

**ETUDE DESOC : DES ALTERNATIVES A L'UTILISATION DU FORMALDEHYDE
POUR LA DESINFECTION DES ŒUFS A COUVER : LE DCCNA
ET L'H₂O₂ VAPEUR A 30%**

**Puterflam Julie¹, Guillot Aurore¹, Tavares Manuel², Galliot Pascal¹,
Huneau-Salaün Adeline², Maris Pierre³, Keita Alassane²**

¹ITAVI-UMT SANIVOL- 41 rue Beaucemaine- 22440 PLOUFRAGAN,

²ANSES-UMT SANIVOL- Laboratoire de Ploufragan-Plouzané- BP53,
22440 PLOUFRAGAN

³ANSES, Labo. d'étude et de recherche sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants,
35302 Fougères

puterflam@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

La désinfection des œufs est une étape primordiale pour limiter la contamination de l'embryon par des agents pathogènes. En 2004, le formaldéhyde, utilisé depuis longtemps dans ce but comme substance de référence, a été reconnu cancérigène avéré par le Centre International de Recherche sur le Cancer. Dès lors, la réglementation imposait aux professionnels utilisant cette molécule la recherche de solutions de substitution.

Dans ce contexte, l'ITAVI et l'ANSES dans le cadre de l'UMT SANIVOL, et en collaboration avec le Syndicat National des Accouveurs, ont mis en place une série d'études visant à rechercher des méthodes alternatives pour la désinfection des œufs à couver. Quatre produits autorisés selon le Règlement Biocide 528/2012 ont été testés en dispositif expérimental sur des œufs issus d'un couvoir commercial : le dichloroisocyanurate de sodium (DCCNa), l'acide hypochloreux, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), diffusé à 6 % en phase liquide ou à 30 % n phase gazeuse. L'objectif était de caractériser ces procédés de décontamination vis-à-vis de leur efficacité bactéricide, de l'impact sur l'exposition du manipulateur, de l'impact sur l'embryon et sur la qualité et la croissance du poussin. Les résultats indiquent que deux procédés sont satisfaisants au regard de ces critères : le DCCNa et l'H₂O₂ vapeur à 30 %. Mais lorsqu'on tient compte de l'investissement nécessaire, le DCCNa est avantagé par rapport au H₂O₂ car plus viable économiquement.

ABSTRACT

Alternatives of using formaldehyde for hatching eggs disinfection: DCCNa and vapor H₂O₂ 30%

The disinfection of hatching eggs is an essential step to limit their contamination by pathogens. In 2004, formaldehyde, which has long been used for this purpose as a reference substance, was found to be a carcinogen product by the International Centre for Research on Cancer. Therefore, the professionals using this molecule had to look for alternative products. In this context, ITAVI and ANSES as members of the UMT SANIVOL, and in collaboration with the French National Union of Hatcheries have carried out several studies in order to find alternative methods for hatching egg disinfection. Four methods fulfilling the biocide Directive were tested on experimental eggs obtained from a commercial hatchery: sodium dichloroisocyanurate (DCCNa), hypochloric acid, hydrogen peroxide (H₂O₂) at 6% released in the liquid phase, or at 30% vapor. The objective was to characterize these decontamination processes according to their bactericidal efficacy, their impact on the exposure of the manipulator, their impact on the embryo and the quality and growth of the chick. The results indicate that two methods were satisfactory regarding these criteria: DCCNa and H₂O₂ vapor at 30%. However, when considering the investment required, the DCCNa is cheaper and then more economically acceptable than the H₂O₂.

INTRODUCTION

Les œufs à couver (OAC) issus des troupeaux de volailles reproductrices sont désinfectés dans le but, d'une part de protéger l'embryon d'un risque de contamination microbiologique pouvant être à l'origine de pertes économiques importantes pour le secteur de l'accoupage, et d'autre part de protéger le consommateur (Berrang et al., 1999).

