

**UNIVERSITE BADJI MOKHTAR**



**جامعة باجي مختار**

**FACULTE DES SCIENCES**  
**Département de Biochimie**

## **THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences  
Option : Microbiologie

**L'EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS DES ELEVAGES DE POULES  
PONDEUSES DES REGIONS D'ANNABA ET EL-TARF PAR LES  
SALMONELLES : Sous-typage moléculaire et Mécanismes de résistance  
aux antibiotiques des souches isolées.**

Présentée par : **BOUZIDI Nardjess**

**Directeur de thèse : Pr. Leila AOUN**  
**Co-directeur de thèse : Pr. Yves MILLEMANN**

### **Composition du jury :**

Pr. M. BENSOUILAH, Université Badji Mokhtar, Annaba  
Pr. D. KIRANE, Université Badji Mokhtar, Annaba  
Pr. M. DEKHIL, CH Universitaire Dorban, Annaba  
Pr. D. GUETARNI, Université Saad Dahleb, Blida

Président  
Examinatrice  
Examinateur  
Examinateur

## ***Avant-propos***

*Ces travaux de thèse ont été en grande partie co-financés par une bourse de coopération algéro-française (BAF), et l'unité MASQ-ENVA. L'autre partie du financement était un financement personnel.*

*Les manip ont été réalisés au sein de ; l'Unité MASQ-ENVA (identification biochimique des isolats, Marqueurs moléculaires fondés sur la PCR), l'Unité CEB-ANSES (sérotypage des souches, tests d'antibiogrammes, PFGE, identification de gènes de résistances par PCR), et enfin l'unité INSERM U914 (séquençage des gènes et les essais de conjugaisons).*

*Ces travaux ont fait l'objet, à l'heure actuelle, de 2 publications dans des revues de renommée scientifiques, à comité de lecture, et de communications orales dans des congrès internationaux. Deux autres articles sont en cours de rédaction.*

## **Remerciements**

*Mes remerciements vont tout d'abord à mes co-directeurs de thèse le professeur Leila AOUN et Yves MILLEMANN;*

*Professeur Leila AOUN pour m'avoir proposé ce sujet difficile et passionnant, et de m'avoir fait confiance tout au long de ces longues années !! Pour ses encouragements, sa gentillesse et un respect mutuel sans faille.*

*Au professeur Yves MILLEMANN, de m'avoir accueillie dans son laboratoire en m'offrant toutes les conditions pour réaliser ce projet, dirigé mon travail de thèse, soutenue, encouragée, mais surtout ouvert toutes les portes afin de surmonter cette étape scientifique particulière qu'est la thèse ! Les mots sont tellement fades Yves pour exprimer ma profonde gratitude pour votre présence à tous les instants et tous ce que vous m'avez apportés scientifiquement et humainement durant toutes ces longues années. Je vous dois tant!*

*A Monsieur le Professeur Mourad BENSOUILAH, qui m'a fait l'honneur d'accepter la charge de présider le jury de notre thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*A Madame et Messieurs les Professeurs Djamila KIRANE, Mazouz DEKHIL, et Djamel GUETARNI qui m'ont fait l'honneur et le privilège de juger mes travaux et participer au jury de notre thèse. Qu'ils soient remerciés pour le temps consacré à lire et à analyser ce travail.*

*Au docteur Sophie GRANIER de l'unité CEB-ANSES-Alfort pour son implication et son dévouement dans ces travaux, de m'avoir guidée et soutenue tout au long de mon séjour dans l'unité, beaucoup conseillée, aidée dans la rédaction des articles malgré la distance ! J'ai gardé une phrase de toi Sophie qui est devenue presque ma devise « « on va y arriver Nardjess!! ». Sois assurée de tout mon respect et toute ma reconnaissance.*

*Je remercie chaleureusement Docteur Anne BRISABOIS, chef de l'unité CEB-ANSES, Maisons Alfort, de m'avoir ouvert les portes de son unité, de m'avoir fait confiance, formé et laissé travailler au sein de son laboratoire. Il est de même pour toute l'équipe de l'unité (Sophie ROUSSEL, Muriel MAURAUULT, Catherine GOMEZ, Joel GROUT, Christine PICQUET, Sylvie FREMY). Sincères remerciements.*

*Je remercie infiniment professeur Jean-Christophe AUGUSTIN qui m'a accueillie comme doctorante à part entière au sein de son laboratoire, et m'a offert les meilleures des conditions. Egalement la précieuse aide technique de Sandrine OPICCI et Nabila CHERGUI de l'unité MASQ-ENVA.*

