

**Le directeur général**

Maisons-Alfort, le 26 octobre 2018

**AVIS**  
**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,**  
**de l'environnement et du travail**

**relatif à « la demande d'appui scientifique et technique sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transport d'oiseaux vivants vis-à-vis du risque d'influenza aviaire »**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Anses a été saisie le 27 octobre 2017 par la Direction Générale de l'Alimentation pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'appui scientifique et technique sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transport d'oiseaux vivants vis-à-vis du risque d'influenza aviaire ».

## **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

La présente saisine s'inscrit dans le cadre de la mise en place de mesures de gestion, faisant suite aux deux épidémies d'influenza aviaire que la France a connues entre 2015 et 2017.

La lettre de saisine indique qu'un « *projet d'arrêté en cours relatif aux mesures de prévention de la propagation des maladies via le transport d'oiseaux vivants prévoit dans son article 9 le contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection. Le transporteur met en place un plan de contrôle visuel et microbiologique pour s'assurer de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfections vis-à-vis du risque influenza aviaire. En parallèle, les DDPP peuvent être amenées également à réaliser des contrôles visuels et microbiologiques, officiels* ».

La DGAL sollicite l'expertise de l'Anses pour répondre à des questions portant plus précisément sur la réalisation des contrôles microbiologiques, à savoir pour définir :

- « *les modalités d'échantillonnage : nombre de prélèvements à réaliser par véhicule contrôlé et type de prélèvements (boîte de gélose contact, écouvillon ou chiffonnettes), les types de surfaces devant faire l'objet de prélèvement (caisses, hayon, ..) ;*
- *les micro-organismes ciblés pour vérifier la réduction bactérienne (flore totale, streptocoques fécaux notamment) ainsi que les seuils d'interprétation de ces analyses de dénombrement* ».

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Compte tenu des autres saisines influenza arrivées dans la même période, il a été convenu avec la DGAL d'établir un ordre de priorité entre les différentes saisines urgentes, l'échéance pour la présente saisine étant fixée à juillet 2018.

Dans un premier temps, cette saisine a nécessité la collecte de données de sources différentes, relatives aux procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection, pour avoir une vision représentative de la situation.

L'Unité de recherche Epidémiologie et Bien-Etre en Aviculture et Cuniculture (UEBEAC) du Laboratoire Ploufragan/ Plouzané a été chargée de récolter et de traiter les données disponibles, puis de rédiger un rapport d'Appui Scientifique et Technique (AST).

Le traitement de cette demande s'est appuyé d'une part, sur une recherche bibliographique (dont la littérature grise) relative aux procédures de nettoyage-désinfection de moyens de transport de volailles vivantes et d'autre part, sur un appel à données auprès des professionnels de l'abattage et du transport des volailles. Cet appel à données avait pour but de collecter des éléments techniques non publiés afin de compléter les éléments scientifiques disponibles et de mieux évaluer l'applicabilité sur le terrain des différentes méthodes de contrôle microbiologique envisageables. L'appel à données a été diffusé par les principaux syndicats professionnels de l'aviculture auprès de leurs adhérents en décembre 2017. Les réponses ont été recueillies en janvier 2018 par voie électronique. Un accord-cadre sur l'utilisation des données, assurant notamment leur confidentialité, a été co-signé entre l'Anses et chaque participant.

Dans un deuxième temps, les données synthétisées dans le cadre de l'AST ont été exploitées en expertise collective pour répondre aux questions de la saisine.

L'Anses a confié le traitement de cette expertise collective au Groupe de travail (GT) IA HP et a complété spécifiquement le champ des compétences scientifiques en nommant quatre rapporteurs externes. Le groupe ainsi constitué s'est réuni en conférence téléphonique le 4 mai, et les 4 et 27 juin 2018. L'analyse et les conclusions du GT, formulées lors de ces réunions, ont été réunies dans un rapport par la coordination scientifique. L'une des conclusions a fait l'objet d'une opinion divergente de la part d'un expert du GT, mentionnée dans le présent Avis. Cette « analyse et conclusions » a été présentée au CES Santé et Bien-être des Animaux (SABA) lors de ses réunions du 12 juin, 2 juillet et 23 août 2018. Suite à la prise en compte des modifications demandées par le CES, le document a été validé à l'unanimité moins une voix contre<sup>1</sup> en séance le 23 août 2018.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

Les éléments suivants ont été pris en compte pour mener à bien l'expertise :

- le rapport d'AST et les références bibliographiques associées (cf annexe 3),
- l'arrêté du 14 mars 2018 relatif aux mesures de prévention de la propagation des maladies animales via le transport par véhicules routiers d'oiseaux vivants,
- l'instruction technique DGAL/SDSPA/2018-207 du 19/03/2018 portant sur la modalité de mise en place et d'inspection des mesures de biosécurité dans les transports par véhicules routiers d'oiseaux vivants.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT IA HP ET DU CES SABA

#### 3.1. Analyse préalable de l'objet et des questions de la saisine

Avant de répondre aux questions de la saisine, les experts émettent un certain nombre de remarques, conduisant à reformuler les questions :

- **Concernant la notion d'efficacité vis-à-vis du risque influenza aviaire**

Dans l'objet de la saisine, il est question du « *contrôle de **l'efficacité** des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transport d'oiseaux vivants **vis-à-vis du risque influenza aviaire** ».*

---

<sup>1</sup> Un expert du CES a voté contre en se ralliant à l'opinion divergente d'un expert du GT, présentée en annexe 2 du présent avis.

En termes de désinfection, le mot « efficacité » a un sens précis. Cette efficacité est objectivée par une évaluation de l'après *versus* l'avant nettoyage-désinfection (N&D) et par la vérification que la charge en agent(s) infectieux ne dépasse pas une quantité résiduelle maximale que l'on accepterait après l'application de la procédure de N&D. Cependant, dans un contexte d'analyse de risque influenza aviaire, on devrait attendre des opérations de N&D qu'elles garantissent que la charge virale résiduelle en virus influenza soit nulle, ou au moins inférieure à une dose infectante minimale connue et cibler en conséquence la vérification de cet état quelle que soit la charge initiale avant N&D.

Si la recherche de virus IA (ou plus précisément de génome de virus IA) par des méthodes PCR est possible (Huneau-Salaün *et al*, 2017), son utilisation n'apparaît pas envisageable. En effet, hors épizootie d'influenza, la probabilité de détecter des virus IA réglementés dans les matériels de transport des volailles vivantes est aléatoire. Ainsi, une charge en virus IA nulle à la suite des opérations de N&D ne serait pas forcément le reflet d'une bonne application du N&D, mais simplement de l'absence de contamination au moment du contrôle.

Dans ce contexte, les experts proposent de s'orienter vers la recherche d'un indicateur biologique naturel (le plus souvent bactérien), connu comme étant systématiquement présent. Les experts soulignent qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de corrélation scientifiquement établie entre la présence d'un indicateur bactérien (appelé « proxi » ou « index ») et la présence de virus de l'influenza aviaire.

Il existe des travaux de validation de procédures de N&D dans des laboratoires ou des animaleries où les virus IA sont manipulés, mais qui ciblent volontairement les virus IA infectieux répondant à la réglementation des MOT<sup>2</sup>, sans comparaison avec une flore bactérienne présente dans les locaux. Ces méthodes, compte tenu de leur coût et de leurs modalités, ne peuvent pas s'appliquer en routine sur le terrain (V. Jestin, E. Niqueux, communications personnelles).

Enfin, il n'existe pas de données scientifiques sur la possibilité pour des biofilms microbiens de constituer des réservoirs de virus (en particulier de virus de l'IA) sur les surfaces. L'article de Huneau-Salaün *et al* peut laisser sous-entendre que la détection par PCR de virus après N&D (alors que le virus n'est pas détecté avant N&D) pourrait être liée à la diminution des forces d'adhésion du virus au niveau des biofilms après N&D. Mais le contexte expérimental ne permet pas de privilégier formellement cette hypothèse à d'autres explications. Cette absence de connaissance constitue là encore une source d'incertitude dans l'établissement d'un protocole de contrôle des opérations de N&D vis-à-vis du risque IA.

En conséquence, le contrôle portant sur le dénombrement d'un indicateur bactérien ne permet pas aujourd'hui formellement de qualifier ni de quantifier la présence de virus IA. A l'issue des opérations de N&D, cet indicateur ne sera pas le témoin spécifique d'une décontamination vis-à-vis du virus de l'IA, mais seulement d'une diminution d'une charge microbienne reflétant la plus ou moins bonne application des opérations de N&D, pour éliminer une contamination récente, en particulier d'origine fécale.

Ainsi, les experts ne seront pas en mesure de répondre exactement à la question d'un contrôle de l'efficacité des opérations de N&D au regard du risque influenza aviaire.

De surcroît, il ne paraît pas envisageable, pour des raisons de praticité, de baser le protocole de contrôle de l'efficacité des opérations de N&D sur une observation de l'abatement d'une

---

<sup>2</sup> Réglementation des MOT : Arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique.

charge microbienne, avec un double contrôle avant/après les opérations. Il apparaît donc que le critère à mesurer serait, pour des raisons pratiques, une charge bactérienne résiduelle.

Par ailleurs, pour valider leur procédé de décontamination, les opérateurs peuvent adopter différents protocoles de contrôle, avec notamment différents indicateurs et critères de réduction. Les experts soulignent donc la difficulté de proposer un protocole unique pour le contrôle microbiologique de l'efficacité des opérations de N&D par les autorités, face à cette diversité des protocoles chez les opérateurs.

Il convient d'ailleurs de noter que, dans l'industrie agro-alimentaire, il n'existe pas de critère réglementaire pour le contrôle du N&D des surfaces.

- **Reformulation des questions**

Au regard de ces difficultés, les experts se proposent de restreindre le champ de cette question au contrôle de l'efficacité de l'application des opérations de N&D et dans le même temps de proposer des éléments pour un protocole de contrôle, indépendant des procédures de validation des procédés de N&D des opérateurs, visant à contrôler la charge résiduelle d'une population bactérienne indicatrice,

- avec les limites et les sources d'incertitude et de variabilité précédemment décrites ;
- sur la base des données disponibles ;
- en soulignant également le risque de discordance entre les résultats des autocontrôles d'un opérateur et ceux des autorités de contrôle, susceptibles de reposer sur un autre indicateur ;
- en rappelant qu'un contrôle microbiologique ne peut être valablement mis en œuvre qu'après un contrôle visuel<sup>3</sup>, indispensable, de la propreté.

### **3.2. Synthèse de l'AST**

L'analyse bibliographique a permis d'identifier onze publications scientifiques visant à évaluer l'efficacité de protocoles de décontamination des caisses de transport de volailles. Elles reposent sur le dénombrement avant et après décontamination de plusieurs indicateurs bactériens (entérocoques intestinaux, entérobactéries, flore aérobie mésophile, ...).

Cinq entreprises (trois couvoirs et deux abattoirs) ont communiqué leur protocole interne de contrôle microbiologique de la décontamination des caisses et des véhicules de transport. Outre la détection des salmonelles, quatre entreprises pratiquent un contrôle de la contamination résiduelle des surfaces (caisses, hayon et plateau du camion). Les indicateurs retenus sont les entérocoques intestinaux (« streptocoques fécaux »). L'utilisation des géloses de contact (« boîte ou lame de contact ») est majoritaire, mais d'autres techniques peuvent également être employées (chiffonnettes notamment).

**Il est souligné l'importante diversité des protocoles pouvant être employés, dans la bibliographie et chez les opérateurs, tant vis-à-vis des bactéries indicatrices que des méthodes de prélèvement et des protocoles associés.**

---

<sup>3</sup> Instruction technique DGAL/SDSPA/2018-207

Aucune référence bibliographique portant sur la validation d'une méthode de contrôle microbiologique de la décontamination des caisses et véhicules de transport de volailles vis-à-vis du virus de l'IA n'a été identifiée.

En l'absence de données collectées sur plusieurs années à partir des plans de contrôle interne des entreprises ou de résultats d'études contrôlées, il est impossible de conclure, sur la seule base des éléments récoltés au travers de l'AST, sur les modalités d'échantillonnage et les micro-organismes les plus adaptés au contrôle microbiologique de l'efficacité de la décontamination des caisses et véhicules de transport.

### **3.3. Limites scientifiques et techniques**

C'est dans ce contexte d'incertitude et de manque de données que les experts sont amenés à traiter les questions de la saisine. Les experts soulignent notamment la difficulté majeure rencontrée, issue de la confrontation entre la grande diversité des techniques susceptibles d'être employées pour le contrôle de l'application des opérations de N&D, d'une part, et la nécessité de proposer des éléments de protocole valables pour toutes les techniques imaginables d'autre part.

Compte tenu de ces éléments relatifs aux différentes limites techniques et difficultés identifiées, les experts ont beaucoup débattu sur la meilleure façon de répondre à cette demande :

- préconiser des contrôles uniquement basés sur le plan de maîtrise sanitaire des établissements, en vérifiant l'application des principes HACCP pour les procédures de N&D, la pertinence de ces procédures, de la validation du procédé de N&D et les résultats des autocontrôles des opérateurs, par rapport à un seuil d'alerte spécifique défini par l'industriel. A cet effet, les experts soulignent que les contrôles officiels relatifs aux opérations de N&D dans l'industrie agro-alimentaire se matérialisent par une vérification de l'application des bonnes pratiques d'hygiène et de la mise en place d'un plan HACCP par les professionnels,
- nonobstant le contrôle de la bonne application des principes HACCP, proposer des éléments pour un protocole complémentaire, consistant à apprécier la bonne application des procédures de N&D au moyen d'un indicateur bactérien pertinent. Ce protocole de contrôle « d'un état du matériel de transport après nettoyage et désinfection », sans garantir « l'efficacité des procédures de N&D vis-à-vis du risque influenza aviaire » pourrait néanmoins participer à l'amélioration des procédures globales de N&D.

La prise en compte des différentes sources de variabilité identifiées ci-dessus conduit les experts à souligner que le contrôle le plus pertinent, pour vérifier la bonne application des opérations de N&D des moyens de transport de volailles vivantes, serait un audit des opérateurs basé sur le contrôle des principes HACCP.

Au regard de la question posée par la saisine, qui demande un protocole de contrôle microbiologique avec un critère d'hygiène défini, les experts ont convenu de proposer également des éléments pour ce protocole, sur la base des données disponibles. Ils soulignent toutefois la nécessité de collecter davantage de données pour pouvoir affiner cette première proposition et réduire l'incertitude associée.

