

I. N. R. A.
Groupe de Laboratoires de Pathologie Aviaire
Route de Thiverval
78850 THIVERVAL GRIGNON

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LA FLORE BACTÉRIENNE DANS LA TRACHÉE DU POULET SAIN

Maryvonne DHO et C. MOULINE

Institut National de la Recherche Agronomique, C.R. de Tours-Nouzilly
Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, 37380 Monnaie, France

Summary

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE BACTERIAL FLORA IN THE TRACHEA OF HEALTHY CHICKENS. — The bacterial flora of the trachea of 17 to 38 day old chickens was quantitatively and qualitatively studied in two groups of animals from two different sources: an experimental disease-free flock and a commercial flock. In both groups of chickens, the aerobic flora consisted predominantly of *Escherichia coli* (*E. coli*), *Streptococcaceae*, *Micrococcaceae* and members of the genus *Lactobacillus*. Some differences between the two groups of animals were observed at the species level. Strictly anaerobic bacteria did not appear until the third week. No bacterial group seemed to predominate during the sampling period. The constant presence of *Lactobacilli* and *E. coli* in the trachea suggests that these organisms could play a prominent role in the bacterial ecosystem of the trachea.

Les voies respiratoires supérieures du poulet sain sont colonisées par une flore bactérienne variée, présente jusque dans la trachée. Plusieurs auteurs en ont donné des descriptions qualitatives permettant d'affirmer la présence de bactéries à Gram positif, majoritaires: *Corynebacterium*, *Streptococcaceae*, *Micrococcaceae*, mais aussi de bactéries à Gram négatif: *Enterobacteriaceae*, *Pasteurella* (Price *et al.*, 1957; Smibert *et al.*, 1958; Asnani et Pathak, 1975; Mushin *et al.*, 1980; Sambyal et Baxi, 1980).

Ces données ne précisent cependant pas les tailles de population respectives des espèces bactériennes en présence, souvent en relation avec leur rôle écologique (Fuller, 1977; Raibaud *et al.*, 1977) ou pathologique (Oudar *et al.*, 1977).

Chez le poulet, la population de colibacilles de la trachée, par exemple, peut être significativement réduite par la présence d'une flore bactérienne (Dho et Lafont, 1982). Certains de ces colibacilles, habituellement présents dans les voies

respiratoires supérieures du poulet sain sont aussi des pathogènes occasionnels capables d'agir en synergie avec d'autres agents infectieux (mycoplasmes, virus) dans le syndrome «maladie respiratoire chronique» (Gross, 1961; Harry et Hemsley, 1965).

Nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative de la flore trachéale pour tenter de préciser quelles espèces bactériennes, par l'importance relative de leur population et la permanence de leur présence, étaient susceptibles d'avoir un rôle écologique et, peut-être, d'influer sur le nombre d'*Escherichia coli*.

Matériel et Méthodes

Animaux

La flore trachéale de 12 poulets a été étudiée. Six d'entre eux provenaient d'un lot de 30 poulets de race Leghorn blanche, souche PA12, de

l'élevage protégé de la Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie. L'élevage était mené en cage conformément aux principes définis par Aycardi et Schellenberg (1970). Les six autres poulets provenaient d'un lot de 5 000 poulets de chair, de souche Vedette INRA, élevés au sol sur litière de paille dans un élevage commercial de la région. Aucun trouble pathologique n'a été constaté chez les poulets de ces deux lots qui n'ont été soumis à aucune thérapeutique antibiotique.

Numération bactérienne

Après broyage des trachées en bouillon au thioglycolate résazurine (Institut Pasteur Production, Marnes-la-Coquette, France) selon la technique précédemment décrite (Dho et Lafont, 1981), les numérations bactériennes ont été réalisées sur milieux gélosés à partir de dilutions des broyats. Les milieux ont été choisis en fonction des groupes bactériens recherchés. La flore totale anaérobie a été numérée dans le milieu Reinforced Clostridial agar (Oxoid, London, Great Britain) ensemencé en surfusion puis coulé en tubes longs (500 × 9 mm). Les autres groupes bactériens ont été numérés après ensemencement par étalement en surface des milieux suivants: Brain Heart Infusion agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) pour la flore totale aérobie; gélose lactosée de Drigalski et gélose Eosine-Bleu de Méthylène (Institut Pasteur Production) pour la famille des *Enterobacteriaceae*; gélose de Man, Rogosa et Sharpe (Institut Pasteur Production) pour le genre *Lactobacillus*, milieu de Chapman (Institut Pasteur Production) pour la famille des *Micrococcaceae*, *M. enterococcus* agar (BBL, Cockeysville, USA) pour la famille des *Streptococcaceae*.