*Un chaleureux merci au chercheur Laurent POIREL de m'avoir ouvert les portes de la grande unité INSERM U914, sa grande générosité, sa disponibilité, ses conseils, sa pertinence, et son sens exceptionnel de la critique. Grâce à lui j'ai pu réaliser un rêve ; associer mon nom à une sommité dans une publication, que puis-je demander de plus ! Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde admiration.*

*Je ne pourrai partir le cœur léger sans remercier Professeur Mourad BENSOUILLAH, qui m'a hébergée dans son laboratoire comme doctorante au moment où j'avais le plus besoin « étant une scientifique Nomade », et avec tant de gentillesse et générosité. Toujours présent quand j'ai besoin de lui ! Si j'ai pu avancer dans ce travail, c'est aussi de « ta faute ! ».*

*Un infini merci au Professeur Mazouz DEKHIL, de m'avoir fait confiance en acceptant de collaborer à ce travail de thèse, sans condition ni contrainte. Merci pour son soutien à tout instant, son ouverture d'esprit et son humanisme sans faille dans les moments de doute et de grand spleen « j'avoue que j'en ai eu pas mal ces deux dernières années! ». Pour ça, je vous exprime ma profonde gratitude et un immense respect.*

*Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la grande générosité, la disponibilité de certains laboratoires et leurs équipes respectives, notamment le laboratoire d'hygiène de la wilaya d'Annaba, les différents laboratoires des polycliniques de la wilaya et certains laboratoires médicaux privés et fournisseurs. Un grand merci pour vos aides substantielles que vous avez consenties à déboursier pour mes débuts très difficiles de scientifique nomade sans laboratoire fixe! Et un projet ambitieux!*

*Un merci particulier à Asma et Nadia, pour leur précieuse aide au laboratoire. Merci les filles d'avoir supporté mon rythme infernal! Votre aide m'était indispensable. Je remercie également toutes les personnes que je n'ai pas citées, elles se reconnaîtront.....Un merci chaleureux au Dr Boumazaa.*

*Comment pourrai-je finir sans remercier Mourad Zeghdoudi de m'avoir fait découvrir le monde aviaire, initiée au gout du terrain et ses difficultés. Merci de m'avoir aidée pour mes premières sorties, de t'avoir gâché quelques week end en famille. Merci aussi pour tes cours d'autopsies et ta positive attitude !*

*Je remercie infiniment les copains et cousins ; Skander, Adel, Salim, Hichem et Yazid d'avoir partagé avec moi le monde des éleveurs, et leurs rejets!!Finalement, on est arrivé à les convaincre. Il fallait juste persévérer ! Merci les amis pour les enquêtes terrain. Merci pour les longues distances parcourues particulièrement sous la canicule (45°C)! Egalement durant le mois de ramadhan, et les pluies torrentielles! Votre disponibilité et générosité m'ont permis de franchir ces obstacles en apparence insurmontables. Sans vous, ce travail n'aurait jamais pu aboutir !*

*Enfin, à tous les éleveurs, les vétérinaires et toutes les personnes qui sans nécessairement le savoir ont contribué de près ou de loin à ce projet de thèse.*

## ***Dédicaces***

*Je dédicace l'ensemble de cette thèse à mes parents et à mon unique sœur Amira, sans lesquelles je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. De faire de cette thèse ce qu'elle est : un moment de ma vie, gravé dans mon coeur. Merci pour votre amour. Je ne serais pas là sans vous !*

*Une dédicace toute particulière à ma Maman pour son soutien et son amour toujours renouvelé : t'es ma force man, ma boussole et à l'origine de notre réussite Amira et moi !!*