En outre, les experts rappellent qu'un contrôle des opérations de N&D ne saurait être basé sur un seul critère. Il doit reposer sur la prise en compte concomitante de plusieurs éléments :

- le contrôle visuel ;
- le contrôle documentaire ;
- le contrôle de la validation du procédé de N&D de l'opérateur ;
- un contrôle microbiologique au moyen d'un indicateur.

### **3.4. Réponses aux questions de la saisine**

Rappel de quelques éléments de contexte :

- il existe désormais différents segments de transport de volailles vivantes, avec mise en place de circuits pour éviter les chargements multiples et distinguer le matériel de transport des différents types de volailles ;
- les opérations de N&D ont lieu après le déchargement des animaux, dans les abattoirs ou en station de lavage dédiée, elles concernent les camions d'une part, les cages d'autre part ;
- il existe deux types de cages : des cages en plastique et des containers métalliques ;
- les opérations de N&D des moyens de transport par véhicules routiers de volailles vivantes, ne concernent pas seulement la lutte contre l'IA mais, de manière plus générale l'ensemble des maladies infectieuses des volailles. Dans le contexte particulier de l'IA, le transport des canards, et plus précisément celui des PAG, est considéré comme étant le plus à risque.

#### **3.4.1.- Les types de surface à contrôler**

Les experts identifient trois types de points de contrôle, les deux premiers étant considérés comme stratégiques :

- d'une part le N&D des cages et caisses de transport, qui constituent le facteur de risque essentiel en termes de contamination (Huneau-Salaün *et al*, 2017) ;
- d'autre part le N&D des véhicules (plateaux des camions, hayons, bas de caisses, roues) ainsi que le matériel type chariots qui pénètrent dans les élevages ;
- des surfaces « moins exposées » mais néanmoins régulièrement trouvées contaminées (Huneau-Salaün *et al*, 2017) (par exemple la cabine du camion, ou le marche-pied), dont le contrôle permet de maintenir la vigilance des opérateurs sur l'ensemble des éléments à traiter lors du N&D et de vérifier qu'ils ne peuvent pas être sources de recontamination d'un élevage, *via* le vecteur passif humain.

### **3.4.2. Les méthodes de prélèvement**

Les experts rappellent les éléments à prendre en compte :

- la diversité du type de surfaces à prélever (cages, fond de caisses...);
- la présence de biofilms sur les surfaces à prélever ;
- la présence de rainures et d'anfractuosités sur les cages et la plupart des surfaces à prélever (les plateaux de camions présentent aussi un rainurage pour des raisons de sécurité).

Ces éléments rendent particulièrement délicat le fait de définir une seule méthode de prélèvement. En effet, toute méthode a des avantages et des inconvénients. S'il apparaît que les opérateurs ont préférentiellement recours aux empreintes gélosées, les méthodes par frottis (écouvillons et chiffonnettes) sont également à prendre en considération, car très utilisées dans d'autres domaines des productions animales (élevage par exemple).

Les experts rappellent les principaux avantages et inconvénients d'emploi des différentes méthodes de prélèvements dans le cadre de la saisine :

#### *a) Les méthodes par empreinte de milieu gélosé (boîtes de contact, lames gélosées, etc)*

- Le principe de ces méthodes par empreinte est de révéler, après incubation, une image de la contamination présente sur la surface considérée. Chaque colonie obtenue après incubation ne correspond pas véritablement à une seule cellule bactérienne mais davantage à un agrégat bactérien ou une particule porteuse d'un nombre indéterminé de micro-organismes.

Ces méthodes, de ce fait, sous-estiment le niveau de contamination et à cela s'ajoute le fait que les rendements de décrochage des bactéries peuvent être très différents selon la nature et la qualité des matériaux mais permettent néanmoins d'évaluer quantitativement la concentration des agrégats bactériens.

- Ce type de méthode ne peut être utilisé pour comparer des populations bactériennes avant/après une opération de N&D, mais permet d'apprécier une densité de population résiduelle après N&D.
- Ces méthodes sont pratiques d'emploi et d'un coût modéré, elles nécessitent un minimum de manipulation au laboratoire (pas de dilution, ensemencement...), mais présentent les limites d'utilisation et d'interprétation suivantes :
  - compte tenu de la technique de l'empreinte, elles s'utilisent préférentiellement sur des surfaces pleines et planes, et paraissent donc difficilement recommandables pour le contrôle des cages, sauf à évoluer rapidement sur du matériel plus adapté (surfaces planes, moins de recoins) ainsi que sur des matériaux innovants sur lesquels les micro-organismes ne se fixent pas ;
  - les empreintes doivent être réalisées sur surfaces sèches ;
  - pour que le résultat soit interprétable, le neutralisant présent dans la boîte de contact doit avoir la capacité à neutraliser la totalité des désinfectants susceptibles d'être utilisés par les opérateurs ;
  - la standardisation de ces méthodes est complexe. En particulier, la force de pression lors du prélèvement est « opérateur dépendant », même si l'emploi d'un applicateur de gélose de contact permet d'harmoniser en partie (pression et temps de contact).

#### *b) Les méthodes par frottis*



- Le principe de ces méthodes est, par frottement et décrochage, puis immersion dans un liquide de survie, de récupérer des micro-organismes dispersés. Après dépôt sur des géloses de dénombrement et une incubation, chaque colonie dénombrée va correspondre à une cellule bactérienne.
- Les écouvillons et les lingettes ont une forme plus adaptée au prélèvement sur des surfaces irrégulières.
- Toutefois, la standardisation est complexe. Elle nécessite en particulier un matériel spécifique (gabarit), qui doit être adapté à des petites surfaces de type cages. Par ailleurs, le décrochage des bactéries des surfaces est variable et dépend de leurs forces d'adhésion.
- Pour que le résultat soit interprétable, le milieu de dilution doit être additionné d'un neutralisant ayant la capacité à neutraliser la totalité des désinfectants susceptibles d'être utilisés par les opérateurs.

Le tableau 3 du rapport d'AST (annexe 3) recense l'ensemble des avantages et inconvénients des méthodes de contrôle microbiologique des surfaces par frottis ou par empreinte gélosée. Ces avantages et inconvénients, qui illustrent l'absence de solution idéale, permettent au gestionnaire d'orienter ses choix.

### **3.4.3. Le choix des microorganismes et les seuils**

#### *a) Micro-organisme indicateur*

Plusieurs considérants doivent être envisagés :

- L'indicateur choisi doit être décrit et reconnu comme étant présent de manière homogène dans les sites concernés et avoir fait l'objet de travaux scientifiques concordants ;
- Les experts rappellent qu'il ne s'agit pas ici de rechercher un index/proxi du virus de l'IA mais un indicateur microbiologique présent dans les matières fécales des volailles (le virus de l'IA étant souvent excrété par les matières fécales), dont la recherche sera plus facilement réalisable sur le terrain (présence naturellement abondante et facilité d'analyse). Le dénombrement de la population résiduelle de cet indicateur permet de refléter la plus ou moins bonne application d'une opération de N&D ;
- En outre, s'agissant d'un contexte de lutte contre l'Influenza aviaire, les experts rappellent que les opérations de N&D doivent viser, non seulement la flore de contamination classique, mais également les virus IA. Ainsi, elles doivent être réalisées au moyen d'un désinfectant ayant des propriétés virucides. A noter que lorsqu'un produit est virucide, il est quasiment toujours dans le même temps bactéricide, signifiant qu'il y a l'assurance d'observer une diminution de la charge bactérienne ;
- Les experts soulignent par ailleurs qu'en matière de contrôle de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection bactérienne des surfaces, il faut tenir compte de la présence de biofilms, qui peuvent affecter la performance des méthodes de prélèvement. En effet, la capacité d'adhésion aux surfaces des bactéries au sein des biofilms a pour conséquence de diminuer le rendement de récupération des bactéries par ces techniques. La sensibilité de la méthode s'en trouve donc diminuée, mais de façon variable (en fonction de l'espèce bactérienne, de leur force d'adhésion, du type de

surface, du mode de prélèvement) et non connue (Midelet et Carpentier, 2002; Asséré *et al.*, 2008). Cela constitue une source non négligeable d'incertitude et de variabilité dans l'établissement d'un protocole de contrôle des opérations de N&D. Toutefois, la nature des biofilms est également importante à considérer. Du fait d'un fort turn-over des cages et camions de transport (quelques heures), il est attendu que ces contenants soient nettoyés et désinfectés rapidement après le déchargement des animaux, avec élimination rapide des déjections des volailles et de la flore correspondante. Cela laisse peu de temps à la flore fécale des volailles transportées de s'installer et de constituer un biofilm. En revanche, la flore environnementale (de type aérobie mésophile), très ubiquiste, peut avoir le temps de s'installer et persister sous forme de biofilm. Cet élément est à prendre en compte dans le choix d'un indicateur bactérien pertinent pour ce type de protocole de contrôle. Il est en effet attendu que la population de l'indicateur retenu soit importante avant les opérations de N&D et très faible après l'application correcte des opérations de N&D.

Les entérocoques intestinaux (« streptocoques fécaux » croissant sur gélose de Slanetz et Bartley à 37°C) sont de bons candidats, ils sont abondants dans les matières fécales de l'Homme et des animaux (Leclerc *et al.*, 1996). Ils sont retenus comme indicateurs de l'efficacité des traitements de l'eau et sont préférés aux coliformes et à *Escherichia coli* car leur persistance est plus longue que celle des deux autres indicateurs. Dans l'eau, ils sont donc plus pertinents pour confirmer une contamination fécale lorsqu'*E. coli* n'est pas retrouvé, et pour évaluer l'efficacité du procédé de traitement (OMS, 2000).

Des entérobactéries plus ou moins spécifiques (*Enterobacteriaceae*, coliformes, *Escherichia coli*) pourraient sans doute être retenues mais l'absence d'historique sur les niveaux atteints après N&D en France ne permet pas d'identifier les seuils de non-conformité pertinents.

Quant à la flore aérobie mésophile, qui est parfois utilisée en surveillance de l'efficacité du N&D, elle semble moins pertinente pour évaluer la bonne application des protocoles sur les matériels de transport des volailles. Les résultats des professionnels montrent en effet une forte variabilité de la contamination après application des protocoles de N&D. Cette variabilité reflète sans doute davantage la grande diversité d'origine (environnementale, humaine ...) des micro-organismes présents sur les surfaces en plus de ceux d'origine fécale. Comme indiqué ci-dessus, en fonction du lieu et du temps de stockage entre deux transports, ces micro-organismes adhèrent en plus ou moins grand nombre aux surfaces, forment des biofilms et peuvent ainsi présenter une adaptabilité plus importante aux produits de N&D. A l'inverse, les micro-organismes de la flore fécale, comme les entérocoques intestinaux, subissent des opérations de N&D immédiatement après chaque transport se traduisant par un effet plus constant et révélateur de l'efficacité des opérations de N&D.

#### b) Seuils

L'objectif des experts est de proposer des éléments pour un protocole visant à vérifier que la charge d'une population bactérienne, reflet d'une contamination fécale résiduelle, est inférieure à un certain seuil (considéré comme seuil d'alerte), après les opérations de N&D. La détermination d'un seuil est donc nécessaire et dépend de la méthode de prélèvement utilisée (empreinte gélosée ou frottis) et, plus largement, du protocole mis en place pour réaliser ces prélèvements. Scientifiquement, un seuil doit être défini pour chaque méthode de prélèvement et le protocole associé puisque, comme indiqué *supra*, ces types de méthodes ne dénombrent pas la même chose.

- Limites méthodologiques

Il convient de rappeler ici l'absence de données bibliographiques pertinentes, relatives à cette question du contrôle de l'application des opérations de N&D des moyens de transport de volailles vivantes. L'approche statistique des experts, pour élaborer leurs propositions de seuil, repose donc exclusivement sur les données fournies par les professionnels. Or, les résultats des professionnels sont majoritairement obtenus à partir d'empreintes gélosées, un seul établissement ayant utilisé des chiffonnettes. Les données sont donc très insuffisantes pour pouvoir proposer un seuil pour chacune des méthodes.

Cependant, il apparaît que ces résultats d'analyses des professionnels après N&D sont similaires et il ne semble donc pas au vu de ces cinq séries de résultats que les deux méthodes de prélèvement impactent significativement la distribution des résultats après N&D. Ceci peut s'expliquer par le fait que la méthode de prélèvement a probablement moins d'impact sur la variabilité des résultats que l'application correcte ou non du protocole de N&D et que la variabilité intrinsèque des surfaces prélevées.

En conclusion, les données scientifiques et de terrain sont aujourd'hui insuffisantes pour pouvoir proposer un seuil après N&D pour chacune des méthodes de prélèvement et des protocoles associés.

Pour répondre à l'attente des gestionnaires, et compte tenu des observations présentées ci-dessus, les experts, à l'exception<sup>4</sup> d'un membre du Groupe de travail (GT) et d'un membre du CES, ont convenu de proposer un seul seuil d'alerte, utilisable avec les deux méthodes de prélèvement et les protocoles associés, sur la base des quelques résultats de terrain. Ils soulignent néanmoins la forte incertitude liée à cette détermination. Ce seuil d'alerte, indicatif, aurait une finalité pédagogique. Malgré toutes ses limites et l'absence de signification scientifique rigoureuse, il poserait des jalons et mènerait les opérateurs et les autorités de contrôle à s'interroger sur l'efficacité des pratiques de N&D en cas de résultat défavorable répété (soit supérieur au seuil de manière répétée, soit absence de culture répétée, ce qui peut également conduire à s'interroger sur la méthode utilisée). A travers les investigations conduites, suite aux résultats de ces contrôles, des données supplémentaires pourraient être récoltées et ces premières estimations des experts devraient être ensuite affinées, avec l'analyse de ces historiques plus nombreux.

Afin de compléter ces historiques, les experts soulignent l'intérêt de mettre en place des enquêtes microbiologiques sur le terrain, avec des modalités d'échantillonnage définies sur un certain nombre de camions sortant d'abattoir et des stations de N&D, pour pouvoir apprécier la situation et combler le manque actuel de données. Ces enquêtes devraient impérativement recenser l'ensemble des précisions relatives à l'application des procédures de N&D, des techniques de prélèvement et du protocole associé (détail précis des conditions opératoires, non seulement au moment des prélèvements mais aussi lors de la prise en charge de l'échantillon [neutralisant, milieu de culture utilisés, ...]).

- Définition du seuil

Si l'on admet qu'il y a beaucoup d'entérocoques intestinaux avant les opérations de N&D et qu'il en reste peu après application correcte de ces opérations de N&D, il est possible de définir

---

<sup>4</sup> Un expert du GT a émis une opinion divergente, considérant qu'au regard de la variabilité des protocoles de prélèvement, il n'était pas possible de définir scientifiquement un seuil unique. Son opinion divergente est explicitée à l'Annexe 2 du présent Avis. Un expert du CES s'est rallié à la position de ce dernier.

un seuil après N&D. Au regard de la forte variabilité des résultats liée aux zones prélevées, techniques de prélèvement, méthodes d'analyse, ce seuil doit permettre de discriminer deux distributions statistiques différentes (avant et après N&D)<sup>5</sup>.