Le formaldéhyde, reconnu pour son efficacité bactéricide et son intérêt économique, a longtemps été utilisé par les entreprises d'accoupage. Or, il a été démontré qu'il était susceptible d'interagir rapidement avec les différents composants organiques des cellules, engendrant des effets néfastes sur l'organisme (Maison et al., 2008). Au vu du danger lié à l'exposition des travailleurs, le formaldéhyde a été reconnu en 2004 par le centre international de la recherche sur le cancer comme cancérigène avéré. Depuis, des mesures de protection ont été prises par les pouvoirs publics, imposant aux professionnels utilisateurs de cette matière active la recherche de solutions de substitution.

Dans ce contexte, L'UMT SANIVOL (regroupant l'ITAVI et l'Anses de Ploufragan), a été missionné par le Syndicat National des Accoupeurs pour la mise en place d'études visant à rechercher des méthodes alternatives innovantes de désinfection des OAC. Ces méthodes doivent répondre à un certain nombre d'exigences d'ordre réglementaire et technique : efficacité bactéricide, innocuité pour l'embryon et le manipulateur. Elles doivent également être compatibles avec les contraintes liées aux conditions de production. Quatre produits autorisés selon le Règlement Biocide 528/2012 qui autorise la mise sur le marché de certaines substances biocides ont donc été testés en dispositif expérimental sur des œufs issus d'un couvoir commercial.

MATERIELS ET METHODES

1.1. Phases de l'étude

L'étude a été réalisée en 3 phases successives:

La première phase afin de tester les procédés candidats pour leur impact sur l'évolution d'indicateurs biologiques liés à la contamination coquillière, sur l'exposition du manipulateur, et sur les animaux. A l'issue de cette phase seuls les produits permettant une réduction significative des indicateurs biologiques tout en respectant les seuils d'exposition réglementaires ont été conservés pour les phases suivantes,

La seconde phase pour confirmer les résultats des produits retenus, pour les critères : réduction de l'indicateur biologique et exposition humaine. A l'issue de cette phase, on retiendra le produit satisfaisant les critères cités, et également compatible avec les contraintes économiques des couvoirs.

La troisième phase afin d'avoir un second niveau de validation de l'efficacité bactériologique du produit sélectionné et observer l'impact sur l'embryon en comparaison avec un lot témoin non traité.

1.2. Conditions des tests de décontamination

Les différents traitements de décontamination ont été pratiqués sur des OAC triés (élimination des œufs cassés, fêlés...) et visuellement propres, placés sur un chariot d'incubation. L'opération a été réalisée en salle de désinfection étanche d'un volume de 32 m³. Pour la phase 1, 3840 œufs ont été désinfectés par groupe de traitement ; 60 l'ont été pour de la phase 2, et enfin 4800 pour la phase 3. Pour chaque groupe de traitement les œufs étaient issus d'un même parquet de reproducteurs. Précisons que le nombre important d'OAC utilisés pour les phases 1 et 3 s'explique par le fait que ceux-ci sont introduits dans le processus d'incubation, contrairement aux OAC de la phase 2.

1.3. Produits de désinfection testés et matériel d'application

Les produits testés sont le formaldéhyde 97% (témoin) appliqué par vapeur à l'aide d'une plaque électrique, le DCCNa à 1500 ppm (dichloroisocyanurate de sodium) appliqué par aérosolisation à l'aide d'un thermonébulisateur générant des particules de 5 µ, l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) à 6 % appliqué en phase liquide (brumisation) par un nébulisateur générant des particules de 5-10 µ, et à 30% appliqué en phase gazeuse (vapeur sèche) à l'aide d'un générateur d'H₂O₂ gazeux, et l'acide hypochloreux obtenu à partir d'une solution saturée de chlorure de sodium par activation électrochimique et appliqué en phase liquide (brumisation).

1.4. Critères mesurés

1.4.1. Indicateur d'efficacité bactéricide

L'efficacité bactéricide des procédés de désinfection a été évaluée par le biais d'analyses bactériologiques visant à déterminer le niveau de contamination des coquilles en flore aérobie mésophile totale (FAMT). Dans chaque groupe de traitement, un nombre équivalent d'œufs témoins non traités et traités (60 pour la phase 2 et 99 pour les phases 1 et 3) ont été envoyés au laboratoire LABOCEA où a été réalisé un dénombrement de la FAMT sur la surface de 3 œufs poolés selon la norme XP V 08-34. Les résultats obtenus sont exprimés en Unités Formant Colonies (UFC) pour la surface de 3 œufs puis transformés en log UFC/œuf. La comparaison entre le niveau de contamination moyenne en FAMT des œufs traités et des témoins non traités permet d'évaluer la réduction

de contamination et donc l'efficacité bactéricide des procédés.