*Je te dois tout dans ma vie.*

***« Impose ta chance,  
Serre ton bonheur,  
Et va vers ton risque,  
A te regarder, ils s'habitueront » René Char.***

# Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
RESUME	
SUMMARY	
INTRODUCTION GENERALE.....	21
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE : Etude Bibliographique.....</b>	<b>24</b>
<b>1. Revue générale de <i>Salmonella</i> et les salmonelloses.....</b>	<b>25</b>
1.1. <i>Salmonella</i> .....	25
1.1.1. Historique.....	25
1.1.2. Taxonomie et nomenclature.....	25
1.1.3. Structure antigénique et distribution en sérovars.....	26
1.1.4. Classification.....	27
1.1.5. Bactériologie de <i>Salmonella</i> .....	28
1.1.5.1. Caractères culturels et morphologiques.....	28
1.1.5.2. Caractères biochimiques.....	28
1.1.5.3. Capacité de survie.....	29
1.1.6. Méthodes de détection.....	29
1.1.6.1. Méthode horizontale de référence ISO 6579.....	29
1.1.6.2. Nouvelles techniques de détection de <i>Salmonella</i> spp.....	30
1.1.7. Mécanismes de virulences et pouvoir pathogène.....	31
1.1.8. Epidémiologie des salmonelles.....	32
1.1.8.1. Habitat.....	32
1.1.8.2. Réservoirs et spécificité d'hôte.....	32
1.1.8.3. Sources et voies de transmission.....	33
1.2. Les salmonelloses.....	34
1.2.1. Les salmonelloses aviaires.....	34
1.2.1.1. Introduction.....	34
1.2.1.2. La pathogénèse de l'infection à <i>Salmonella</i> chez la volaille.....	35
1.2.1.3. Symptômes et lésions cliniques chez la volaille.....	36

1.2.1.4.	Le mécanisme de contamination des œufs et le nombre d'œufs contaminés.....	37
1.2.1.4.1.	La contamination de la surface de l'œuf et la pénétration à travers la coquille.....	37
1.2.1.4.2.	Contamination interne des œufs pendant sa formation.....	38
1.2.1.4.3.	Le nombre d'œufs infectés.....	39
1.2.1.4.4.	Réceptivité et doses infectantes.....	39
1.2.1.4.5.	Facteurs de risques liés à la présence et la persistance de <i>Salmonella</i> dans les élevages de poules pondeuses.....	40
1.2.1.5.	Programme de contrôle de <i>Salmonella</i> dans les élevages aviaires.....	42
1.2.1.6.	Réseau d'épidémiologie des maladies animales en Algérie.....	44
1.2.2.	Les salmonelloses humaines.....	47
1.2.2.1.	Salmonelloses spécifiques à l'homme.....	48
1.2.2.1.1.	Pathologie.....	48
1.2.2.1.2.	Traitement.....	48
1.2.2.2.	Salmonelloses non typiques.....	49
1.2.2.2.1.	Pathologie.....	50
1.2.2.2.2.	Traitement.....	51
1.2.2.3.	Impact et importance des infections provoquées par <i>Salmonella</i> spp.....	51
1.2.2.3.1.	Enjeu de santé publique.....	51
1.2.2.3.2.	Enjeu économique.....	53
1.2.2.3.3.	Sérovars dominants.....	53
<b>2.</b>	<b>Caractérisation des souches de salmonelles.....</b>	<b>55</b>
2.1.	Méthodes de caractérisation phénotypique et génotypiques des souches bactériennes.....	55
2.1.1.	Marqueurs phénotypiques.....	55
2.1.1.1.	La sérotypie.....	55
2.1.1.2.	La lysotypie.....	56
2.1.1.3.	La biotypie.....	56
2.1.1.4.	L'antibiotypie.....	56
2.1.2.	Les marqueurs génotypiques.....	57
2.1.2.1.	Techniques basées sur la restriction de l'ADN.....	57
2.1.2.1.1.	Analyse du profil plasmidique.....	57
2.1.2.1.2.	L'analyse des profils de restriction de l'ADN génomique (RFLP).....	58

2.1.2.2.	Techniques basées sur l'amplification par PCR.....	60
2.1.2.2.1.	Amplified Fragment length polymorphism (AFLP).....	61
2.1.2.2.2.	Polymorphism de l'ADN amplifié au hasard (RAPD).....	61
2.1.2.2.3.	Amplification de séquences répétées ( <i>Rep-PCR</i> ).....	61
2.1.2.2.4.	L'analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem (MLVA).....	62
2.1.2.3.	Techniques basées sur le séquençage.....	62
2.1.2.3.1.	Typage moléculaire par <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	63
2.1.2.3.2.	L'analyse du polymorphisme de mutation ponctuelle (SNP).....	63
2.2.	Interprétation des résultats de typage moléculaire.....	64
<b>3.</b>	<b>Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques et un état des lieux de la résistance des salmonelles isolées chez l'homme et l'animal.....</b>	<b>65</b>
3.1.	Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	65
3.1.1.	Les types de résistance bactérienne.....	65
3.1.1.1.	Résistance naturelle.....	65
3.1.1.2.	Résistance acquise.....	65
3.1.1.2.1.	Résistance par mutation chromosomique.....	66
3.1.1.2.2.	Résistance par acquisition d'ADN exogène.....	66
3.1.1.3.	Supports génétiques impliqués dans le transfert des gènes.....	66
3.1.1.3.1.	Intégrons et transposons.....	67
3.1.1.3.2.	Plasmides.....	67
3.1.1.4.	Modes de transfert de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	68
3.1.1.4.1.	Conjugaison.....	68
3.1.1.4.2.	Transformation et compétence naturelle.....	68
3.1.1.4.3.	Transduction.....	69
3.1.2.	Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	70
3.1.2.1.	Diminution de la pénétration ou augmentation de l'excrétion d'un antibiotique.....	70