Les résultats obtenus par les professionnels<sup>6</sup> avec des chiffonnettes montrent que les entérocoques intestinaux sont facilement retrouvés sur les surfaces en contact avec les animaux (cages, containers, plateau de camion) à des concentrations de l'ordre de  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Les procédures de N&D semblent pouvoir provoquer un abattement d'environ 4 log et leur concentration résiduelle serait alors inférieure à 1 UFC/cm<sup>2</sup>.

Le seuil de non-conformité utilisé par les professionnels de 50 UFC/boîte soit environ 2 UFC/cm<sup>2</sup> semble pertinent. Les données des professionnels montrent que ce seuil est généralement respecté dans 75 à 95 % des cas sur les contrôles effectués après N&D.

#### **3.4.4. Le nombre de prélèvements**

La réalisation de cinq prélèvements pour chacun des points de contrôle stratégiques semble raisonnable, et correspond respectivement à cinq prélèvements sur des cages/caisses différentes, et à cinq prélèvements sur véhicules (roues, hayon, bas de caisse, plateau). Cette procédure permet de répartir les prélèvements sur différentes surfaces critiques et de prendre éventuellement en compte une certaine variabilité dans l'efficacité du protocole de N&D.

Un plan à trois classes pourrait être défini pour intégrer une tolérance sur la présence de résultats supérieurs au seuil de non-conformité comme cela est classiquement réalisé sur les critères d'hygiène des procédés en microbiologie des aliments (du type  $n=5$  et  $c=2$ )<sup>7</sup>. Ces critères s'appuient sur deux limites :  $m$  qui correspondrait à une concentration en micro-organismes satisfaisante, et  $M$  (généralement égale à 10 fois  $m$ ) qui dénoterait une hygiène insatisfaisante. La maîtrise de l'hygiène serait considérée satisfaisante lorsque les  $n$  résultats (en général,  $n=5$ ) sont inférieurs à  $m$  ; elle serait acceptable lorsqu'au maximum  $c$  (en général  $c=2$ ) résultats sont compris entre  $m$  et  $M$ , et l'hygiène serait insatisfaisante lorsqu'un ou plusieurs résultats sont  $> M$  ou lorsque plus de  $c$  résultats se situent entre  $m$  et  $M$ .

Ce nombre de prélèvements peut être ajusté en fonction des objectifs du plan de contrôle. Il peut être réduit au profit d'une surveillance plus fréquente dans le cadre d'une vérification des procédures sur une longue période ou, à l'inverse, être augmenté s'il s'agit de contrôler ponctuellement une procédure avec un haut niveau de confiance.

Par ailleurs, un prélèvement peut également être réalisé à l'intérieur de la cabine du camion (pédale ou volant), ou à l'extérieur du camion (marche-pieds) à titre indicatif et à des fins de sensibilisation.

#### **3.4.5. L'audit des pratiques des opérations de N&D**

Le caractère indicatif du protocole proposé ci-avant par les experts et notamment du seuil en UFC de l'indicateur bactérien, ne permettrait pas de le considérer comme un élément de

<sup>5</sup> Principe régulièrement utilisé en microbiologie des aliments, sur des résultats également très variables en flores indicatrices d'hygiène, des écarts-types d'environ 1 log étant classiquement observés sur des aliments fabriqués dans des conditions pourtant homogènes

<sup>6</sup> Ces résultats ont été transmis de manière confidentielle aux experts du GT, au travers de l'AST.

<sup>7</sup>  $n$  = nombre d'unités constituant l'échantillon et  $c$  = nombre maximum d'unités (parmi les  $n$ ) dont la concentration peut se situer entre  $m$  et  $M$ .

contrôle officiel ayant un caractère réglementaire et pouvant conduire à lui seul à appliquer des sanctions. Comme indiqué *supra*, le protocole proposé constitue un outil didactique, posant des jalons aux professionnels, pour que contrôleurs et contrôlés puissent se poser des questions en cas de résultats défavorables répétés ou d'absence de culture répétée (prélèvement inopérant), appliquer en conséquence des mesures correctives sur les opérations de N&D et/ou réexaminer la méthode de prélèvement appliquée.

Face à cette proposition incomplète au regard de la question initialement posée par la saisine, le gestionnaire peut alternativement décider d'opter pour un système de contrôle uniquement basé sur l'audit individuel des sites concernés par les opérations de N&D des moyens de transport des volailles vivantes. En effet, chaque site ayant à valider son procédé de N&D, un protocole d'autocontrôle est mis en place à son niveau. Ce protocole, propre au site, peut atteindre un certain niveau de standardisation interne au site, par la formation des opérateurs en charge de l'appliquer. Dans ce contexte, un seuil d'alerte, spécifique au site, est défini sur la base de l'historique des données collectées au fil du temps au moyen des cartes de contrôle. L'audit par les autorités visera alors à analyser :

- comment ont été effectuées les procédures de N&D et sur quelles matrices,
- comment a été construit le protocole d'autocontrôle des opérations de N&D,
- comment a été défini le seuil d'alerte spécifique au site,
- comment sont gérées les actions correctives en cas de dépassement de ce seuil d'alerte interne.

Ce contrôle par l'audit, étant spécifique à chaque site, permet de s'abstraire de la difficulté méthodologique liée à la définition d'un protocole unique de contrôle, avec critère microbiologique unique, dans un contexte de diversité majeure, déjà soulignée *supra*.

Ce type de contrôle présente en revanche des inconvénients en termes d'importance des moyens humains, tant quantitatifs que qualitatifs, pour être correctement mis en œuvre dans les filières considérées.

Il présente également l'inconvénient de ne pas proposer de jalon didactique pour les professionnels, qui fixent eux-mêmes leur seuil d'alerte.

### **3.5. Incertitudes**

Au cours de l'expertise, le Groupe de travail a relevé différentes sources d'incertitude, qui ont un impact sur la réponse apportée. Elles sont reprises dans le tableau I ci-après.

**Tableau 1 : sources d'incertitude relevées au cours de l'expertise**

Liste des sources d'incertitude	Description de la source d'incertitude	Modalité de traitement de l'incertitude (le cas échéant) par le GT
<b>Cadrage, Formulation de la question</b>		
<p>Signification des termes de la saisine « <i>contrôle de l'efficacité des opérations de N&amp;D des moyens de transport d'oiseaux vivants vis-à-vis du risque influenza aviaire</i> ».</p>	<p>Contrôler l'efficacité des opérations de N&amp;D vis-à-vis du risque IA supposerait de disposer de moyens de contrôle permettant de dénombrer la charge résiduelle en virus IA suite aux opérations de N&amp;D, ou de disposer d'un index bactérien dont la présence après N&amp;D pourrait être corrélée à celle des virus IA. Or aucune de ces options n'est aujourd'hui possible.</p> <p>Dans ce contexte, pour valider leur procédé de décontamination, les opérateurs peuvent adopter différents protocoles de contrôles, avec notamment différents indicateurs et critères de réduction. Le GT souligne donc la difficulté de proposer un protocole unique pour le contrôle microbiologique de l'efficacité des opérations de N&amp;D par les autorités, face à cette diversité des protocoles chez les opérateurs.</p>	<p>Le GT a donc été amené à reformuler la question de la saisine : « <i>contrôle de l'efficacité de l'application des opérations de N&amp;D, visant à contrôler la charge résiduelle d'une population bactérienne indicatrice</i> ».</p> <p>Le GT a souligné le risque de discordance entre les résultats des autocontrôles d'un opérateur et ceux des autorités de contrôle, susceptibles de reposer sur un autre indicateur et d'autres protocoles de prélèvements.</p>

<b>Choix des méthodes de prélèvement (boîte contact / chiffonnette)</b>		
Disponibilité hétérogène des données sur les méthodes de prélèvement utilisées dans le contexte visé par la saisine.	Les données recueillies au travers de l'AST sont plus abondantes pour la méthode de prélèvement par boîte contact que par chiffonnette. Il est alors impossible de comparer les 2 méthodes, quant à leur capacité à mieux révéler l'état sanitaire d'une surface après N&D.	Le GT n'a pas été en capacité scientifique de privilégier une méthode par rapport à l'autre. Il a donc rappelé les avantages et inconvénients de chacune.
Impact de l'existence de biofilms sur le résultat du contrôle.	L'adhésion des bactéries aux surfaces, au sein des biofilms, réduit la sensibilité des contrôles, d'une manière variable et non connue.	Cette incertitude est intrinsèque à tout contrôle d'hygiène des surfaces et les méthodes de prélèvement y apportent une réponse variable selon les applicateurs. Cette incertitude s'ajoute à la précédente, conduisant le GT à ne pouvoir présenter que les avantages et inconvénients de chaque méthode.
<b>Choix de l'indicateur bactérien</b>		
Hétérogénéité des données de terrain en matière de charge résiduelle des populations microbiennes après N&D, selon l'indicateur choisi.	Les données recueillies au travers de l'AST sont plus abondantes pour les entérocoques intestinaux, en ce qui concerne la mesure de la charge résiduelle après N&D, que pour les entérobactéries. Dans la mesure où le protocole de contrôle est basé sur la quantification d'une charge résiduelle d'une population bactérienne indicatrice, à comparer à un seuil à définir, il n'a pas été possible au GT de proposer de tels éléments pour les entérobactéries.	Le protocole complet défini par le GT est donc basé sur les entérocoques intestinaux, en l'absence de données suffisantes pour les entérobactéries. Les experts ont néanmoins pu étayer ce choix par des arguments complémentaires relatifs à la pertinence des entérocoques vis-à-vis du contexte visé par la saisine, ainsi qu'à leur résistance sur les surfaces. Ces arguments complémentaires limitent donc l'incertitude sur la pertinence du protocole proposé.
<b>Seuil après N&amp;D</b>		

Manque de données permettant de définir un seuil pour chaque méthode de prélèvement

En l'absence de données bibliographiques pertinentes, relatives à cette question du contrôle de l'application des opérations de N&D des moyens de transport de volailles vivantes, l'approche statistique du GT pour élaborer ses propositions de seuil, repose donc exclusivement sur les données fournies par les professionnels.

Or, les résultats des professionnels sont majoritairement obtenus à partir d'empreintes gélosées, un seul établissement ayant utilisé des chiffonnettes. Les données sont donc très insuffisantes pour pouvoir proposer un seuil pour chacune des méthodes.

La prise en compte des différentes sources de variabilité identifiées conduit le GT à souligner que le contrôle le plus pertinent, pour vérifier la bonne application des opérations de N&D des moyens de transport de volailles vivantes, serait un audit des opérateurs basé sur le contrôle des principes HACCP.

Au regard de la question posée par la saisine, qui demande un protocole de contrôle microbiologique avec un critère d'hygiène défini, le GT, à l'exception d'un expert, a convenu de proposer des éléments pour ce protocole, y compris sur le seuil d'alerte<sup>8</sup>, sur la base des quelques données fournies par les opérateurs.

L'incertitude liée à cette détermination est en partie diminuée par le fait que les résultats d'analyses des professionnels après N&D sont similaires et qu'il ne semble pas que les deux méthodes de prélèvement impactent significativement la distribution des résultats après N&D.

Ces recommandations devront néanmoins être consolidées à l'avenir avec l'analyse d'historiques plus nombreux.

#### Nombre de prélèvements

<sup>8</sup> Un expert du GT a émis une opinion divergente, considérant qu'au regard des sources d'incertitude et de variabilité, seul l'audit des opérateurs basé sur le contrôle des principes HACCP était possible. Son opinion divergente est explicitée à l'Annexe 2 du présent Avis.



Plan d'échantillonnage

Un effectif de cinq analyses est proposé pour les échantillons destinés à évaluer l'application correcte des procédures de N&D. Ce nombre a été retenu par analogie avec les plans d'échantillonnage classiquement utilisés en microbiologie des aliments. Ces plans sont "historiques", ils ont permis d'améliorer l'hygiène des aliments mais les arguments statistiques permettant de justifier le recours à cinq analyses ne sont pas précisés dans la réglementation.

Une expertise précise de ce plan d'échantillonnage nécessiterait l'acquisition de nombreuses données en situation d'application correcte des procédures de N&D et en situation de mauvaise application afin d'identifier le test statistique (plan d'échantillonnage) le plus adapté pour conclure à la bonne ou mauvaise application des protocoles de N&D avec des risques d'erreur connus.

En l'absence de ces données, le rapport d'AST indique que les études scientifiques comprennent cinq à douze échantillons par point de contrôle afin de documenter la variabilité des résultats. Plusieurs études ont suggéré que quatre à cinq prélèvements par surface constituent un compromis acceptable entre qualité de l'information obtenue et contraintes de mises en application et de coût (Burton *et al.* (2004) pour les caisses de transport ; Drouin et Toux (1985) et Luyckx *et al.* (2014) en élevage).

### 3.6. Conclusions et recommandations du GT IA HP et du CES SABA

#### 3.6.1. Conclusions du GT IA HP et du CES SABA

Compte tenu des limites techniques précédemment identifiées et analysées, les experts n'ont pas été en mesure de répondre exactement à la question d'un contrôle de l'efficacité des opérations de N&D au regard du risque influenza aviaire. Ils ont ainsi proposé de restreindre le champ de la question au contrôle de l'efficacité de l'application des opérations de N&D.

Dans ce cadre, les experts ont souligné la diversité des situations pouvant être recensées auprès des opérateurs qui, pour valider et autocontrôler leur procédé de N&D, appliquent des techniques de prélèvements et des protocoles associés diversifiés. La prise en compte des différentes sources de variabilité ainsi identifiées a conduit les experts à souligner que le contrôle le plus pertinent, pour vérifier la bonne application des opérations de N&D des moyens de transport de volailles vivantes, serait un audit des opérateurs basé sur le contrôle des principes HACCP.

Au regard de la question posée par la saisine, qui demande un protocole de contrôle microbiologique avec un critère d'hygiène défini, les experts ont convenu de proposer également des éléments pour ce protocole, sur la base des quelques données fournies par les opérateurs.

Les incertitudes associées à cette évaluation ont été précisément décrites. Elles soulignent le caractère indicatif que devraient revêtir ces éléments de protocole de contrôle, dans l'attente de l'analyse d'historiques plus nombreux.

Les experts ont rappelé à cet égard qu'un contrôle des opérations de N&D ne saurait être basé sur un seul critère. Il doit reposer sur la prise en compte concomitante de plusieurs éléments : le contrôle visuel, le contrôle documentaire, le contrôle de la validation du procédé de N&D de l'opérateur, un contrôle microbiologique au moyen d'un indicateur.

