1). Les indicateurs G22, G37 et ATPsurf ont montré une corrélation significative de leurs résultats avant protocole (Figure 1) ce qui laisse penser qu'ils décrivent le même type de biofilm à dominance bactérienne. Cette corrélation n'existait plus avec ATPsurf après protocole, indiquant que le biofilm décapé aurait une structure modifiée, avec certains types de cellules mesurés par ATPsurf mais pas par les indicateurs G22 et G37. L'indicateur COUL a semblé intéressant pour décrire un biofilm de type minéral et non bactérien car il était corrélé à la teneur en fer et en manganèse de l'eau (résultats non présentés). L'indicateur END n'a été corrélé à aucun autre indicateur. Il n'a donc pas permis de décrire un niveau de contamination du circuit.

Mais l'examen endoscopique a été un outil pédagogique intéressant dans 11 élevages sur 28 où la note de 2 a témoigné d'un dépôt important. L'avantage des indicateurs ATPsurf, END et COUL a été d'avoir immédiatement le résultat, contrairement à G22 et G37 qui ont impliqué un envoi au laboratoire d'analyse. Aucun protocole n'est ressorti statistiquement meilleur que les autres. Ceci pourrait être lié à la faible puissance statistique de l'étude. Toutefois, les résultats ont montré une tendance à une meilleure réussite du protocole Base-Acide. FLUSHPIPE® a eu un effet mécanique intéressant pour commencer à déstructurer le biofilm mais il serait à compléter par un protocole chimique. HYDROCARE a montré des résultats moins réguliers selon les indicateurs. Cependant, même en cas de réussite du protocole, un biofilm persistant a souvent été mis en évidence (indicateurs > 0 même après un protocole réussi, résultats non présentés ici). Cela peut s'expliquer par l'efficacité seulement partielle des protocoles appliqués sur un biofilm ancien et incrusté dans une canalisation jamais ou peu décapée auparavant. En effet, seuls quatre élevages sur 30 avaient réalisé un décapage ponctuel du biofilm sur les deux dernières années. Une autre raison est que, dans certains élevages, l'eau était déjà chargée en bactéries en début de ligne et G22 et G37 n'ont pas pu s'améliorer en fin de ligne malgré le protocole.

CONCLUSION

Cette étude a démontré l'intérêt de plusieurs indicateurs pour sensibiliser les éleveurs à la présence d'un biofilm et à l'utilité d'un protocole de décapage. Aucun protocole n'est ressorti statistiquement meilleur que les autres. Dans une prochaine étude, il serait intéressant d'évaluer la faisabilité d'une élimination totale du biofilm en renouvelant plusieurs fois les protocoles dans un même circuit et en s'assurant de l'absence de bactéries dans l'eau en début de ligne. L'impact économique et sanitaire du décapage du biofilm serait aussi à chiffrer pour convaincre les éleveurs de son utilité.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le plan Ecoantibio.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.
- Brilland S., Gambade P., Belloc C., Leblanc-maridor M., 2015. Différence de perception et de pratiques vis-à-vis de la qualité de l'eau de boisson en élevage de porcs et de volailles. Congrès de l'Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine.
- Jacques M., Grenier D., Labrie J., Provost C., Gagnon C., 2015. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in bacterial biofilms. J Swine Health Prod. 23, 132-136.
- Loera-Muro V.M., Jacques M., Tremblay Y.D., Avelar-González F.J., Loera Muro A., Ramírez-López E.M., Medina-Figueroa A., González-Reynaga H.M., Guerrero-Barrera A.L, 2013. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. Microbiology, 159, 536-44.
- Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., Obst U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, FEMS Microbiol Ecol, 43, 325-335.