3.1.2.2.	Système d'efflux.....	70
3.1.2.3.	Modification de la cible.....	70
3.1.2.4.	Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	71
3.1.2.5.	Modification du métabolisme.....	71
3.1.3.	Réservoirs et transmission de la résistance bactérienne aux antibiotiques à l'homme.....	72
3.1.3.1.	Transmission directe.....	72
3.1.3.2.	Transmission via les animaux et l'alimentation d'origine animale.....	73
3.2.	Etat des lieux de la prévalence de résistance des souches de <i>Salmonella</i> aux antimicrobiens.....	74
3.2.1.	Chez les animaux (élevage).....	75
3.2.2.	Transmission à l'homme des souches animales de <i>Salmonella</i> résistantes aux antibiotiques .....	75
<b>2<sup>ème</sup></b>	<b>PARTIE : Etude expérimentale.....</b>	<b>78</b>
<b>1.</b>	<b>Contexte et problématique de l'étude.....</b>	<b>79</b>
<b>2.</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>80</b>
2.1.	Enquête épidémiologique dans les élevages de PP.....	<b>80</b>
2.1.1.	Situation de la filière ponte dans les 2 régions étudiées.....	<b>80</b>
2.1.2.	Distribution géographique des élevages.....	81
2.1.3.	Sélection des élevages enquêtés .....	81
2.1.4.	Moments d'échantillonnage.....	82
2.1.5.	Questionnaire des visites d'élevages.....	<b>83</b>
2.1.6.	Echantillonnage.....	83
2.2.	Les souches humaines hospitalières collectées sur les deux années d'étude.....	<b>85</b>
2.3.	Méthodes d'analyses.....	<b>85</b>
2.3.1.	Analyses bactériologiques des prélèvements aviaires.....	85
2.3.2.	Sérotypage des souches de <i>Salmonella</i> .....	85
2.3.3.	Les antibiogrammes.....	86
2.3.4.	L'analyse génotypique des souches isolées de <i>Salmonella</i> .....	87
2.3.4.1.	Marqueurs moléculaires fondés sur la PCR.....	87
2.3.4.1.1.	Extraction d'ADN.....	87
2.3.4.1.2.	Réalisation des PCR (ERIC et IS-PCR).....	87
2.3.4.1.2.1.	Principe.....	87

2.3.4.1.2.2.	Conditions de réalisation.....	88
2.3.4.1.2.3.	Conditions d'amplifications.....	88
2.3.4.1.2.4.	Migration électrophorétique et révélation.....	89
2.3.4.2.	Electrophorèse en champ pulsé (PFGE).....	90
2.3.4.2.1.	Extraction d'ADN.....	90
2.3.4.2.2.	Digestion enzymatique.....	90
2.3.4.2.3.	Séparation électrophorétique des fragments.....	91
2.3.4.2.4.	Lecture du gel et interprétation des résultats.....	91
2.3.5.	Mécanismes de résistances des souches humaines aux antibiotiques.....	92
2.3.5.1.	Détection des gènes contenant une $\beta$ -lactamase.....	92
2.3.5.2.	Détection du gène <i>armA</i> .....	92
2.3.5.3.	Révélation et lecture des PCR.....	92
2.3.6.	Séquençage du gène contenant une $\beta$ -lactamase de type CTX-M.....	93
2.4.	Analyse statistique des indicateurs de risques.....	94
<b>3.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>78</b>
3.1.	L'infection des élevages de PP par les salmonelles.....	94
3.1.1.	Prévalence de contamination.....	94
3.1.2.	Les sérotypes identifiés.....	95
3.1.3.	Résistance aux antibiotiques des souches isolées.....	96
3.1.4.	Indicateurs de risques associés au statut salmonellique.....	97
3.1.4.1.	Typologie des élevages.....	97
3.1.4.2.	Analyse statistique du questionnaire d'enquête.....	98
3.2.	Potentielle contribution des salmonelles aviaires aux cas de salmonelloses humaines.....	100
3.2.1.	Les salmonelles humaines collectées.....	100
3.2.1.1.	Données cliniques et épidémiologiques.....	100
3.2.1.2.	Les sérotypes identifiés.....	100
3.2.1.3.	Résistance aux antibiotiques.....	101
3.2.2.	Analyse et comparaison génotypique des isolats selon l'origine et le sérotype.....	102
3.2.2.1.	Sérotypes communs identifiés.....	102
3.2.2.2.	Analyse des isolats par la PFGE et l'ERIC et IS-PCR.....	102
3.2.2.2.1.	Analyse PFGE.....	102
3.2.2.2.2.	Analyse ERIC et IS-PCR.....	107
3.3.	Etude de l'émergence de l'antibiorésistance parmi les souches humaines isolées.....	110
3.3.1.	Gènes de résistances aux bêta-lactamines.....	110
3.3.2.	Gène <i>armA</i> de résistance aux aminosides.....	111