1.4.2. Indicateur d'exposition des manipulateurs

L'exposition réelle des manipulateurs aux désinfectants chimiques a été évaluée par l'analyse du niveau de contamination de l'air ambiant après application. Les prélèvements d'air ont été réalisés à hauteur des voies respiratoires pendant une durée de 15 min à l'aide d'une pompe étalonnée et calibrée à 1 l/min. Les niveaux d'exposition aux composés potentiellement toxiques ont été mesurés à l'aide de capteurs et de cassettes de prélèvement spécifiques fournies par le laboratoire toxicologique Toxilabo de Nantes (44). Le risque d'exposition est évalué en comparant la valeur la plus élevée relevée à la VLCT (valeur limite court terme) réglementaire définie pour chaque composé testé par le ministère du travail (arrêté du 9 mai 2012) : 1,5 mg/l pour le trichlorure d'azote ; 1,5 mg/l pour les composés solubles du chlore et jusqu'à 7,5 mg/l pour l'H₂O₂.

1.4.3. Indicateur d'innocuité sur l'embryon, sur le poussin et sur la croissance des animaux

Afin d'évaluer l'impact de la désinfection chimique des OAC sur l'embryon, les œufs traités (phases 1 et 3) ont été incubés et éclos. Les performances embryonnaires ont été relevées pour chaque procédé de désinfection : taux de fertilité, taux d'éclosion, taux d'éclosabilité. Après éclosion, le score de Tona a été réalisé sur 100 poussins par procédé de désinfection de manière à évaluer la qualité des poussins en se basant sur les indicateurs qualitatifs : activité, apparence, aspect des yeux, des pattes, du nombril et caractéristiques du jaune (Tona et al., 2005). Les poussins ont par ailleurs été pesés individuellement. A l'issue de l'éclosion, les poussins ont été élevés dans un bâtiment d'élevage de l'Anses de Ploufragan pendant 32 jours. Ils ont été pesés à la mise en place et à chaque changement d'aliment. Les taux de mortalité ont été relevés ainsi que les consommations d'aliment. L'indice de consommation a été calculé par parquet à J11, J21, J28 et J32.

1.5. Traitements statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel R. Le niveau de contamination en FAMT des œufs, la qualité des poussins (poids et score de Tona) et leurs performances zootechniques (poids et IC) ainsi que les performances embryonnaires ont été comparées entre groupes par une ANOVA (fonction AovSum) à un facteur, ou par son équivalent non paramétrique (test de Kruskal Wallis), si les conditions d'application de l'ANOVA n'étaient pas respectées. Lorsque la différence globale entre groupes était significative, l'effet bactéricide du traitement par rapport au témoin non traité a été évalué par le test de comparaison multiple de moyennes de Tukey ou par son équivalent non paramétrique : test de kruskalmc

du package pgirmess. Le seuil de signification retenu est $p < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. 1. Efficacité bactéricide

Les résultats de FAMT sont présentés dans le tableau 1. La FAMT moyenne des coquilles d'OAC témoins est de 5,7 log UFC/œuf lors de la phase 1 ; 5,0 log UFC/œuf lors de la phase 2 et 7,3 pour la phase 3. Pour les phases 1 et 2, ce niveau de contamination est cohérent avec celui décrit dans la littérature (soit environ 4 à 5 log UFC/œuf, (Protais et al, 2003). Il est par contre un peu plus élevé pour la phase 3. Deux produits (voir tableau 1) permettent donc de réduire d'au moins 1 log UFC/œuf et de façon significative la FAMT de coquille par rapport au témoin non traité: H₂O₂ 30 % (réduction d'1,0 log) et DCCNa (réduction d'1,3 log). Lors de la phase 2, cette efficacité est renouvelée, avec des réductions significatives et proches de celles obtenues avec le formaldéhyde. Lors de la phase 3, le DCCNa a permis une réduction de la FAMT d'environ 2,5 log mais le niveau de contamination du témoin était également plus élevé que pour les phases 1 et 2.