Ainsi, à ce stade des connaissances, et soulignant les avantages et inconvénients de chaque option, deux options de gestion peuvent être envisagées :

1. Un contrôle basé uniquement sur la mise en œuvre d'un audit individuel des sites concernés par les opérations de N&D des moyens de transport des volailles vivantes.

L'audit par les autorités visera alors à analyser :

- comment ont été effectuées les procédures de N&D, avec quel produit (il doit être virucide) et sur quelles matrices,
- comment a été construit le protocole d'autocontrôle des opérations de N&D,
- comment a été défini le seuil d'alerte spécifique au site,
- comment sont gérées les actions correctives en cas de dépassement de ce seuil d'alerte interne.

Ce contrôle par l'audit, étant spécifique à chaque site, permet de s'abstraire de la difficulté méthodologique liée à la définition d'un protocole unique de contrôle, avec critère microbiologique unique, dans un contexte de diversité importante, déjà soulignée *supra*.

Ce type de contrôle présente en revanche des inconvénients en termes d'importance des moyens humains, tant quantitatifs que qualitatifs, pour être correctement mis en œuvre dans les filières considérées.

Il présente également l'inconvénient de ne pas proposer de jalon didactique pour les professionnels, qui fixent eux-mêmes leur seuil d'alerte.

## 2. L'application d'un critère microbiologique

Sur la base des quelques données disponibles, les experts, à l'exception de deux d'entre eux<sup>9</sup>, ont considéré que le dénombrement des entérocoques intestinaux, avec un seuil d'environ 2 UFC/cm<sup>2</sup> (soit 50 UFC/boîte contact<sup>10</sup>), serait pertinent pour refléter la bonne application d'une procédure de N&D. Ce seuil est basé sur une approche rendue imprécise du fait du peu de données disponibles. Cette première approche sera à affiner avec l'analyse d'historiques plus nombreux.

La réalisation de cinq prélèvements pour chacun des points de contrôle stratégiques (cinq prélèvements sur des cages/caisses différentes, cinq prélèvements sur véhicules (roues, hayon, bas de caisse, plateau) semble raisonnable en prenant en compte une certaine variabilité dans l'efficacité du protocole de N&D (plan à trois classes). Enfin, un prélèvement ponctuel supplémentaire sur des surfaces « moins exposées » (cabine ou marche-pied du camion par exemple) permet de maintenir la vigilance des opérateurs et de vérifier qu'elles ne peuvent pas être sources de recontamination d'un élevage, *via* le vecteur passif humain.

Les experts n'ont pas été en capacité de recommander une technique de prélèvement plutôt qu'une autre, chacune présentant des avantages et des inconvénients. Au vu des techniques disponibles, le choix de la méthode de prélèvement devra être fait au regard de l'ensemble des avantages et des limites d'application et d'interprétation qu'elle présente, en fonction des types de surfaces à contrôler.

Les experts souhaitent enfin rappeler que le contrôle microbiologique est une étape complémentaire à réaliser uniquement si le nettoyage a été préalablement jugé satisfaisant visuellement.

Ce critère microbiologique présente l'avantage de constituer un indicateur d'alerte pour les professionnels, conduisant les opérateurs et les autorités de contrôle à s'interroger sur les pratiques de N&D en cas de résultat défavorable répété ou d'absence de culture répétée, à appliquer en conséquence des mesures correctives sur les opérations de N&D et/ou réexaminer la méthode de prélèvement appliquée. Le seuil d'alerte indicatif, proposé avec ce critère microbiologique, aurait une finalité pédagogique.

Il permettrait également, à travers les investigations conduites suite aux résultats de ces contrôles, de produire des données supplémentaires qui conduiraient à affiner ces premières propositions des experts, avec l'analyse de ces historiques plus nombreux.

Ce critère microbiologique présente toutefois l'inconvénient de n'avoir qu'un caractère indicatif, notamment du fait de la définition d'un seul seuil en UFC de l'indicateur bactérien, quel que soit le protocole de prélèvement. Ces limites et l'absence de validation à grande échelle de ce seuil ne permettraient pas de le considérer comme un élément de contrôle officiel, ayant un caractère réglementaire et pouvant conduire

<sup>9</sup> Un expert du GT a émis une opinion divergente, considérant qu'au regard des sources d'incertitude et de variabilité, seul l'audit des opérateurs basé sur le contrôle des principes HACCP était possible. Son opinion divergente est explicitée à l'Annexe 2 du présent Avis. Un expert du CES s'est rallié à la position de ce dernier.

<sup>10</sup> Conversion à faire pour un prélèvement par chiffonnette ou écouvillon

à lui seul à appliquer des sanctions. Les experts ont en particulier noté le risque de discordance entre les résultats des autocontrôles d'un opérateur et ceux des autorités de contrôle, susceptibles de reposer sur un autre indicateur, ce qui pourrait conduire à un audit de l'opérateur pour caractériser la nature de l'écart constaté.

### **3.6.2.Recommandations du GT IA HP et du CES SABA**

Si le critère microbiologique (seuil d'alerte indicatif) est appliqué par les autorités, compte tenu des incertitudes relevées au cours de cette expertise, les experts souhaitent émettre un certain nombre de recommandations :

- les autorités devraient tracer et collecter l'ensemble des situations où leurs contrôles révèlent un dépassement du critère d'hygiène proposé, alors que l'ensemble des autocontrôles de l'opérateur sont favorables. L'accumulation de ces relevés contribuera à améliorer le dispositif ;
- de même, les situations où les résultats de contrôle témoignent de l'absence de culture répétée (prélèvement inopérant), doivent conduire à s'interroger sur la méthode utilisée et peuvent contribuer à affiner les éléments du protocole proposé ;
- les experts soulignent l'importance de réaliser des enquêtes microbiologiques sur le terrain avec des modalités d'échantillonnage définies sur un certain nombre de camions sortant d'abattoir et des stations de N&D, pour pouvoir apprécier la situation et combler le manque actuel de données ;
- compte tenu du caractère indicatif des éléments de protocole de contrôle proposés, le constat de dépassement du critère d'hygiène lors d'un contrôle officiel, devrait mener à doubler celui-ci d'un audit des opérations de N&D chez l'opérateur concerné. Les mesures correctives possibles dans ce contexte seraient la révision du protocole de N&D ;
- en cas d'épizootie, il serait également intéressant de rechercher, après opération de N&D, à la fois le virus IA par PCR et la contamination bactérienne résiduelle pour essayer d'établir d'éventuels éléments de corrélation. Dans ce domaine, les experts recommandent de poursuivre les recherches sur la détermination d'un « proxy » pour les virus IA, afin de minimiser les incertitudes portant sur ces contrôles des opérations de N&D ;
- compte tenu du manque de connaissances sur les caractéristiques intrinsèques comparées des techniques de prélèvement, les experts recommandent de mener une étude comparative entre les techniques de prélèvement par empreinte gélosée (boîte contact) et celles par frottis (écouvillons, chiffonnettes) ;
- chacune d'entre elles présentant des avantages et des inconvénients, il serait nécessaire d'encourager la mise au point et le développement de méthodes de prélèvement qui puissent mesurer avec plus de précision les charges bactériennes résiduelles voire le développement à l'avenir de méthodes permettant d'évaluer la charge virale ;
- les boîtes de contact pour empreinte gélosée et les milieux de dilution des chiffonnettes ou écouvillons doivent avoir un certificat de contrôle de la qualité, notamment vis-à-vis de leur capacité à neutraliser les résidus de désinfectants présents sur les surfaces, évitant ainsi des phénomènes de bactériostase, donnant *in fine* de faux résultats négatifs.

De manière générale,

- il est nécessaire d'encourager la mise au point et le développement de matériels plus adaptés aux opérations de N&D (surfaces planes, moins de recoin dans les cages, etc), ainsi que la recherche technique sur des matériaux innovants sur lesquels les micro-organismes ne se fixent pas ;
- les experts rappellent que les opérations de N&D doivent être réalisées en respectant les recommandations d'utilisation des détergents et désinfectants préconisées par les fabricants (délai d'action, temps de contact, dose, respect du temps de séchage, etc ...).
- enfin, les experts soulignent l'intérêt d'une harmonisation des procédures de N&D entre les professionnels afin de faciliter les modalités des contrôles officiels.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions et recommandations du GT IA HP et du CES SABA relatives à la demande d'appui scientifique et technique sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transport d'oiseaux vivants vis-à-vis du risque d'influenza aviaire.

Dr Roger Genet

## MOTS-CLES

Volaille, nettoyage, désinfection, transport, influenza aviaire

## BIBLIOGRAPHIE

### Publications

Afssa (2008) RECOMMANDATIONS POUR L'ELABORATION DE CRITERES MICROBIOLOGIQUES D'HYGIENE DES PROCEDES. MIC2008sa0083Ra

OMS (2000) Directives de qualité pour l'eau de boisson ; volume 2 – critères d'hygiène et documentation à l'appui. Organisation mondiale de la Santé, 2e édition, 1050 p.

Asséré, A., Oulahal, N., Carpentier, B., 2008. "Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying". *Journal of Applied Microbiology* 104, 1692–1702.

Burton, C.H, Whyte, R.T., Allen, V.M., Tinker, D.B. 2004. "Reducing microbial contamination from poultry transport crates by improved cleaning and disinfection systems based on better water use". Silsoe Research Institute, University of Bristol, Report, 205 p.

Drouin, P. et Toux, J.-Y., 1985. «Méthode bactériologique pour apprécier la désinfection des poulaillers». *Bulletin d'Information de la Station Expérimentale d'Aviculture de Ploufragan* 25, 176-178.

Huneau- Salaun, A., Scoizec, A., Thomas, R., Le Bouquin, S. 2017. «Efficacité de la décontamination des caisses et des véhicules de transport de canard: observations de terrain durant l'épizootie d'influenza aviaire H5N8 en France en 2017». *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 80 (1).

Leclerc H, Devriese, LA, Mossel, DAA (1996) "Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water". *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 459-466.

Luyckx, K., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J, Verveat, E., Heyndrickx, M., De Reu; K. 2014. "Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses." *Poultry Science* 94, 740-749.

Midelet, G., Carpentier, B., 2002. "Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef". *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4015.

Législation et réglementation

Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex:32005R2073>

Instruction technique DGAL/SDSPA/2018-207

## **ANNEXE 1**

### **Présentation des intervenants**

**PRÉAMBULE** : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

#### **GROUPE DE TRAVAIL GT IAHP**

---

##### **Présidente**

Mme Barbara DUFOUR – Professeur, ENV Alfort (maladies contagieuses, épidémiologie générale, évaluation de risques)

##### **Membres**

M. Olivier DEHORTER – Ingénieur de recherches, Muséum National d'Histoire Naturelle (ornithologie, avifaune)

M. Guillaume FOURNIÉ – Enseignant chercheur, Royal Veterinary College (évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie)

M. Jean-Pierre GANIÈRE – Professeur émérite, Oniris Nantes (maladies contagieuses, réglementation, zoonoses)

M. Matthieu GUILLEMAIN – Ingénieur, Office national de la chasse et de la faune sauvage (unité avifaune migratrice)

M. Gérard GUY – Ingénieur chargé d'expérimentation retraité, INRA Bordeaux-Aquitaine (zootéchnie aviaire)

M. Jean HARS – Unité sanitaire de la faune – maladies transmissibles, Office national de la chasse et de la faune sauvage (pathologie de la faune sauvage libre, épidémiologie)

M. Hervé JUIN – Ingénieur de recherches, INRA Centre Poitou-Charentes (zootéchnie aviaire)

Mme Véronique JESTIN – Ex-directrice de recherche et ex-responsable d'unité et du Laboratoire National de Référence Influenza aviaire, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (virologie, infectiologie, pathologie aviaire, vaccinologie, méthodes de diagnostic, analyse de risque)

Mme Sophie LE BOUQUIN – Responsable de l'unité Epidémiologie et Bien-être en Aviculture et Cuniculture, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (épidémiologie, filière avicole, santé publique vétérinaire)

M. Daniel MARC- Vétérinaire chargé de recherche, INRA Centre Val de Loire (virologie influenza aviaire)

M. Pierre MARIS – Ex-directeur adjoint et référent Biocide, Anses Laboratoire de Fougères

M. Eric NIQUEUX – Responsable du Laboratoire National de Référence Influenza aviaire et maladie de Newcastle, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (virus IA H5 HP et FP, virologie aviaire)



Mme Sylvie VAN DER WERF – Responsable du Centre National de Référence des virus *influenzae* (grippe), Institut Pasteur (virus influenza, santé humaine)

#### **RAPPORTEURS**

---

M. Jean Christophe AUGUSTIN– Professeur ENVA (Microbiologie prévisionnelle, plans échantillonnage)

M. Olivier FIRMESSE – Responsable de l'équipe Clostridies, unité SBCL (Staphylococcus, Bacillus et Clostridies)- Anses (Microbiologie et hygiène des surfaces)

M. Jean Luc GUERIN – ENVT (Compétences en pathologie des volailles et lagomorphes, immunologie, virologie, zoonose et santé publique).

Mme Adeline SALAÛN- HUNEAU – Epidémiologiste, unité EBEAC (Unité épidémiologie et bien-être avicole et cunicole) – Anses Ploufragan (Epidémiologie)

#### **COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ SANTE ET BIEN-ETRE DES ANIMAUX**

---

Les travaux, objets du présent rapport, ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES SABA du 23 aout 2018

#### **Président**

M. Etienne THIRY – Faculté de médecine vétérinaire de Liège (BE) – Compétences en virologie, immunologie.

#### **Membres**

Mme Suzanne BASTIAN – ONIRIS Nantes – Compétences en épidémiologie, bactériologie, parasitologie.

Mme Catherine BELLOC - ONIRIS Nantes – Compétences en Médecine des animaux d'élevage, monogastriques.

M. Alain BOISSY – INRA – Compétences en éthologie, bien-être animal, ruminants, zootechnie.

M. Jordi CASAL - Universitat Autònoma de Barcelona (ES) – Compétences en zoonose, épidémiologie quantitative, maladies animales exotiques, analyse quantitative des risques.

M. Christophe CHARTIER – ONIRIS Nantes – Compétences en parasitologie, pathologie des petits ruminants, technique d'élevage, épidémiologie.

M. Eric COLLIN – Vétérinaire praticien – Compétences en pathologie des ruminants.

M. Frédéric DELBAC – CNRS – Compétences en abeilles, épidémiologie, parasitologie, microbiologie.

Mme Barbara DUFOUR – ENV Alfort – Compétences en épidémiologie, maladies infectieuses, pathologie des ruminants.