3.3.3. Séquençage du groupe d'enzyme CTX-M.....	114
<b>4. Discussion</b>	
4.1. L'infection des élevages de PP par <i>Salmonella</i> .....	115
4.1.1. Prévalence de contamination.....	115
4.1.2. Sérotypes identifiés et leurs profils de résistance aux antibiotiques.....	118
4.1.3. Les indicateurs de risques.....	120
4.2. Potentielle contribution des salmonelles aviaires aux cas de salmonelloses humaines.....	122
4.2.1. Analyse globale des 2 marqueurs moléculaires et de la PFGE.....	122
4.2.2. Comparaison et analyse des profils génotypiques des souches isolées selon le sérotype et l'origine.....	123
4.3. Etude de l'émergence de la résistance des souches humaines de salmonelles aux antibiotiques.....	128
4.3.1. Emergence des souches humaines de <i>Salmonella</i> productrice de $\beta$ - lactamases à spectre élargi type CTX-M.....	128
4.3.2. Emergence des souches humaines de <i>Salmonella</i> productrice d'une méthylase type ArmA.....	130
<b>5. Conclusions générales</b> .....	132
<b>6. Références bibliographiques</b> .....	134
<b>7. Annexes</b> .....	174
<b>7.1. Questionnaire utilisé pour l'enquête</b> .....	174
<b>7.2. Fiche de prélèvements</b> .....	189

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Formules antigéniques des sérovars les plus fréquemment isolés de <i>Salmonella enterica subsp enterica</i> , extrait du tableau de Kauffmann-White.....	25
<b>Tableau 2</b> : Nombre de sérotypes dans chaque espèce et sous-espèce de <i>Salmonella</i> en 2004.....	27
<b>Tableau 3</b> : Caractères généraux et classification de <i>Salmonella</i> .....	28
<b>Tableau 4</b> : Statuts sanitaires des différentes salmonelloses des oiseaux dans les pays de l'Union Européenne.....	34
<b>Tableau 5</b> : Répartition mondiale des 2 sérovars dominants, <i>S. Enteritidis</i> et <i>S. Typhimurium</i> des cas humains.....	53
<b>Tableau 6</b> : Mécanismes de résistances aux antimicrobiens.....	70
<b>Tableau 7</b> : Nombre d'unités d'élevages (public et étatique) de la filière ponte dans les deux régions d'Annaba et Eltarf selon les sources 2007 des DSV et l'enquête terrain 2008 et 2009.....	80
<b>Tableau 8</b> : Séquences d'amorces utilisées pour les 2 marqueurs moléculaires ERIC et IS-PCR.....	88
<b>Tableau 9</b> : Liste des 10 paires d'amorces utilisées pour les 3 PCR Multiplex et la paire d'amorce utilisée pour la PCR simplex.....	92
<b>Tableau 10</b> : Prévalence des salmonelles dans les élevages de poules pondeuses étudiés en fonction des 3 âges des pondeuses, et la proportion des prélèvements positifs.....	94
<b>Tableau 11</b> : Différents sérovars de <i>Salmonella</i> identifiés des élevages de poules pondeuses dans les deux régions étudiées selon les sources de prélèvements.....	95
<b>Tableau 12</b> : Profils de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Salmonella</i> , selon les différentes sources de prélèvements et les sérovars identifiés.....	96
<b>Tableau 13</b> : Indicateurs de risques potentiellement associés à la contamination des élevages de poules pondeuses par <i>Salmonella</i> .....	98
<b>Tableau 14</b> : Profils de résistances aux antibiotiques des souches humaines de <i>Salmonella</i> spp collectées lors des deux années d'étude.....	100