Les lectures ont été faites après 24 h d'incubation à 37° C pour les entérobactéries et les lactobacilles et après 48 h d'incubation à 37° C pour les autres groupes bactériens, en notant la morphologie des colonies.

Pour chaque trachée, les numérations directes ont été systématiquement complétées par des enrichissements pour détecter les bactéries présentes en faible nombre (< 10² par trachée). Des fractions de 1 ml de broyat ont ainsi été incubées en bouillon SF medium (Difco Laboratories) 48 h à 42° C, en bouillon nutritif hypersalé à 5 % 48 h à 37° C et en bouillon au thioglycolate résazurine 48 h à 37° C. La présence de bactéries était ensuite détectée sur quatre milieux gélosés sélectifs: *M. enterococcus* agar, milieu de Chapman, gélose lactosée de Drigalski et gélose de Mau, Rogosa et Shape.

Identification des espèces bactériennes

Seule l'identification des bactéries poussant en aérobiose a été effectuée. Pour chaque poulet, deux colonies de chaque type morphologique ont

été prélevées sur le milieu Brain Heart Infusion agar, ainsi que cinq colonies sur chacun des milieux sélectifs.

Après vérification de la pureté, une première orientation a été donnée par l'examen microscopique à l'état frais, la coloration de Gram, la recherche du type respiratoire et de la catalase. Les caractéristiques biochimiques ont ensuite été recherchées par des microméthodes standardisées (API System SA, Montalieu-Vercieu, France).

Des tests complémentaires ont été réalisés pour le genre *Staphylococcus*: recherche d'une staphylocoagulase, résistance à la lysostaphine et à la novobiocine.

Un nom d'espèce a été attribué, lorsque cela était possible, selon les références suivantes: *Enterobacteriaceae*, API System, notice API 20E (Montalieu-Vercieu, France); *Lactobacillus* (Rogosa, 1974); *Streptococcus*, API System, notice API 20 STREP (Montalieu-Vercieu, France); *Staphylococcus* (Kloos et Schleifer, 1975). Pour certaines souches appartenant au genre *Staphylococcus* et pouvant correspondre à deux espèces voisines, le choix a résulté d'un calcul de probabilités prenant en compte les pourcentages des réponses aux tests biochimiques observés par Kloos et Schleifer (1975).

L'espèce n'a pas été précisée dans le cas des genres bactériens rarement isolés tels *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*...

Résultats

Pour les six poulets PA12 ainsi que pour les six poulets Vedette INRA, le nombre total de bactéries par trachée était compris entre 10² et 10⁵. Aucun des groupes bactériens identifiés n'a dominé quantitativement les autres de façon permanente pendant la durée de l'observation (tabl. 1).

Les différences entre groupes bactériens ont surtout concerné la cinétique de leur implantation et la permanence de leur présence dans la trachée. Les bactéries anaérobies, absentes chez les poulets de deux semaines sont apparues progressivement à partir de la quatrième semaine. Par contre, la flore totale aérobie semblait déjà établie dès la deuxième semaine après l'éclosion. Deux groupes bactériens étaient présents chez tous les poulets: les entérobactéries uniquement représentées par *Escherichia coli* à une exception près (poulet PA12.1) et les lactobacilles avec une espèce dominante dans les deux lots: *Lactobacillus salivarius* (tabl. 2). La présence de cocci à Gram positif appartenant majoritairement aux genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* s'est révélée plus aléatoire bien que le nombre de ces

bactéries par trachée ait parfois approché celui des lactobacilles. Quelques bactéries ont été isolées de façon transitoire et généralement sur des milieux de culture sélectifs: *Bacillus sp.* sur milieu de Chapman, *Aeromonas sp.* sur gélose lactosée de Drigalski, corynéformes sur milieux de Chapman et Drigalski.