M. Guillaume FOURNIÉ - Royal Veterinary College (UK) – Compétences en évaluation des risques quantitative et qualitative, modélisation, épidémiologie.

M. Jean-Pierre GANIÈRE – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, règlementation, zoonoses.

M. Dominique GAUTHIER - Laboratoire départemental 05 – Compétences en faune sauvage, lagomorphes, méthodes de diagnostic.

M. Etienne GIRAUD – INRA – Compétences en antibiorésistance, environnement, approche globale de la santé animale.

M. Jacques GODFROID - Université Arctique de Norvège (NO) – Compétences en évaluation des risques, zoonose, épidémiologie, tuberculose, bactériologie, faune sauvage marine.

M. Jean-Luc GUÉRIN – ENVT – Compétences en pathologie des volailles et lagomorphes, immunologie, virologie, zoonose et santé publique.

M. Jean GUILLOTIN – Laboratoire départemental 59 – Généraliste, compétences en méthodes de diagnostic, porcs, faune sauvage.

Mme Nadia HADDAD – Anses UMR BIPAR, ENV Alfort – Compétences en microbiologie, épidémiologie, maladies contagieuses.

M. Jean HARS – Office national de la chasse et de la faune sauvage – Compétences en pathologie de la faune sauvage libre, épidémiologie.

Mme Véronique JESTIN – Ex-directrice de recherche et ex-responsable d'unité et du Laboratoire National de Référence Influenza aviaire, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané - virologie, infectiologie, pathologie aviaire, vaccinologie, méthodes de diagnostic, analyse de risque.

Mme Elsa JOURDAIN – INRA – Compétences en zoonoses, épidémiologie quantitative, faune sauvage.

Mme Claire LAUGIER – CGAAER – Compétences en pathologie équine, diagnostic de laboratoire.

Mme Monique L'HOSTIS – Ex-Professeur à Oniris – Généraliste, compétences en parasitologie, abeilles, faune sauvage.

Mme Coralie LUPO – IFREMER – Compétences en épidémiologie, pathologies aviaire et aquacole.

M. Gilles MEYER – ENV Toulouse – Compétences en pathologie des ruminants, virologie.

M. Pierre MORMÈDE – INRA Toulouse – Compétences en génétique du stress, endocrinologie, bien-être animal.

Mme Carine PARAUD – Anses – Compétences en statistiques, pathologie des petits ruminants, parasitologie de terrain.

Mme Claire PONSART – Anses – Compétences en épidémiologie, bactériologie, statistiques, virologie, pathologie de la reproduction.

Mme Nathalie RUVOEN – ONIRIS Nantes – Compétences en maladies contagieuses, zoonoses, réglementation

M. Claude SAEGERMAN – Faculté de médecine vétérinaire de Liège – Compétences en épidémiologie, maladies contagieuses, maladies émergentes.

M. Stéphan ZIENTARA – Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort – Compétences en virologie.

## **PARTICIPATION ANSES**

---

### **Coordination scientifique**

Mme Justine CORRE – Coordinatrice scientifique d'expertise, unité Evaluation des risques liés à la Santé, à l'Alimentation et au Bien-être des animaux – Anses

Mme Charlotte DUNOYER – Cheffe de l'unité Evaluation des risques liés à la Santé, à l'Alimentation et au Bien-être des animaux – Anses

**Contribution scientifique/ AST**

Mme Adeline Huneau-Salaün, Epidémiologiste, unité Epidémiologie et Bien-être en Aviculture et Cuniculture, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

Mme Sophie Le Bouquin, Responsable de l'unité Epidémiologie et Bien-être en Aviculture et Cuniculture, Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

**Secrétariat administratif**

M. Régis MOLINET – Anses

## ANNEXE 2 : EXPRESSION D'UNE OPINION DIVERGENTE

Dans le cadre de la validation des procédures de nettoyage et désinfection puis du suivi, au quotidien, de la bonne application de ces mêmes procédures, l'utilisation des méthodes de contrôle microbiologique des surfaces sont d'un intérêt indéniable. En outre, elles présentent un intérêt pédagogique évident, peuvent être employées à des fins de recherche d'un réservoir microbien d'intérêt, permettent d'évaluer l'effet de modifications de tout ou partie des éléments de ces procédures, enfin d'être mise en œuvre dans l'objectif de suivi de la contamination d'une zone spécifique d'un site industriel donné.

Dans ce rapport, les avantages et inconvénients, et limites dans l'utilisation de ces méthodes sont bien cernés. En effet, aujourd'hui, deux catégories de techniques de prélèvements sont majoritairement rencontrées sur le terrain : les techniques dites « d'empreintes » (lames gélosées, boîtes de type Rodac) et les techniques des frottis (écouvillons, lingettes).

Une difficulté majeure, commune à ces deux catégories de techniques, tient au fait que lorsqu'il est réalisé, sur une même surface (ex : 20 cm<sup>2</sup> pour les boîtes ou davantage pour les frottis), une seule empreinte ou un seul frottis, le rendement de récupération des micro-organismes à partir de ces surfaces est très variable et peut aller de 5 – 10% à 80 – 90%, et qu'il faudrait multiplier ces empreintes et frottis pour espérer récupérer la totalité des micro-organismes initialement présents. Au final, la contamination totale n'est jamais connue.

Par ailleurs, il est connu que ces différentes méthodes sont :

- Technique-dépendantes,
- Protocole-dépendantes,
- Opérateur-dépendantes,
- Surface-dépendantes,
- Espèces bactériennes-dépendantes.

Ces quelques commentaires préliminaires conduisent tout naturellement aux conclusions suivantes :

- (1) Selon le type de catégorie de techniques de prélèvements retenu nous ne dénombrons pas la même chose : les techniques des empreintes fournissent une image de la contamination présente sur une surface donnée, chaque colonie représentant soit un agrégat bactérien, soit une particule porteuse d'un plus ou moins grand nombre de cellules bactériennes dont le nombre est indéfinissable - les techniques de frottis, par le passage du prélèvement dans un liquide de survie des micro-organismes, permettent d'envisager une dispersion du prélèvement et par voie de conséquences à une colonie correspondra une cellule bactérienne prélevée.
- (2) Comme il n'existe pas, aujourd'hui, de protocole unique standardisé, inévitablement une grande variabilité dans les résultats est attendue, du fait au départ de la grande diversité et du grand nombre d'opérateurs mettant en œuvre ce type de prélèvements. Cette variabilité amplifiée n'est pas simplement due au choix de l'une ou l'autre des techniques de prélèvements, mais aussi aux conditions d'application de ces techniques, des traitements que subissent ces prélèvements, du choix des milieux de cultures, sans oublier le choix des neutralisants du désinfectant résiduel, ces derniers pouvant également agir sur la cultivabilité de tel ou tel micro-organismes.

En conclusion de cette série d'observations, reconnues par la communauté scientifique, et dans la logique de ces constats, je considère non acceptable de définir un seuil de décision « universel » même complété d'une marge d'incertitude. Pour résumer, les données produites

par un opérateur ne peuvent être comparées à celles d'un autre opérateur, d'autant plus que les techniques de prélèvements et les protocoles opératoires de contrôle sont différents.

Par contre, ce qui serait concevable, pour un opérateur donné, serait la détermination d'un seuil d'alerte au moyen d'une carte de contrôle après avoir accumulé et enregistré tout un historique de données. Dans le même temps, de la part cette fois-ci des autorités compétentes, il pourrait être envisageable, à l'image de ce qui se fait dans la démarche HACCP, de réaliser des audits au sein d'un site en évaluant la pertinence du choix méthodologique, le suivi des enregistrements, la conduite suivie pour la détermination d'un seuil d'alerte ainsi que les mesures prises en matière d'actions correctives.

Pierre Maris

**ANNEXE 3 : RAPPORT D'AST**

**Demande d'appui scientifique et technique sur les  
procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de  
nettoyage et désinfection des moyens de transports  
d'oiseaux vivants vis à vis du risque d'influenza aviaire.**

**Demande « 2017-SA-0222 »**

**RAPPORT  
d'appui scientifique et technique**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET APPEL A DONNEES**

**Mars 2018**

## **Mots clés**

---

Volaille, désinfection, nettoyage, transport, influenza aviaire

## **Présentation des intervenants**

### **PARTICIPATION ANSES**

---

**Coordination scientifique** Justine Corre, Anses-DER-UERSABA

**Rédaction scientifique** Sophie Le Bouquin et Adeline Huneau-Salaün, Anses Laboratoire de Ploufragan

## SOMMAIRE

<a href="#"><u>Présentation des intervenants</u></a> .....	31
<a href="#"><u>Synthèse</u></a> .....	33
<a href="#"><u>Sigles et abréviations</u></a> .....	35
<a href="#"><u>Liste des tableaux</u></a> .....	35
<a href="#"><u>1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande</u></a> .....	36
1.1. <a href="#"><u>Contexte de la demande</u></a> .....	36
1.2. <a href="#"><u>Objet de la demande</u></a> .....	36
1.3. <a href="#"><u>Cadrage de la demande</u></a> .....	36
1.4. <a href="#"><u>Modalités de traitement de la demande</u></a> .....	37
<a href="#"><u>2. Données issues de la bibliographie</u></a> .....	37
2.1. <a href="#"><u>Contexte existant des GPBH</u></a> .....	37
2.2. <a href="#"><u>Bibliographie</u></a> .....	38
<a href="#"><u>3. Analyse des données de terrain</u></a> .....	43
<a href="#"><u>4. Discussion</u></a> .....	45
<a href="#"><u>5. Conclusions</u></a> .....	48
<a href="#"><u>6. Bibliographie</u></a> .....	48
6.1. <a href="#"><u>Publications</u></a> .....	48
6.2. <a href="#"><u>Législation et réglementation</u></a> .....	49



## Synthèse

L'Anses a été saisie le 27/10/2017 par la Direction Générale de l'Alimentation - Bureau de la Santé Animale - pour la réalisation d'un appui scientifique et technique (AST) sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transports d'oiseaux vivants vis à vis du risque d'influenza aviaire. La demande d'appui scientifique et technique est intervenue dans le contexte de la préparation d'un arrêté sur les mesures de prévention de la propagation des maladies *via* le transport d'oiseaux vivants. La demande concerne la réalisation des contrôles microbiologiques et porte i. sur la définition des modalités d'échantillonnage et ii. le choix des microorganismes indicateurs ciblés et les seuils d'interprétation pour qualifier le résultat obtenu. Le traitement de la demande s'est appuyé d'une part, sur une recherche bibliographique et, d'autre part, sur un appel à données auprès des professionnels de l'abattage et du transport des volailles afin de collecter les protocoles de contrôle microbiologique appliqués actuellement.

Onze publications scientifiques visant à évaluer l'efficacité de protocoles de décontamination des caisses de transport de volailles ont été recensées et analysées. Elles reposent sur le dénombrement avant et après décontamination de plusieurs indicateurs bactériens (Flore Aérobie Mésophile, entérobactéries et/ou E. coli) ; cinq à douze prélèvements sont effectués par surface à contrôler, par frottis (écouvillon, éponge ou chiffonnette). Cinq entreprises (trois couvoirs et deux abattoirs) ont communiqué leur protocole interne de contrôle microbiologique de la décontamination des caisses et des véhicules de transport. Outre la détection des salmonelles, quatre entreprises pratiquent un contrôle de la contamination résiduelle des surfaces (caisses, hayon et plateau du camion). Les indicateurs retenus sont les « streptocoques fécaux » ou les entérocoques. L'utilisation des géloses de contact (« boîte de contact ») est majoritaire. De plus, le Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène pour le transport des palmipèdes à foie-gras, proposé par l'interprofession de la filière, présente un protocole de contrôle microbiologique de la décontamination proche de ceux transmis par les opérateurs.

Aucune référence bibliographique portant sur la validation d'une méthode de contrôle microbiologique de la décontamination des caisses et véhicules de transport de volailles n'a été identifiée. En l'absence de données collectées sur plusieurs années à partir des plans de contrôle internes aux entreprises ou de résultats d'études contrôlées, il est impossible de conclure sur les modalités d'échantillonnage et les micro-organismes les plus adaptés. A partir des éléments recueillis, les observations suivantes peuvent être apportées aux deux questions de la saisine.

### 1/ Modalités d'échantillonnage

- Méthode de prélèvement

Les frottis et les empreintes gélosées sont les plus fréquemment utilisés par les professionnels. Ces méthodes sont reconnues pour le contrôle microbiologique des surfaces et le choix repose essentiellement sur la facilité d'emploi. Dans le cas du frottis, une standardisation de la surface prélevée est nécessaire pour assurer la comparabilité des résultats entre contrôles.

- Surfaces à contrôler

Pour prévenir les maladies animales, le contrôle des caisses est indispensable car elles sont en contact direct avec les volailles. D'autres surfaces sont également exposées aux matières potentiellement infectieuses comme le hayon, le plateau et les roues du camion ou le matériel entrant en élevage (chariot) et doivent donc être contrôlées. Un contrôle ponctuel d'autres surfaces permet de maintenir la vigilance des opérateurs sur l'ensemble des éléments à traiter lors de la décontamination.

- Nombre de prélèvements

Plusieurs études scientifiques ont suggéré que 4 à 5 prélèvements par surface constituent un compromis acceptable entre qualité de l'information obtenue et contraintes d'application.

## 2/ Indicateurs bactériens

- Microorganismes ciblés

La Flore Aérobie Mésophile et/ou les entérobactéries sont les microorganismes dénombrés dans les travaux scientifiques alors que les professionnels utilisent plus fréquemment les entérocoques ou « streptocoques fécaux ». Le dénombrement de la FAM présente une variabilité plus élevée de la contamination résiduelle, permettant une évaluation plus discriminante de l'efficacité de la décontamination. La FAM, les entérobactéries et les entérocoques sont tous présents en quantité importante sur les caisses de transport des volailles avant décontamination et sont donc indiqués pour évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection. Les entérobactéries et les entérocoques sont des indicateurs de la contamination fécale, ce qui est pertinent dans une démarche de prévention des maladies.

- Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats dépend directement de la méthode de validation retenue pour le contrôle. Si l'objectif est de contrôler l'abattement de la charge bactérienne, il convient d'appliquer le même critère de réduction que celui retenu pour qualifier le procédé de décontamination. Si le contrôle repose sur la quantification de la contamination résiduelle de la surface, un plan en deux ou trois classes peut être adopté mais les seuils restent à définir pour chaque indicateur bactérien en relation avec l'objectif de prévention des maladies.