**Tableau 15** : Gènes de  $\beta$ -lactamases identifiés parmi les 58 souches humaines de *Salmonella* de différents sérovars résistantes aux céphalosporines.....110

**Tableau 16** : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des 18 souches de *Salmonella enterica armA*-positives, isolées dans le service de bactériologie du CHU d'Annaba.....111

**Tableau 17** : Séquençage du gène CTX-M des 26 souches humaines choisies parmi les 50 souches de *Salmonella* possédant le gène de résistance aux  $\beta$ -lactamines.....113

## Liste des Figures

<b>Figure 1</b> : Détection de <i>Salmonella</i> sp. dans les aliments selon la méthode normalisée ISO 6579 : 2002- Mode opératoire (Korsak, 2004) (RVS, MKTTn, et XLD désignent des milieux de culture de composition spécifique.....	29
<b>Figure 2</b> : Cycle des salmonelles selon Bouvet et al. (2001).....	41
<b>Figure 3</b> : Système d'Organisation des Services Vétérinaires en Algérie.....	45
<b>Figure 4</b> : Nombre de vétérinaires en exercice à travers le territoire Algérien, selon les estimations du ministère de l'agriculture et le développement rural.....	46
<b>Figure 5</b> : Evolution temporelle des cas confirmés de salmonelloses humaines dans les pays de l'UE (EFSA, 2010).....	51
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert horizontal de gènes de résistances.....	68
<b>Figure 7</b> : Voies potentielles de transmission des bactéries résistantes et des gènes de résistance.....	73
<b>Figure 8</b> : Localisation des élevages échantillonnés dans les 2 régions d'Annaba et Eltarf.....	84
<b>Figure 9</b> : Dendrogramme des 38 souches de <i>S. Typhimurium</i> humaines et aviaires isolées lors des 2 années de l'étude, obtenu à partir de l'analyse PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	102
<b>Figure 10</b> : Dendrogramme des 5 souches humaines des variants monophasiques et immobiles recueillies pendant les deux années d'étude, obtenu à partir de l'analyse PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	103
<b>Figure 11</b> : Dendrogramme des 11 souches humaines et aviaires de <i>S. Enteritidis</i> isolées lors des deux années d'étude, obtenues à partir de l'analyse PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	103
<b>Figure 12</b> : Profils PFGE des deux souches humaine et aviaire de <i>S. Manhattan</i> obtenus avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	104
<b>Figure 13</b> : Dendrogramme des 3 souches aviaires de <i>S. Hadar</i> isolées, obtenu à partir de le PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	104
<b>Figure 14</b> : Dendrogramme des 2 souches humaine et aviaire de <i>S. Dublin</i> isolées, obtenu à partir de la PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	105

<b>Figure 15</b> : Dendrogramme des souches humaine et aviaires de <i>S. Virchow</i> isolées, obtenu à partir de la PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	105
<b>Figure 16</b> : Dendrogramme des souches aviaires de <i>S. Kentucky</i> isolées d'élevages et celles stockées dans la banque de données de l'unité CEB de l'ANSES, obtenu à partir de l'analyse PFGE avec l'enzyme <i>XbaI</i> .....	106
<b>Figure 17</b> : Profils ERIC-PCR des différents sérovars identifiés des souches aviaires et humaines isolées lors des deux années d'étude.....	107
<b>Figure 18</b> : Profils IS-PCR des différents sérovars identifiés des souches aviaires et humaines isolées lors des deux années d'étude.....	108
<b>Figure 19</b> : Gènes de $\beta$ -lactamases identifiés par les 3 PCR-Multiplex, parmi les 58 souches humaines résistantes aux bêta-lactamines.....	112
<b>Figure 20</b> : Gène CMY identifié par PCR-Multiplex, parmi les 50 souches humaines résistantes aux $\beta$ -lactamines et productrices de céphalosporinases.....	112
<b>Figure 21</b> : Gène <i>armA</i> identifié parmi les 22 souches humaines résistantes aux aminosides (kanamycine, gentamicine, streptomycine), obtenu par PCR-simplex.....	112