2.1.2. Exposition des manipulateurs

Les mesures d'exposition réalisées pour l'H₂O₂ 30 % indiquent que la concentration en résidus relevée dans l'air à la fin du cycle de désinfection ne dépasse pas la VLCT (3,1 vs 7,5 mg/m³). Il en est de même pour le DCCNa : les concentrations en résidus de composés solubles du chlore et de trichlorure d'azote, respectivement de 0,36 mg/m³ et 0,63 mg/m³ lors de la première phase et 0,77 et 1,1 lors de la phase de validation, ne dépassent pas la VLCT de 1,5 mg/m³ fixée pour ces deux composés. Il est à noter au sujet des autres procédés, que la concentration en H₂O₂ 6 % résiduelle est supérieure à la VLCT à l'issue du cycle de désinfection (14,3 mg/m³ vs 7,5 mg/m³). Par ailleurs, il n'existe pas d'indicateur réglementaire pour mesurer l'exposition au procédé acide hypochloreux.

Au vu des résultats pour les indicateurs précédents, les produits sélectionnés pour les phases suivantes sont le DCCNa et l'H₂O₂ 30%.

2.1. 3. Impact sur l'embryon

Il n'y a pas d'effet significatif du traitement sur les performances embryonnaires (analyses sur l'ensemble des lots testés lors de la phase 1). Toutefois, le tableau 2 montre que l'H₂O₂ 30 % permet d'obtenir de meilleurs résultats d'éclosion (pourcentage d'œufs non éclos, d'œufs clairs, de poussins de premier choix et de poussins de second choix), comparé au DCCNa. Lors de la phase 3 (Tableau 2), aucune différence significative n'a été notée entre les groupes DCCNa et témoin concernant les résultats d'éclosion :

respectivement 8,7 et 8,1% d'œufs clairs, 73,7 et 75,2% de poussins de premier choix.

2.1. 4. Impact sur la qualité du poussin et la croissance

Quelles que soient les phases (1 ou 3), les poussins adressés au laboratoire pour des analyses bactériologiques n'ont révélé que des germes banaux. Lors de la phase 1, les poussins issus des œufs traités par le DCCNa sont significativement plus lourds que ceux traités avec l'H₂O₂ 30 % (44,7 g vs 43,2 g). Mais au final, à J28, aucune différence significative n'a été notée entre groupes concernant le poids moyen et l'indice de consommation. Par ailleurs, les traitements n'ont pas d'effet significatif sur les scores de Tona des poussins. Lors de la phase 3 (tableau 3), aucune différence significative n'a été notée, à aucune date, entre les poids moyens des animaux des deux groupes. Il n'y a pas non plus de différence sur les scores de Tona ni sur l'indice de consommation. Ce résultat signifie qu'il n'y a pas d'effet négatif du DCCNa, ni sur la qualité du poussin ni sur ses performances ultérieures. La plupart des études (Bailey et al., 1996, Durmus 2012) portant sur la désinfection des OAC comparent l'effet de désinfectants sur les résultats d'éclosion mais ne traitent pas des performances ultérieures et ne font pas éclore des œufs non désinfectés. Notre étude est originale de ce point de vue. Le fait de n'avoir aucune différence de performances d'éclosion ni de croissance, que les œufs soient ou non désinfectés, peut être dû au fait que nous n'avons travaillé que sur des œufs triés et propres. Par ailleurs, cette étude se déroule dans de bonnes conditions sanitaires (en particulier pas de salmonelles, ni au couvoir ni en

bâtiment d'élevage, qui sont des germes susceptibles de pénétrer les structures externes de l'œuf, selon Berrang et al., 1999). Nos résultats sont cependant conformes avec ceux de Brake et Sheldon (1990) qui n'ont trouvé aucune différence significative entre les performances d'éclosion d'œufs traités avec un ammonium quaternaire (à 1,5 et 3,0 %) et issus de parquets de 36, 42, 46 ou 62 semaines en comparaison avec un lot témoin non traité. Seuls les œufs issus de parquets de 32 semaines avaient des performances améliorées par rapport à ce témoin. Nos résultats, de ce point de vue, ne peuvent donc pas être extrapolés à des situations de terrain, où non seulement le contexte sanitaire peut être moins favorable, en particulier celui concernant les virus (Berrang et al., 2000).