Quelle que soit la méthode retenue, le contrôle microbiologique demeure un outil complémentaire au contrôle visuel de la propreté, à mettre en œuvre seulement si le nettoyage a été préalablement jugé satisfaisant. L'expérience de l'élaboration de critères microbiologiques d'hygiène des procédés dans les industries agroalimentaires peut être exploitée pour la mise au point d'un critère microbiologique pour le contrôle de la décontamination des caisses et véhicules de transport.

## **Sigles et abréviations**

BC : Boîte de Contact

FAM : Flore Aérobie Mésophile

GBPH : Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène

UFC : Unité Formant Colonie

## **Liste des tableaux**

<a href="#">Tableau 1 Références bibliographiques relatives au contrôle microbiologique des véhicules et caisses de transport de volailles vivantes</a> .....	41
<a href="#">Tableau 2 Exemples de protocoles de contrôle microbiologique de l'efficacité de la décontamination de camions de transport de volailles vivantes a. en couvoir, b. en abattoir</a> .....	43
Tableau 3 Avantages et limites des méthodes de contrôle microbiologique des surfaces par frottis ou empreinte gélosée .....	17

## **Listes des figures**

<a href="#">Figure 1 Dénombrement d'entérocoques après nettoyage et désinfection de véhicules de transport de poussins d'un jour dans une société d'accoupage (France, 2017)</a> .....	44
--	----

L'Anses a été saisie le 27/10/2017 par la Direction Générale de l'Alimentation - Bureau de la Santé Animale - pour la réalisation d'un appui scientifique et technique sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transports d'oiseaux vivants vis à vis du risque d'influenza aviaire (Annexe 2).

## **1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande**

### **1.1. Contexte de la demande**

La demande d'appui scientifique et technique est intervenue dans le contexte de la préparation d'un arrêté sur les mesures de prévention de la propagation des maladies *via* le transport d'oiseaux vivants. Le projet d'arrêté annexé à la demande (Annexe 2) prévoit dans son article 9 le contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection des véhicules et matériels de transport, basé sur un plan de contrôle visuel et microbiologique. Les Règlements (CE) n°853/2004, (CE) n°1/2005 et (CE) n°2016/429 instaurent déjà l'obligation de nettoyer, laver et désinfecter les véhicules et matériels de transport d'animaux avant réutilisation et la traçabilité de ces opérations dans un registre. Cependant, ils n'imposent pas de mesure concernant le contrôle du résultat de la décontamination. Le projet d'arrêté a pour but de compléter l'ensemble de ces dispositions en les assortissant d'une obligation de contrôle du résultat à la fois par les professionnels (transporteurs) et les services de contrôle officiel (DDPP).

### **1.2. Objet de la demande**

La demande concerne uniquement la réalisation des contrôles microbiologiques et porte i. sur la définition des modalités d'échantillonnage (nature du prélèvement, nombre et surfaces à prélever) et ii. le choix des microorganismes indicateurs ciblés et les seuils d'interprétation associés à la mesure permettant de qualifier le résultat obtenu. La qualification du protocole de décontamination par l'opérateur n'est pas prise en compte dans la demande.

### **1.3. Cadrage de la demande**

Le projet d'arrêté définit l'ensemble des éléments constitutifs du plan de contrôle visuel et microbiologique. Il indique certaines dispositions concernant les questions visées dans l'AST :

- le mode de prélèvement : boîte de gélose contact, écouvillon ou chiffonnette,
- les micro-organismes ciblés : flore totale ou streptocoques fécaux,
- le nombre de prélèvements : dix au minimum répartis pour moitié sur les surfaces en contact avec les animaux (caisses) et pour moitié sur d'autres surfaces

Ces dispositions constituent la base de travail principale de l'AST, même si des alternatives pourront être étudiées selon les données scientifiques et techniques disponibles. Le projet d'arrêté stipule que la méthode de contrôle doit être quantitative ou semi-quantitative

(« analyses de dénombrement »). Il ne précise pas clairement si le contrôle doit mesurer une « réduction bactérienne », ce qui induit des prélèvements avant et après décontamination, ou s'il repose sur une mesure de la contamination résiduelle. Ces deux aspects seront donc discutés dans le présent rapport.

Le plan de contrôle microbiologique proposé a pour but d'évaluer l'efficacité des processus de décontamination de routine, hors mesures spécifiques qui peuvent être adoptées pour lutter contre une épizootie ou une maladie émergente. En situation d'urgence sanitaire, la recherche de l'agent pathogène incriminé peut être préférable pour évaluer l'efficacité de la décontamination. Par exemple le risque de transmission d'influenza aviaire par les moyens de transport, visé dans le projet d'arrêté, peut être en partie évalué par la recherche directe de génome viral après décontamination des surfaces des véhicules et des caisses en période d'épizootie (Huneau-Salaün et al., 2017). Cependant cette méthode n'est pas utilisable hors épizootie pour vérifier la décontamination des moyens de transport, la probabilité étant très élevée que les surfaces soient exemptes de génome viral avant nettoyage et désinfection.

## **1.4. Modalités de traitement de la demande**

Le traitement de la demande s'est appuyé d'une part, sur une recherche bibliographique (dont la littérature grise) et d'autre part sur un appel à données auprès des professionnels de l'abattage et du transport des volailles. Cet appel à données a pour but de collecter des éléments techniques non publiés afin de compléter les éléments scientifiques disponibles et de mieux évaluer l'applicabilité sur le terrain des différentes méthodes de contrôle microbiologique disponibles. L'appel à données a été diffusé par les principaux syndicaux professionnels de l'aviculture auprès de leurs adhérents en décembre 2017. Les réponses ont été recueillies en janvier 2018 par voie électronique. Un accord-cadre sur l'utilisation des données, assurant notamment leur confidentialité, a été co-signé entre l'Anses et chaque participant.

Le produit de l'AST prend la forme du présent rapport.

## **2. Données issues de la bibliographie**

### **2.1. Contexte existant des GBPH**

Depuis 2008, les filières de productions de volailles, de l'alimentation du bétail à la commercialisation des produits finis se sont dotées de Guides de Bonnes Pratiques d'Hygiène (GBPH). La problématique de l'hygiène des moyens et des équipements de transport des volailles vivantes est plus particulièrement abordée dans un guide européen (<http://animaltransportguides.eu>) ainsi que dans des guides nationaux spécifiques sur l'accoupage et sur le transport des palmipèdes à foie gras ([www.itavi.asso.fr/download/9106](http://www.itavi.asso.fr/download/9106)). Seul ce dernier guide propose un plan de contrôle microbiologique de la décontamination des

véhicules et des caisses de transport (présenté au paragraphe 2.2). A l'échelle des entreprises, le plan de contrôle microbiologique des transports peut être intégré au plan de maîtrise sanitaire des transporteurs et négociants de volailles, des accoueurs et des abattoirs de volailles.

Afin d'aider les rédacteurs des GBPH, l'Anses a édité en 2014 une fiche outil sur le « Suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux », spécifiquement destinée aux entreprises agroalimentaires (Anses, 2014). Ce document peut aider à l'élaboration du plan de contrôle microbiologique du nettoyage et de la désinfection des véhicules et équipements de transport de volailles vivantes.

Le plan de contrôle microbiologique proposé dans le projet d'arrêté vise à évaluer la maîtrise d'une procédure de décontamination préalablement validée. Au-delà du contrôle ponctuel, l'application dans le temps du plan de contrôle permet de surveiller la survenue de certaines dérives dans l'application de la procédure de nettoyage et désinfection (au moyen de cartes de contrôle par exemple). De ce fait, il est nécessaire que le plan de contrôle soit standardisé au maximum pour assurer la comparabilité des résultats dans le temps. Toute modification du plan de contrôle microbiologique devrait aussi s'accompagner d'une période de transition avec l'application de l'ancien et du nouveau plan afin de maintenir la possibilité de suivi temporel des résultats.

## 2.2. Bibliographie

La recherche bibliographique a permis d'identifier plusieurs articles scientifiques sur le nettoyage et la désinfection des moyens de transport de volailles vivantes. Les travaux ciblant des dangers sanitaires, comme *Salmonella* et *Campylobacter*, sans dénombrement d'autre flore microbiologique, ont été exclus. Les études identifiées portent exclusivement sur la décontamination des caisses de transport (Tableau 1). Elles visent à tester ou valider des procédures de nettoyage et de désinfection, en conditions expérimentales ou de terrain. Dans ces études, l'efficacité des méthodes de décontamination est mesurée par l'abatement de la charge bactérienne obtenu. Elles renseignent donc également sur les niveaux de contamination résiduelle qui peuvent être observés après différentes procédures de décontamination. Cependant, aucune n'a pour objectif de proposer une méthode standardisée de contrôle de la contamination microbiologique résiduelle des surfaces.

Dans de nombreux travaux, deux à trois indicateurs bactériens sont suivis : la flore aérobie mésophile (FAM) et généralement des entérobactéries. A ce niveau, les indicateurs retenus sont la famille des *Enterobacteriaceae*, les coliformes ou *Escherichia coli*. Les entérocoques intestinaux (genres *Enterococcus* et *Streptococcus* du groupe antigénique D) sont rarement utilisés. Les méthodes de prélèvements reposent sur deux techniques : le frottis et l'empreinte sur milieu gélosé. Le frottis, par écouvillon, éponge ou chiffonnette, nécessite une standardisation de la surface contrôlée pour l'expression des dénombrements. Deux stratégies sont alors utilisées : échantillonner la totalité de la surface à contrôler si elle est de taille réduite (fond de caisse) en suivant un protocole standardisé de frottis ou l'emploi d'un gabarit

délimitant l'espace à prélever. Dans ce cas, il est nécessaire d'assurer la stérilité du cadre de prélèvement. L'expression des résultats dépend directement de la méthode de prélèvement utilisée et certains travaux ne reportent pas un dénombrement par unité de surface.

L'élargissement de la recherche à la littérature grise et au transport d'autres espèces de rente a permis d'identifier quatre travaux visant à développer une méthode d'évaluation microbiologique de la décontamination des véhicules et caisses. Une étude de la Fédération Départementale des Groupements Sanitaires des Côtes d'Armor en 1992 a proposé une méthode d'évaluation de la désinfection des camions de transport des poulettes vis-à-vis du risque salmonellique. Elle préconise, en plus du contrôle visuel, l'application de huit boîtes de contact entérocoques sur le fond des caisses et huit boîtes sur le « plafond » interne des caisses. Dans cet essai, aucune relation n'a pu être mise en évidence entre la présence de salmonelles et le niveau de contamination résiduelle en entérocoques à cause du faible nombre de caisses contaminées par les salmonelles. Aucune référence n'est proposée quant à la limite de colonies d'entérocoques par boîte jugée acceptable après nettoyage et désinfection. Les résultats de contamination résiduelle sur 794 prélèvements montrent 63,3% des boîtes sans colonie mais 4,9% des boîtes comptent encore plus de 100 colonies.

Entre 2004 et 2005 dans un abattoir anglais, une importante étude a été menée par Burton et al. pour développer un système de décontamination des caisses de transport de volailles. Le protocole de contrôle microbiologique repose sur le dénombrement de la FAM et des entérobactéries sur la totalité du fond de caisse : une chiffonnette est frottée sur un quart du fond puis les quatre chiffonnettes représentant l'ensemble de la surface sont poolées en un seul échantillon. Cinq fonds de caisse sont prélevés aléatoirement par contrôle. Les entérobactéries sont proposées comme un indicateur des dangers *Salmonella* et *Campylobacter*. Partant des hypothèses qu'une décontamination efficace doit permettre de réduire de 4 log la quantité d'entérobactéries et que la charge initiale est relativement constante (environ 6 à 8 log sur 10 cm<sup>2</sup>), les auteurs proposent de valider la décontamination si la charge résiduelle est inférieure à 2 log UFC d'entérobactéries pour 10 cm<sup>2</sup> de fond de caisse. Il n'est pas précisé si le résultat à considérer est le maximum des cinq dénombrements ou la moyenne des prélèvements. Cette étude a conclu à une faible corrélation entre les résultats des contrôles visuels et des contrôles microbiologiques. Une telle constatation a aussi été reportée lors de la décontamination des surfaces hospitalières (Griffith et al., 2000) ou des élevages de poules pondeuses (Huneau-Salaün et al., 2010), Les deux types de contrôles sont donc complémentaires : le contrôle visuel permet d'apprécier la propreté générale (validation du nettoyage) alors que le contrôle microbiologique renseigne sur l'efficacité de la désinfection. Dans ces conditions, le contrôle microbiologique, réservé aux surfaces visuellement propres, ne doit être réalisé que si la propreté visuelle de l'ensemble des éléments traités a été préalablement validée.

Dans son GBPH lors des opérations de transport, le Comité Interprofessionnel des palmipèdes à foie gras propose un contrôle des camions décontaminés sur la base journalière, puis hebdomadaire, d'un véhicule étudié. Cinq prélèvements sont pratiqués par camion : deux à l'intérieur des caisses, deux à l'extérieur des caisses et un sur le plateau du camion. Les

prélèvements sont de type « empreinte gélosée » (boîte de contact ou lame) pour dénombrer la FAM ou les entérocoques intestinaux. Une grille d'interprétation à trois classes est proposée, sans distinction selon la nature de l'indicateur ou l'aire du dispositif de prélèvement : correct (0 à 50 UFC, correspondant à environ 0-2 UFC/cm<sup>2</sup>), non conforme-à améliorer (51 à 100 UFC) et non conforme-mauvais (>100 UFC). Un résultat non conforme amène à réviser le protocole de nettoyage et désinfection et à intensifier les contrôles jusqu'à retour à un niveau satisfaisant.

Deux études ont été identifiées sur le développement d'un protocole de validation microbiologique de la décontamination des camions de transport de porcs. La première étude sur 36 camions en France en 1998 a comparé cinq types de prélèvements : boîte de contact FAM, boîte de contact coliformes totaux, boîte de contact coliformes « fécaux », boîte de contact « streptocoques fécaux », chiffonnette pour le dénombrement FAM, coliformes « fécaux » et streptocoques « fécaux » (Corrégé et Rugraff, 1998). Les auteurs privilégient la FAM comme indicateur à retenir dans la mesure où les dénombrements après décontamination présentent une variabilité plus élevée qu'avec les indicateurs plus spécifiques. La FAM permettrait donc d'après les auteurs de mieux décrire la contamination résiduelle mais pose la difficulté d'un manque de spécificité pour évaluer la qualité de l'application du protocole de décontamination. La méthode par boîte de contact est proposée car offrant des résultats très corrélés à ceux par frottis, avec une facilité d'application plus grande et un coût moindre. Le contrôle consisterait donc en deux boîtes de contact FAM (une sur le sol et une sur la paroi intérieure du camion) mais aucune indication n'est fournie sur l'interprétation des résultats. Le Conseil Canadien du Porc (cité par Cabahug et al., 2016) a développé une procédure de contrôle microbiologique de la décontamination des camions basée sur le prélèvement de cinq boîtes de contact par surface pour le dénombrement des entérobactéries. Un plan à trois niveaux est retenu : satisfaisant ( $\leq 10$  UFC/28 cm<sup>2</sup>), critique ([11-50]) et insatisfaisant (>50 UFC/28cm<sup>2</sup>). La fréquence d'application est de deux contrôles annuels par camion.