## Liste des Abréviations

**95% CI 95%** Intervalles de confiance  
**ADN** Acide Désoxyribonucléique  
**ANSES** Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail  
**MDR** Multidrug Resistance  
**ARN** Acide Ribonucléique  
**BLSE** Beta-lactamases à spectre étendu  
**C3G** Céphalosporines de Troisième Génération  
**CA-SFM** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
**CLSI** « *Clinical and Laboratory Standards Institute* »  
**CMY** Bêta-lactamase, « *active on cephamycins* »  
**CTX-M** Bêta-lactamase, « *active on cefotaxime, first isolated at Munich* »  
**SHV** Bêta-lactamase, « *sulphydryl reagent variable* »  
**TEM** Bêta-lactamase, d'après le nom du patient Temoneira chez qui elle a été identifiée pour la première fois.  
**ArmA** Aminoglycosides resistance methylases  
**CDC** Center for Disease Control and Prevention  
**CMI** Concentration Maximale Inhibitrice  
**CNR** Centre National de Référence des Salmonelles  
**ECDC** European Centre for Disease Prevention and Control  
**EFSA** European Food Safety Authority  
**EU** European Union  
**InVS** Institut de Veille Sanitaire  
**LERQAP** Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et les Procédés Agroalimentaires  
**MLST** Multilocus Sequence Typing  
**MLVA** Multiple Loci VNTR Analysis" ou "Analyse de plusieurs locus VNTR »  
**NAC** Nouveaux Animaux de Compagnie  
**PCR** Polymerase Chain Reaction  
**PFGE** Pulse Field Gel Electrophoresis  
**RAPD** Random Amplification Polymorphic DNA  
**SNP** Single Nucleotide Polymorphisms  
**TIA (C)** Toxi-Infections Alimentaires (Collectives)  
**UK** United Kingdom  
**dNTP**: déoxyribonucléotides triphosphate  
**kpb**: kilopaire de bases  
**pb**: paire de bases  
**spp.** : espèces  
**Tn** : transposon  
**uL** : microlitre  
**PLP** Protéines de Liaison à la Pénicilline  
**UV** Ultraviolet  
**WHO** World Health Organization



## RÉSUMÉ

Une étude épidémiologique préliminaire a été conduite de mars 2008 à novembre 2009 dans 18 élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation, situés dans deux régions voisines d'Annaba et Eltarf (Algérie). Pour cela, les 18 bâtiments ont été échantillonnés une à 3 fois tout au long de la bande ; la 1<sup>ère</sup> visite avait lieu en début de bande (22-31 semaines d'âge des pondeuses), la 2<sup>ème</sup> visite s'est déroulée entre 47-60 semaines, et la dernière visite s'est faite juste avant la dépopulation, entre 70-86 semaines. Le statut salmonellique des troupeaux a été déterminé en analysant les 2754 prélèvements environnementaux recueillis. Huit élevages se sont révélés positifs à *Salmonella* spp, avec une fréquence plus élevée en fin de bande comparée au début et au milieu de la bande. Seulement 19 isolats ont été récupérés parmi les 2754 prélèvements analysés, et 9 différents sérovars identifiés. Treize isolats étaient résistants à au moins un agent antimicrobien. Parmi eux, six étaient résistants à au moins trois différentes classes d'antimicrobiens. Les isolats de *Salmonella* Kentucky étaient résistants aux fluoroquinolones avec une  $CMI_{cipro} \geq 8$  mg/L. A partir des questionnaires d'enquêtes, l'analyse statistique a permis d'identifier six indicateurs de risque potentiellement liés au statut salmonellique des bâtiments. Une caractérisation génotypique des souches isolées d'élevages, et de celles recueillies de cas humains durant les 2 années a été réalisée. Les souches ont ainsi généré 21 pulsotype en PFGE, 13 profils en IS-PCR, et 12 profils en ERIC-PCR. Ces 3 méthodes ont démontré d'un côté, le caractère clonal de certains serovars notamment humains confortant ainsi l'hypothèse d'une diffusion clonale dans ces régions, et d'un autre côté, l'hétérogénéité des profils d'autres sérotypes laissant ainsi supposer une possible diversité des sources de contamination dans ces deux régions. En parallèle, parmi les souches humaines recueillies, nous avons identifié les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, et aux aminosides. Le gène BLSE type CTX-M était présent chez 50 souches, dont 35 portaient également une pénicillinase type TEM. Une céphalosporinase type CMY a été également identifiée chez 50 souches de *Salmonella*. Enfin, le gène *armA* a été identifié chez 18 souches BLSE type CTX-M, conférant un haut niveau de résistance à la gentamicine, kanamycine et une variabilité de résistance à la streptomycine.