L'identification des espèces et, dans certains cas, des sous-espèces bactériennes a révélé des différences entre les deux lots de poulets (tabl. 2). *L. salivarius subsp. salicinus* est restée l'espèce dominante chez les poulets PA12 (88 % des isollements); chez les poulets Vedette INRA, par contre, *L. salivarius subsp. salivarius* a représenté 95 % des isollements jusqu'au vingt-huitième jour pour être ensuite remplacé par *L. casei subsp. rhamnosus*. Les biotypes de *E. coli* étaient également différents dans les deux lots de poulets. Chez les poulets PA12, 92 % des *E. coli* isolés ont fermenté le mélibiose et tous ont hydrolysé l'ONPG, alors que chez les poulets Vedette INRA, tous les *E. coli* isolés ont fermenté le mélibiose et 40 % seulement ont hydrolysé l'ONPG. La variété des espèces a été plus importante parmi les cocci à Gram positif que parmi les bacilles pour les deux lots de poulets. Plusieurs biotypes ont été isolés pour chaque espèce: *Staphylococcus simulans* a dominé chez les poulets PA12 (70 % des isollements, deux biotypes) alors que *S. epidermidis* a été le plus fréquemment isolé des poulets Vedette INRA (37 % des isollements, cinq biotypes). Le

poulet PA12.6 a représenté une exception parmi les 12 poulets étudiés par sa flore aérobique à la fois la plus abondante et la plus variée.

Discussion

La stérilité des trachées qui semble être la règle pour Garg et Sethi (1970) n'a pas été confirmée par notre étude. Les quatre groupes bactériens qui composaient la flore aérobique permanente de nos poulets (*Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Micrococcaceae* et *Streptococcaceae*) ont déjà été décrits dans le tractus respiratoire des volailles par de précédents auteurs (Price *et al.*, 1957; Smibert *et al.*, 1958; Asnani et Pathak, 1975; Sambyal et Baxi, 1980). La présence de lactobacilles n'avait cependant été détectée que par les auteurs ayant utilisé des milieux sélectifs (Smibert *et al.*, 1958).

Nous n'avons pas isolé certaines espèces signalées occasionnellement telles que *Proteus sp.* (Sambyal et Baxi, 1980) ou *Alcaligenes faecalis* (Bisgaard, 1977). Aucune *Salmonella* n'a été identifiée, ce qui est en accord avec le bon état sanitaire des deux troupeaux. *Pasteurella haemolytica*, composant habituel de la flore trachéale du poulet adulte (Mushin *et al.*, 1980) n'a pas été isolée, ce qui semble conforme aux observations de Bisgaard (1977) pour lequel cette bactérie n'apparaît qu'à partir de la cinquième semaine après l'éclosion.

Tableau 1. — Évolution de la flore bactérienne trachéale chez des poulets âgés de 17 à 38 jours.

Nombre de bactéries /trachée ^a (x 10 ²)	Age des Poulets											
	17 Jours				28 Jours				38 Jours			
	PA12.1 ^c	PA12.2	Ved.1 ^c	Ved.2	PA12.3	PA12.4	Ved.3	Ved.4	PA12.5	PA12.6	Ved.5	Ved.6
Flore totale anaérobique	0,3	0,1	70	30	10	25
Flore totale aérobique ^b	51	11	12	14	26	2	35	84	8,5	1 200	100	510
<i>Enterobacteriaceae</i>	+ ^a	8,2	4	12	2	+	30	42	2	80	13	400
<i>Lactobacillus</i>	89	52	4	20	4,5	29	35	140	520	10 ⁶	140	7
<i>Micrococcaceae</i>	4	...	17	+	5,4	24	4,5	32	390	54
<i>Streptococcaceae</i>	4	...	1	+	...	8	...	23	62	6,5
Autres	49	3,6	1	2	1 000

a : ..., aucune bactérie décelée après enrichissement; +, présence de bactéries décelée après enrichissement.

b : ne comprend pas les lactobacilles dont la croissance est partiellement inhibée sur le milieu Brain Heart Infusion Agar.

c : PA12.1 à PA12.6, poulets de souche PA12, élevage protégé; Ved.1 à Ved.6, poulets de souche Vedette INRA, élevage commercial.