Tableau 1 Références bibliographiques relatives au contrôle microbiologique des caisses de transport de volailles vivantes

Production	Surface contrôlée	Type et nombre prélèvement	Indicateurs bactériens	Standardisation de la surface	Commentaires	Référence
Poulet, USA, 2004	Container à tiroirs	6 chiffonnettes	Coliformes 37°C	Oui, cadre stérile, 127 cm <sup>2</sup>	Contamination résiduelle après N&D les plus efficaces : Coliformes : <1 UFC/127 cm <sup>2</sup> Valeur seuil proposée : < 50 UFC/127 cm <sup>2</sup> pour les coliformes	Ramesh, 2003
Poulet, USA, 2004	Container à tiroirs	6 chiffonnettes	Coliformes 37°C	Oui, cadre stérile, 127 cm <sup>2</sup>	Contamination résiduelle moyenne après N&D : Coliformes : 6,6 log UFC/127 cm <sup>2</sup>	Ramesh, 2004
Poulet, UK, 2004	Fond caisse	4 pools de 4 écouvillons	Flore Aérobie Mésophile 30°C Enterobacteriaceae 37°C	Fond de caisse entier	Peu de corrélation entre notation visuelle propreté et résultats bactériologiques Contamination résiduelle après N&D les plus efficaces : FAM : 5,0 à 6,0 log UFC/caisse Enterobacteriaceae : 3,0 log UFC/caisse	Burton et al., 2004
Poulet, USA, 2005	Fond caisse	10 écouvillons	Coliformes 35°C E. coli 35°C	Oui, 25 cm <sup>2</sup>	Ensemencement expérimental Contamination résiduelle après N&D les plus efficaces : Coliformes : <1 log UFC+/- 0,2/25 cm <sup>2</sup> E. coli : <0,3 log UFC/cm <sup>2</sup> +/- 0,2	Berrang et al., 2005
Poulet, USA, 2006	Fond caisse	3 éponges	Flore Aérobie totale Coliformes 35°C E. coli 35°C	Oui, cadre stérile, 232 cm <sup>2</sup>	Contamination résiduelle moyenne après N&D : Flore aérobie : 7,0 log UFC/cm <sup>2</sup> +/- 0,2 Coliformes : 5,6 log UFC/cm <sup>2</sup> +/- 0,2 E. coli : 5,2 log UFC/cm <sup>2</sup> +/- 0,2	Northcutt and Berrang, 2006
Poulet, UK, 2008	Fond caisse	5 éponges	Flore Aérobie Mésophile 30°C (FAM) Enterobacteriaceae 37°C	Fond de caisse entier	Contamination résiduelle moyenne après N&D : FAM : 5,0 à 6,0 log UFC/caisse Enterobacteriaceae : <2,3 à 5,0 log UFC/caisse	Allen et al., 2008
Poulet, UK, 2008	Fond caisse	12 écouvillons 12 éponges	Flore Aérobie Mésophile 30°C Enterobacteriaceae 37°C	Fond de caisse entier	Observations de terrain avec protocole de décontamination de l'industriel FAM : 7,5 log UFC/caisse Enterobacteriaceae : 6 à 7 log UFC/caisse Peu de corrélation entre notation visuelle propreté et résultats bactériologiques	Allen et al., 2008

**Avis de l'Anses**  
**Saisine n° « 2017-SA-0222 »**

Poulet, USA, 2009	Container à tiroirs	10 chiffonnettes	Flore Aérobie Mésophile 30°C	Oui, cadre, 25 cm <sup>2</sup>	Ensemencement expérimental N&D les plus efficaces : FAM < 3,0 log UFC/25 cm <sup>2</sup> +/- 0,3	Hinojosa et al. 2009
Poulet, USA, 2011	Fond caisse	10 éponges	Coliformes 35°C E. coli 35°C	Oui, 18 cm <sup>2</sup>	Ensemencement expérimental Coliformes : 0,5 log UFC/18 cm <sup>2</sup> +/- 0,3 E. coli : 0,2 log UFC/18 cm <sup>2</sup> +/- 0,2	Berrang et al., 2011
Poulet, USA, 2011	Fond caisse	12 éponges	Coliformes 35°C E. coli 35°C	Oui, 18 cm <sup>2</sup>	Ensemencement expérimental Coliformes : 0,3 log UFC/18 cm <sup>2</sup> +/- 0,4 E. coli : 0,2 log UFC/18 cm <sup>2</sup> +/- 0,2	Berrang et al., 2011b
Poulet, DK, 2015	Fond caisse	12 écouvillons	Flore Aérobie Mésophile 30°C Enterobacteriaceae 37°C	Oui, 24 cm <sup>2</sup>	N&D les plus efficaces : FAM <1 log UFC/ 24 cm <sup>2</sup> Enterobacteriaceae <1 log UFC/ 24 cm <sup>2</sup>	Musavian et al., 2015

### 3. Analyse des données de terrain

L'appel à données a permis de récolter les procédures de contrôles microbiologiques en place dans quatre sociétés d'accoupage et/ou de sélection génétique et deux entreprises d'abattage de volailles. Au stade des couvoirs, des contrôles pour la recherche de salmonelles sont effectués sur les véhicules de transport de poussins. Ces recherches sont complétées par le dénombrement d'un indicateur bactérien dans deux entreprises (tableau 2). A l'abattoir, les procédures de contrôle microbiologique peuvent varier selon les sites de production d'une même entreprise en fonction de leur volume d'activité. Dans un abattoir, ce rythme est renforcé en cas de situation sanitaire spécifique comme l'abattage de lots de volailles infectés par une salmonelle ou l'élévation du risque d'influenza aviaire sur le territoire. Dans ce cas, les contrôles de caisses peuvent devenir quotidiens ou systématiques après chaque interruption de travail (pause, changement d'équipe). Les contrôles reposent dans les deux entreprises répondantes sur le dénombrement de streptocoques fécaux par boîte de contact. Dans tous les cas, la validation du nettoyage et de la désinfection repose sur la mesure de la contamination résiduelle des surfaces et non sur l'évaluation de l'abattement de la charge bactérienne. Après interrogation, quatre entreprises ont précisé que les protocoles de contrôle ont été développés en interne en s'inspirant de pratiques déjà mises en œuvre en élevage ou à l'abattoir. Une entreprise a précisé avoir pratiqué des tests de comparaison entre différents indicateurs bactériens et milieux de culture mais ces résultats ne sont pas disponibles.

**Tableau 2 Exemples de protocoles de contrôle microbiologique de l'efficacité de la décontamination de camions de transport de volailles vivantes a. en couvoir, b. en abattoir**

	Couvoir A Transport de poussin d'un jour	Couvoir B Transport de poussin d'un jour
Echantillonnage	Chaque camion contrôlé une fois par trimestre	Chaque camion contrôlé chaque mois
Prélèvement	1 Chiffonnette intérieur cabine 1 Chiffonnette caisses et matériel (roulant, hayon etc.)	5 BC réparties sur intérieur et extérieur des caisses et sur le plateau
Indicateur	Entérocoques : dénombrement	Streptocoques : dénombrement
Interprétation	< 1 : très bien 1 à 24 : bien 25-50 : moyen >50 : mauvais	Non communiqué

	Abattage C Transport de volailles de chair	Abattage D Transport de volailles de chair
Echantillonnage	De 1 camion par semaine à 4 par semaine selon les sites	1 camion/mois Si risque sanitaire : jusqu'à 5 contrôles par jour sur caisses
Prélèvement	5 BC sur caisse 5 BC sur container 3 BC sur plateau camion	2 BC intérieur caisse 2 BC extérieur caisse 1 BC plateau camion 1 BC chariot élévateur embarqué ou autre matériel
Indicateur	Streptocoques : dénombrement	Streptocoques : dénombrement
Interprétation	≤ 50 UFC/BC : conforme	≤ 50 UFC/BC : conforme

	> 50 UFC/BC : non-conforme	> 50 UFC/BC : non-conforme Contrôle non conforme si au moins 1 prélèvement est non conforme
--	----------------------------	--

Les dénombrements bactériens communiqués par trois entreprises montrent une très grande variabilité de résultats. Dans un des couvoirs répondants, le taux de contrôles non conformes sur les véhicules de transport de poussins varie fortement (figure 1). Dans un abattoir, sur 105 séries de contrôle comprenant 5 à 10 BC par camion, 81 séries (77%) présentaient au moins un résultat non conforme ; la mise en place récente de ces contrôles a entraîné une révision des protocoles de décontamination appliqués, démontrant l'intérêt de ce suivi. Dans le second abattoir, le taux de prélèvement non conforme varie de 3% à 59% selon les sites, le taux le plus élevé étant observé sur des caisses de transport.

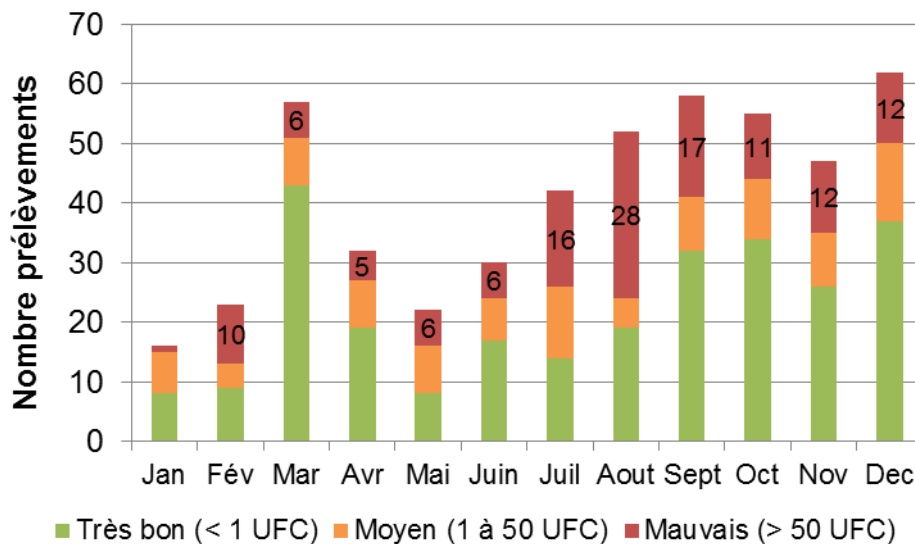


Figure 1 Dénombrement d'entérocoques après nettoyage et désinfection de véhicules de transport de poussins d'un jour dans une société d'accouage (France, 2017)

## 4. Discussion

Aucune référence bibliographique portant sur la validation d'une méthode de contrôle microbiologique de la décontamination des caisses et véhicules de transport de volailles vivantes n'a été identifiée. L'étude de Buron et al. (2014) propose le protocole le plus complet de contrôle mais se limite aux caisses de transport. Deux méthodes ont été proposées pour les camions de porcs (Corrégé et Rugraf, 1998 ; Cabahug et al., 2016) mais elles sont difficilement transposables aux volailles car les conditions de transport ne sont pas identiques dans les deux productions. Dans le cas des volailles, les études portant sur l'efficacité des protocoles de décontamination emploient des méthodes de prélèvements et des indicateurs microbiens variés pour quantifier la contamination résiduelle des surfaces. Les entreprises d'accoupage et d'abattage ayant transmis leur protocole de contrôle microbiologique utilisent également différentes solutions développées en interne, toutes basées sur le dénombrement de la contamination résiduelle.

A partir des éléments recueillis, les observations suivantes peuvent être apportées aux deux questions de la saisine.

### 1/ Modalités d'échantillonnage

- Méthode de prélèvement

Les méthodes par frottis et empreintes gélosées sont les plus fréquemment utilisées par les professionnels. Les avantages et limites de ces deux méthodes ont été comparés par l'Anses (2014) ; le tableau 3 présente des critères supplémentaires en relation avec la problématique spécifique du contrôle des moyens de transport. Les empreintes gélosées sont très faciles d'emploi et d'analyse, ce qui explique qu'elles soient retenues dans les abattoirs. Les boîtes de contact seraient plus faciles à manipuler que les lames gélosées. Les résultats semi-quantitatifs obtenus sont adaptés pour caractériser la contamination résiduelle d'une surface mais sont limités quand il s'agit d'évaluer une réduction de la charge bactérienne. Le frottis, par chiffonnage ou écouvillonnage, nécessite une standardisation précise du protocole de prélèvement afin que les dénombrements microbiologiques soient comparables entre les contrôles. Ce point est difficile à maîtriser si les prélèvements sont effectués par plusieurs opérateurs. Le prélèvement par chiffonnette a l'avantage de pouvoir servir à la fois pour la recherche de pathogènes, généralement les salmonelles, et le dénombrement d'un indicateur bactérien à condition que la surface prélevée soit réellement mesurée.

Frottis et empreintes gélosées présentent la limite de ne pas décoller la totalité des microorganismes se trouvant sur une surface. On n'obtient donc qu'une information partielle sur contamination réellement présente et cette limite doit être intégrée dans l'analyse des résultats.

**Tableau 3 Avantages et limites des méthodes de contrôle microbiologique des surfaces par frottis ou empreinte gélosée (Adapté de Anses 2014)**

	Surface prélevée	Limites	Avantages
<b>Frottis</b>			
Ecouvillon	20 à 100 cm <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de standardisation de la surface prélevée</li> <li>• Décrochage des microorganismes très variable : source importante de variabilité de la quantification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adapté aux surfaces difficiles d'accès ou irrégulières</li> <li>• Un seul prélèvement peut servir à rechercher ou dénombrer différents microorganismes</li> <li>• Quantification précise par la méthode des dilutions</li> </ul>
Chiffonnette	Jusqu'à plusieurs m <sup>2</sup>		
<b>Empreinte gélosée</b>			
Gélose de contact	20 à 25 cm <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sur surface sèche : peu adapté aux surfaces venant d'être désinfectées</li> <li>• Surface pleine</li> <li>• Surface plane uniquement pour la gélose</li> <li>• Certains milieux gélosés sélectifs ne permettent pas la reprise de croissance de tous les micro-organismes présents</li> <li>• Sous-estimation de la contamination due au faible décrochage des bactéries</li> <li>• Méthode semi-quantitative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilité d'emploi</li> <li>• Standardisation de la surface prélevée</li> <li>• Possibilité d'utilisation d'applicateur de gélose pour augmenter la standardisation</li> <li>• Facilité d'analyse</li> </ul>
Lame gélosée	10 cm <sup>2</sup>		
Film de gélose déshydraté	20 cm <sup>2</sup>		

- Surface à prélever

Dans le cadre des autocontrôles professionnels, les surfaces prélevées, outre les caisses, comprennent le plateau du camion et parfois le matériel embarqué. Dans un objectif de prévention des maladies animales, le contrôle des caisses est indispensable puisque ce matériel est l'élément en contact direct avec les volailles. Un échantillonnage aléatoire des caisses est la méthode retenue par les professionnels. D'autres surfaces sont également exposées aux matières potentiellement infectieuses (fientes, litière essentiellement) comme le hayon, le plateau et les roues du camion ou le matériel entrant en élevage (chariot) et doivent donc être contrôlées. Ce contrôle est d'autant plus important que ces éléments sont décontaminés selon des protocoles spécifiques, différents de ceux appliqués aux caisses qui sont généralement traitées séparément.