CONCLUSION

Notre étude a permis de sélectionner deux produits de désinfection couplés à des procédés d'application spécifiques : le DCCNa thermonébulisé et l'H₂O₂ 30% vapeur qui répondent à la fois aux exigences d'efficacité bactéricide, de non exposition du manipulateur et d'innocuité vis-à-vis du poussin et de son devenir en élevage. Mais lorsque l'on rajoute l'investissement nécessaire, le DCCNa est avantagé par rapport à l'H₂O₂ 30% car plus viable économiquement. C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur le DCCNa pour la validation finale de ce projet. Toutefois, il serait intéressant de renouveler des tests en utilisant du H₂O₂ 30% appliqué par le biais d'un procédé plus compatible avec les contraintes économiques des couvoirs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bailey, J.S., Buhr, R.J., Cox, N.A., Berrang, M.E., 1996. *Poult.Sci.*, 75: 191-196
2. Berrang, M. E., Cox, N. A., Frank, J. F., Buhr, R. J., 1999. *The Journal of Applied Poultry Research*, 8(4): 499-504.
3. Berrang, M. E., Cox, N. A., Frank, J. F., Buhr, R. J., Bailey, J.S., 2000. *The Journal of Applied Poultry Research*, 9: 279-284.
4. Brake, J., Sheldon B.W., 1990. *Poult.Sci.*, 69 (4): 517-525
5. Durmus, I., 2012. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7 (8) : 739-744
6. Maison A., Pasquier E., 2008. *Inrs* (3). Le point des connaissances sur : Le formaldéhyde.
7. Tona, K., Bruggeman, V., Onagbesan, O., Bamelis, F., Gbeassor, M., Mertens, K., and Decuyper, E., 2005. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 16:109-119.

Tableau 1. Flore aérobie mésophile totale (log UFC/œuf) selon le groupe (phase 1, n=33/groupe, phase 2, n=20/groupe, phase 3, n=33/groupe)

		Témoin négatif	Formol	H2O2 30%	DCCNa	Acide hypochloreux	H2O2 6%
Phase 1	FAMT	^a 5,7±0,3	*2,9±1,1	^{bc} 4,7±0,7	^c 4,4±1,2	^{ab} 5,2±0,6	^{ab} 5,2±0,5
	Réduction par rapport au témoin négatif		2,8	1,0	1,3	0,5	0,5
Phase 2	FAMT	^b 4,98±0,25	^a 2,71±0,64	^a 2,80±0,90	^a 3,22±0,59		
	Réduction par rapport au témoin négatif		2,27	2,18	1,76		
Phase 3	FAMT	^b 7,32±0,42			^a 4,85±0,78		
	Réduction par rapport au témoin négatif				2,47		

*Les résultats du formol n'ont pas été considérés car le temps d'application a été trop long

^{a,b,c} Sur une ligne, les moyennes (+/- écart type) avec des lettres différentes diffèrent significativement

Tableau 2. Performances moyennes d'éclosion (% +/- écart type) selon le groupe (phase 1 et 3, n=32/groupe)

	Phase 1		Phase 3	
	H2O2 30%	DCCNa	Témoin négatif	DCCNa
Poussins de 1 ^{er} choix	83,2±2,6	74,1±10,7	75,0±8,2	73,7±10,0
Poussins de 2 ^{eme} choix	0,8±0,9	2,1±1,2	3,6±1,4	4,0±2,3
Œufs clairs	11,6±2,3	14,3±2,7	8,0±1,8	8,5±2,5
Œufs non éclos	4,3±1,9	9,5±8,4	13,4±6,5	13,8±7,8

Tableau 3. Poids des poulets (g) selon le groupe (phase 3, n=100/groupe pour le poids au couvoir et 250/groupe pour les autres)

	Témoin négatif	SEM	DCCNa
Poids au couvoir (g)	44,8	0,3	44,8
Poids J11 (g)	317,7	1,5	318,9
Poids J21 (g)	970,4	5,2	971,1
Poids J28 (g)	1528,0	8,1	1527,0