Tableau 2a. — Espèces bactériennes identifiées dans les trachées de poulets âgés de 17 à 38 jours provenant d'un élevage protégé (souche PA12).

Espèces bactériennes	Poulets de souche PA12					
	17 jours		28 jours		38 jours	
	PA12.1	PA12.2	PA12.3	PA12.4	PA12.5	PA12.6
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>						
subsp. <i>salicinus</i>	+	+	+	+	+	+
subsp. <i>salivarius</i>
<i>L. casei</i>						
subsp. <i>rhamnosus</i>
<i>L. fermentum</i>	+
<i>Lactobacillus sp. aérobie</i>	+
<i>Lactobacillus sp. anaérobie</i>
<i>Staphylococcus xylosum</i>	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	...
<i>S. simulans</i>	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+
<i>S. cohnii</i>
<i>Staphylococcus sp.</i>
<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+
<i>S. faecium</i>						
subsp. <i>casseliflavus</i>	+
subsp. <i>durans</i>
<i>S. sanguis type 2</i>
<i>Aeromonas sp.</i>	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+
Corynéformes	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+

La méthodologie utilisée nous a permis de distinguer les groupes bactériens dont l'importance numérique relative est associée à la permanence de la colonisation (*Lactobacillus*, *E. coli*) de ceux qui, bien que pouvant atteindre des populations élevées, ne sont que transitoires dans la trachée (corynéformes). Ces résultats laissent supposer un rôle prépondérant des lactobacilles et des entérobactéries au niveau de l'écosystème bactérien de la trachée.

A l'exception des travaux de Smibert (1958), la présence de bactéries anaérobies dans les voies respiratoires n'a généralement pas été recherchée. Nos résultats mettent en évidence leur implantation dans la trachée, en relation chronologique avec leur apparition dans le tractus digestif (Lev et Briggs, 1956a, b). La persistance de ce groupe bactérien reste à déterminer chez des poulets plus âgés ainsi que son rôle écologique qui ne peut être actuellement que soupçonné, par analogie avec les relations bactériennes mises en évidence dans des écosystèmes intestinaux.

La comparaison des deux lots de poulets montre une homogénéité des groupes bactériens qui composent la flore de la trachée; des différences n'apparaissent qu'au niveau des espèces, parfois même seulement des sous-espèces. Il semble ainsi que la flore bactérienne de la trachée ne se constitue pas sous la seule dépendance des contaminations extérieures mais que d'autres facteurs, en particulier l'animal-hôte peuvent également intervenir.

Accepté pour publication, le 20 janvier 1983.

Remerciements

Nous sommes reconnaissants à Annie Brée et à J.P. Lafont pour leurs précieux conseils. Nous tenons également à remercier J. Besnard de sa collaboration, ainsi que B. Poutrel qui nous a fourni les disques de lysostaphine.

Tableau 2b. — Espèces bactériennes identifiées dans les trachées de poulets âgés de 17 à 38 jours provenant d'un élevage commercial (souche Vedette INRA).

Espèces bactériennes	Poulets de souche Vedette INRA					
	17 jours		28 jours		38 jours	
	Ved.1	Ved.2	Ved.3	Ved.4	Ved.5	Ved.6
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>						
<i>subsp. salicinius</i>
<i>subsp. salivarius</i>	+	+	+	+
<i>L. casei</i>						
<i>subsp. rhamnosus</i>	+	+	+
<i>L. fermentum</i>
<i>Lactobacillus sp. aérobic</i>
<i>Lactobacillus sp. anaérobic</i>	+	...
<i>Staphylococcus xyloso</i>	+	...	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	...	+	+	...	+
<i>S. simulans</i>
<i>S. aureus</i>
<i>S. cohnii</i>	+
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	+	...
<i>Micrococcus sp.</i>	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+
<i>S. faecium</i>						
<i>subsp. casseliflavus</i>	+	...
<i>subsp. durans</i>	+
<i>S. sanguis type 2</i>	+
<i>Aeromonas sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>
Corynéformes	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>