Etendre le contrôle à d'autres surfaces moins exposées aux animaux et aux matières d'origine animale permet de surveiller la qualité de l'application de l'ensemble du protocole de décontamination. Dans le cadre des dénombrements pratiqués avant et après désinfection, le contrôle de surfaces « moins exposées » peut même mettre en évidence une augmentation de leur contamination liée à des failles dans la décontamination ou dans les mesures de biosécurité (Huneau-Salaün et al. 2010 et 2017). Un contrôle ponctuel de ces surfaces (par exemple cabine)

permet de maintenir la vigilance des opérateurs sur l'ensemble des éléments à traiter lors de la décontamination.

- Nombre de prélèvements

Dans les plans de contrôle professionnels, le nombre de prélèvements par surface varie de un à cinq alors que les études scientifiques comprennent cinq à douze échantillons par point de contrôle afin de documenter la variabilité des résultats (il s'agit ici de protocoles de validation et répondent à une puissance statistique fixée par les auteurs). Plusieurs études ont suggéré que 4 à 5 prélèvements par surface constituent un compromis acceptable entre qualité de l'information obtenue et contraintes de mises en application et de coût (Burton et al., (2004) pour les caisses de transport ; Drouin et Toux (1985) et Luyckx et al. (2014) en élevage).

## 2/ Indicateurs bactériens

- Microorganismes ciblés

La Flore Aérobie Mésophile et/ou les entérobactéries sont les microorganismes dénombrés dans les travaux scientifiques. Le dénombrement de la FAM présente une variabilité plus élevée de la contamination résiduelle, mais la FAM constitue un indicateur très peu spécifique de l'application du protocole de N&D. Les professionnels utilisent plus fréquemment les entérocoques intestinaux, encore communément désignés par « streptocoques fécaux ». Cet indicateur est historiquement utilisé dans les filières avicoles françaises depuis les études de Drouin et Toux (1985) ; une relation significative a pu être mise en évidence entre le dénombrement de streptocoques fécaux et la présence de salmonelles après décontamination dans les élevages de poulet de chair (Rose et al., 2003).

La FAM, les entérobactéries et les entérocoques sont tous présents en quantité importante sur les caisses de transport des volailles avant décontamination et sont donc indiqués pour évaluer l'efficacité du nettoyage et de la désinfection. Les entérobactéries et les entérocoques font partie de la flore commensale de l'intestin des mammifères et des volailles et constituent donc des indicateurs de la contamination fécale déjà utilisés pour l'eau et les aliments (Bornert, 1998). Cet élément est à considérer dans une démarche de prévention des maladies aviaires, les fientes étant une matière à risque pour la transmission des principales pathologies contagieuses.

- Seuils d'interprétation

L'interprétation des résultats dépend directement de la méthode de validation retenue pour le contrôle, un plan en deux ou trois classes de dénombrement de la contamination résiduelle par unité de surface peut être adopté pour juger de la qualité du résultat. Il s'agit de la stratégie retenue par les entreprises interrogées. Les opérateurs considèrent qu'un dénombrement d'entérocoques ou streptocoques fécaux supérieur à 50 UFC par boîte de contact (approximativement 20 UFC/10 cm<sup>2</sup>) n'est pas satisfaisant. Le seuil suggéré par Drouin et Toux pour valider la décontamination des surfaces de poulailler est de 25 UFC par BC maximum, ce qui est inférieur à la limite pratiquée par les professionnels sur le matériel de transport. La fixation des limites d'un plan d'échantillonnage doit reposer sur l'exploitation des historiques d'analyses effectuées dans des entreprises appliquant les Bonnes Pratiques d'Hygiène ou à défaut de GBPH, un procédé de décontamination validé (AFSSA, 2008). En l'absence d'historique disponible, il est également possible de fixer le ou les seuils en fonction d'un risque sanitaire particulier à maîtriser, comme par exemple le risque d'une

contamination résiduelle en salmonelles (Rose et al., 2003). Cette démarche nécessite de pouvoir établir une relation statistique entre la présence du danger sanitaire (ou son dénombrement supérieur à un seuil) et le dénombrement de l'indicateur bactérien.

## 5. Conclusions

Il n'existe actuellement aucune méthode validée scientifiquement de contrôle microbiologique de la qualité de la décontamination des caisses et véhicules de volailles vivantes. Du fait de la réglementation en place depuis de nombreuses années, les démarches professionnelles ont essentiellement visé jusqu'ici à maîtriser le risque de transmission des salmonelles par une recherche du pathogène. Certains protocoles internes ont été élargis au dénombrement d'une flore indicatrice d'une contamination fécale mais les méthodes de prélèvement et les plans d'échantillonnage varient selon les entreprises. En l'absence de données collectées sur plusieurs années à partir de ces plans ou de résultats d'études contrôlées, il est impossible de conclure sur les modalités d'échantillonnage et les micro-organismes les plus adaptés au contrôle microbiologique de l'efficacité de la décontamination des caisses et véhicules de transport. Il est en outre important de souligner qu'un contrôle microbiologique ne se substitue pas au contrôle visuel de la propreté et constitue plutôt une étape complémentaire à mettre en œuvre seulement si le nettoyage a été préalablement jugé satisfaisant. L'expérience de l'élaboration de critères microbiologiques d'hygiène des procédés dans les industries agroalimentaires peut être exploitée pour la mise au point d'un critère microbiologique pour le contrôle de la décontamination des caisses et véhicules de transport.

## 6. Bibliographie

### 6.1. Publications

- AFSSA, 2008. « Recommandations pour l'élaboration de critères microbiologiques d'hygiène des procédés ». Rapport, Septembre 2008, 17p.
- ANSES (2014). Fiche outil pour un guide des bonnes pratiques d'hygiène « Suivi de la réalisation et de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des surfaces, des matériels et des locaux ».
- Allen, V. M., C. H. Burton, D. J. Wilkinson, R. T. Whyte, J. A. Harris, M. Howell, et D. B. Tinker. 2008. "Evaluation of the performance of different cleaning treatments in reducing microbial contamination of poultry transport crates." *Br Poult Sci* 49 (3):233-40.
- Allen, V. M., R. T. Whyte, C. H. Burton, J. A. Harris, R. D. Lovell, R. J. Atterbury, et D. B. Tinker. 2008. "Effect of ultrasonic treatment during cleaning on the microbiological condition of poultry transport crates." *British Poultry Science* 49 (4):423-8.
- Berrang, M. E., C. L. Hofacre, et R. J. Meinersmann. 2011. "Forced hot air to dry feces and kill bacteria on transport cage flooring." *Journal of Applied Poultry Research* 20 (4):567-572.
- Berrang, M. E., R. J. Meinersmann, et C. L. Hofacre. 2011. "Spray washing, absorbent cornstarch powder, and drying time to reduce bacterial numbers on soiled transport cage flooring." *Journal of Applied Poultry Research* 20 (3):378-382.



- Berrang, M. E., et J. K. Northcutt. 2005. "Use of water spray and extended drying time to lower bacterial numbers on soiled flooring from broiler transport coops." *Poultry Science* 84 (11):1797-801.
- Bornet, G. 1998. "Les micro-organismes indicateurs de contamination fécale de l'eau et des aliments. » *Revue de médecine vétérinaire* 149, 727-738.
- Burton, C.H, Whyte, R.T., Allen, V.M., Tinker, D.B. 2004. "Reducing microbial contamination from poultry transport crates by improved cleaning and disinfection systems based on better water use". Silsoe Research Institute, University of Bristol, Report, 205 p.  
<https://www.food.gov.uk/science/research/foodborneillness/m01prog/m01list/m01023>
- Cabahug, J.P., Alvarado, A.C., Predicala, B.Z. 2016. "Rapid assessment of cleanliness of commercial hog transport trailers using ATP bioluminescence method." ASABE Paper 162461774.
- CIFO (2016). Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène et d'application des principes de biosécurité lors des opérations de transport pour la filière palmipèdes à foie gras. Paris : CIFO, 27 p.
- Corrége I. et Rugraff Y. (1998). Mise au point d'une méthode de contrôle de l'efficacité du nettoyage-désinfection des véhicules de transport des porcs vivants. *TechniPorc*, 21 (4) : 29-33.
- Drouin, P. et Toux, J.-Y., 1985. Méthode bactériologique pour apprécier la désinfection des poulaillers. *Bulletin d'Information de la Station Expérimentale d'Aviculture de Ploufragan* 25, 176-178.
- FDGDS 22 (1992). Etude sur le nettoyage et la désinfection des camions de transfert de volailles. Saint Brieuc : FDGDS 22, 22 p.
- Griffith C.J., Cooper R.A., Gilmore J., Davies C. and Lewis M. 2000. "An evaluation of hospital cleaning regimes and standards". *Journal of Hospital Infection*, 45: 19-28.
- Hinojosa, C. A., D. J. Caldwell, J. A. Byrd, M. A. Ross, K. D. Stringfellow, E. J. Fowlkes, J. T. Lee, P. A. Stayer, Y. Z. Farnell, et M. B. Farnell. 2015. "Use of a foaming disinfectant and cleaner to reduce aerobic bacteria on poultry transport coops." *Journal of Applied Poultry Research* 24 (3):364-370.
- Huneau- Salaun, A., Scoizec, A., Thomas, R., Le Bouquin, S. 2017. "Efficacité de la décontamination des caisses et des véhicules de transport de canard: observations de terrain durant l'épizootie d'influenza aviaire H5N8 en France en 2017. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n° 80 (1).
- Huneau-Salaün A., Michel V., Balaine L., Ecobichon F., Le Bouquin, S. 2010. « Evaluation of common cleaning and disinfection programs in cage and on-floor layer houses in France." *British Poultry Science*, 51 (2) : 204-212.
- Luyckx, K., Dewulf, J., Van Weyenberg, S., Herman, L., Zoons, J, Verveat, E., Heyndrickx, M., De Reu; K. 2014. "Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses." *Poultry Science* 94, 740-749.
- Musavian, H. S., T. M. Butt, A. B. Larsen, et N. Krebs. 2015. "Combined steam-ultrasound treatment of 2 seconds achieves significant high aerobic count and enterobacteriaceae reduction on naturally contaminated food boxes, crates, conveyor belts, and meat knives." *Journal of Food Protection* 78 (2):430-435.
- Northcutt, J. K., et M. E. Berrang. 2006. "Influence of a chicken transport cage-washing system on wastewater characteristics and bacteria recovery from cage flooring." *Journal of Applied Poultry Research* 15 (3):457-463.
- Ramesh, N., S. W. Joseph, L. E. Carr, L. W. Douglass, et F. W. Wheaton. 2003. "Serial disinfection with heat and chlorine to reduce microorganism populations on poultry transport containers." *Journal of Food Protection* 66 (5):793-797.
- N Rose, J.P Mariani, P Drouin, J.Y Toux, V Rose, P Colin, 2003. "A decision-support system for Salmonella in broiler-chicken flocks." *Preventive Veterinary Medicine* 59: 27-42.

## 6.2. Législation et réglementation

- Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32004R0853>

- Règlement n°1/2005 Conseil relatif à la protection des animaux pendant le transport et les opérations annexes. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=LEGISSUM%3Af83007>
- Règlement (CE) n°2016/429 du Parlement européen et du Conseil du 9 mars 2016 relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le domaine de la santé animale («législation sur la santé animale»). <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R0429&qid=1516022863871&from=EN>

ANNEXE 4 : TEXTE DE SAISINE



SDSPA-2017-876-D

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

**Direction Générale de l'Alimentation**  
**Service des actions sanitaires en**  
**production primaire**  
**Sous-direction de la santé et de la**  
**protection animales**  
**Bureau de la santé animale**  
Adresse : 251, rue de Vaugirard  
75 732 PARIS CEDEX 15  
Dossier suivi par : Mounira BOUBRIT  
Téléphone : 01 49 55 59 98  
Réf. Interne : 1710125

Le Directeur Général de l'Alimentation  
au  
Directeur Général de l'Agence  
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,  
de l'environnement et du travail

Paris, le 27 OCT. 2017

**Objet:** Demande d'appui scientifique et technique sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transports d'oiseaux vivants vis à vis du risque d'influenza aviaire.

Conformément aux articles L. 1313-1 du Code de la santé publique, j'ai l'honneur de solliciter un appui scientifique et technique de l'ANSES sur les procédures de contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection des moyens de transports d'oiseaux vivants vis à vis de l'influenza aviaire.

Le projet d'arrêté en cours relatif aux mesures de prévention de la propagation des maladies via le transport d'oiseaux vivants (voir P.J.) prévoit dans son article 9 le contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection. Le transporteur met en place un plan de contrôle visuel et microbiologique pour s'assurer de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection vis à vis du risque d'influenza aviaire. En parallèle, les DDPP peuvent être amenées également à réaliser des contrôles visuels et microbiologiques, officiels.

Les questions portent plus précisément sur la réalisation des contrôles microbiologiques, avec les questions suivantes :

1. les modalités d'échantillonnage : nombre de prélèvements à réaliser par véhicule contrôlé et type de prélèvements (boîte de gélose contact, écouvillon ou chiffonnettes), les types de surfaces devant faire l'objet de prélèvement (caisses, hayon, ..) ;
2. les micro-organismes ciblés pour vérifier la réduction bactérienne (flore totale, streptocoques fécaux notamment) ainsi que les seuils d'interprétation de ces analyses de dénombrement.

Je vous remercie de bien vouloir nous faire connaître vos éléments de réponse d'ici le 30 novembre 2017.

Je vous remercie de bien vouloir accuser réception de la présente demande.

Le Directeur Général de l'Alimentation,  
Patrick CHEAUMONT