Résumé

La flore bactérienne de la trachée du poulet âgé de 17 à 38 jours a été étudiée quantitativement et qualitativement chez deux groupes d'animaux de provenance différente : un élevage protégé expérimental, et un élevage commercial. Dans les deux groupes de poulets, la flore croissant en aérobiose était essentiellement composée de *Escherichia coli*, de *Streptococcaceae*, de *Micrococcaceae*, et de représentants du genre *Lactobacillus*. Quelques différences ont été observées entre les deux groupes d'animaux au niveau des espèces les plus fréquentes. Les bactéries anaérobies strictes n'ont pas été détectées avant la troisième semaine. Aucun des groupes bactériens rencontrés n'a semblé prédominer numériquement au cours de la période de prélèvements. La présence constante de *Lactobacillus* et de *E. coli* suggère que ces organismes ont un rôle important dans l'écosystème bactérien de la trachée.

Références

- ASNANI P.J., PATHAK P.N., 1975. Bacteriological status of respiratory tract of normal fowls. *Indian J. Anim. Health*, **14**, 25-29.
- AYCARDI J., SCHELLENBERG P., 1970. Principes et techniques de l'élevage orthoxénique : application à l'aviculture industrielle. *Off. Int. Epizoot. Bull.*, **74**, 439-464.
- BISGAARD M., 1977. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 strains. *Avian Pathol.*, **6**, 285-292.

- DHO M., LAFONT J.P., 1981. Technique de numération des bactéries dans la trachée du poulet. *Ann. Rech. Vét.*, **12**, 239-242.
- DHO M., LAFONT J.P., 1982. *Escherichia coli* colonisation of the trachea in poultry : comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.*, **26**, 787-797.
- FULLER R., 1977. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br. Poult. Sci.*, **18**, 85-94.
- GARG D.N., SETHI M.S., 1970. Aerobic bacterial flora of the avian respiratory tract. *Haryana Agric. Univ. J. Res.*, **1**, 114-118.
- GROSS W.B., 1961. The development of "air-sac-disease". *Avian Dis.*, **5**, 431-439.
- HARRY E.G., HEMSLEY L.A., 1965. The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia. *Vet. Rec.*, **77**, 35-40.
- KLOOS W.E., SCHLEIFER K.H., 1975. Isolation and characterization of *Staphylococci* from human skin. *Int. J. System. Bacteriol.*, **25**, 62-79.
- LEV M., BRIGGS C.A.E., 1956a. The gut flora of the chick. I. The flora of newly hatched chicks. *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 36-38.
- LEV M., BRIGGS C.A.E., 1956b. The gut flora of the chick. II. The establishment of the flora. *J. Appl. Bacteriol.*, **19**, 224-230.
- MUSHIN R., WEISMAN Y., SINGER N., 1980. *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. *Avian Dis.*, **24**, 162-168.
- ODAR J.A., RICHARD Y.G., EUZEY J.P., 1977. Introduction à l'écologie microbienne animale. *Bull. Soc. Sci. Méd. Vét. Comp. Lyon*, **79**, 67-72.
- PRICE K.E., ZOLLI Jr Z., HARDIE W.B., GALLIAN M.J., 1957. Respiratory tract flora in CRD and effect of antibiotics in the feed. *Poult. Sci.*, **36**, 219-225.
- RAIBAUD P., DUCLUZEAU R., TANCREDE C., 1977. L'effet de barrière microbien dans le tube digestif : moyen de défense de l'hôte contre les bactéries exogènes. *Méd. Mal. Infect.*, **7**, 130-134.
- ROGOSA M., 1974. *Lactobacillus* in Cowan S.T., Holt J.G., Liston J., Murray R.G.E., Niven C.F., Ravin A.W., Stanier R.Y., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th ed., 576-593. Williams and Wilkins, Baltimore.
- SAMBHAL D.S., BAXI K.K., 1980. Bacterial flora of the respiratory tract of wild birds in Ludhiana (Punjab). *Zentralbl. Veterinaermed.*, **27**, B 165-168.
- SMIBERT R.M., DE VOLT H.M., FABER J.E., 1958. A study of the bacterial flora of the respiratory system of normal chickens. *Poult. Sci.*, **37**, 159-166.