**Mots clés :** élevages poules pondeuses, *Salmonella*, prévalence, antibiorésistance, indicateurs de risques, ERIC-PCR, IS-PCR, PFGE, BLSE, ArmA, Algérie.

## Summary

A preliminary epidemiological study of *Salmonella* contamination in laying-hen flocks was carried out in the regions of Annaba and Eltarf, Algeria, from March to October 2008 and March to November 2009. Our objectives were (i) to estimate the prevalence of infection by *Salmonella* spp. in seven pooled samples during the hens' laying period (ii) to identify the serotypes and antimicrobial resistance phenotypes of isolates, and (iii) to characterize the factors that may be related to *Salmonella* contamination in Algerian henhouses. For this purpose, 18 out of 22 operational laying-hen houses were sampled one to three times during these periods: once at the start of laying (pullets aged 22–31 weeks), once in the middle of laying (47–60 week) and once at the end of laying prior to depopulation (70–86 week). The flocks' *Salmonella* status was assessed by collecting 2754 environmental samples that were analyzed according to the ISO 6579 method. Eight flocks tested positive for *Salmonella* spp., with a higher prevalence at the end of laying than at either the beginning or middle. Only 19 isolates were recovered from the 2754 samples analyzed and nine different serotypes identified. *S. enteritidis* (n=4) was the most prevalent serovar, along with *S. Kentucky* and *S. Hadar* (n=3), followed by *S. Heidelberg*, *S. Manhattan* and *S. Virchow* (n=2), whereas *S. Dublin*, *S. Typhimurium* and *S. Albany* were found only once. Thirteen isolates were resistant to at least one antimicrobial agent. Of these, six were resistant to at least three different antimicrobial classes. *Salmonella* serovar Kentucky isolates were resistant to fluoroquinolones with ciprofloxacin MIC $\geq$ 8 mg/L. Six risk indicators were identified as potentially related to the *Salmonella* status of layer houses.

On the another side, we report a genotypic investigation on eighty seven *Salmonella* isolates originating from laying hen flocks and human patients within Annaba and Eltarf regions. The genetic diversity was assessed by three subtyping methods; Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus –PCR, Insertion Sequence-PCR (IS 200-PCR), and Pulsed Field Gel Electrophoresis. The ERIC-PCR, IS-PCR and PFGE allowed allocating the isolates to 09, 10 and 21 different profiles, respectively. The 3 genotyping methods, particularly the PFGE, showed the clonality of some serotypes as *S. Typhimurium*, confirming the diffusion and the persistence of the same clone through the field, and in our regions, but also the polymorphism of other serotypes indicating the diversity of potential reservoirs of *Salmonella*.

We then identified the genes for antibiotic resistance among the 67 human strains collected during the study period. All of the 50 ESBL-producing *Salmonella* isolates were positive for the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene. Among them, 43 and 35 isolates also harboured the *bla*<sub>CMY</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, respectively. Twenty-two out of these 50 ESBL-producing *Salmonella* isolates showed varied levels of resistance to the aminoglycosides tested (gentamicin, kanamycin and streptomycin) and were screened for detection of the *armA* methylase gene by PCR. The *armA* gene was also detected in four isolates of *Salmonella* Enteritidis displaying high-level resistance to gentamicin and kanamycin but susceptibility to streptomycin. No *armA* gene was detected among the four isolates displaying high-level resistance to gentamicin and streptomycin but susceptibility to kanamycin. Sequencing of the *bla*<sub>CTX-M</sub> genes from the 18 *armA*-positive isolates allowed identification of the CTX-M-15 determinant.

**Words:** laying hen flocks, *Salmonella*, prevalence, antibiotic resistance, risk indicators, ERIC-PCR, IS-PCR, PFGE, ESBL, CTX-M, ArmA, Algeria.

اللدجاج ببيض وضع 18 في 2009 نوفمبر إلى 2008 مارس من الوباء الأولية دراسة أجريت وقد الزيارة اس تغرق (الجزائر) عنابة Eltarf والمجاورة المناطق من اذنين في وتقع لاس تهلاك، في الأولى والفرقة الفرقة، أنحاء جميع في مرات 3 إلى مبنى 18 من عينات وأخذت لهذا، الثانية لي زيارة آخر وقد قدم أسبوعا 60-47 بين ما ال فترة في، (اللدجاج عمر من أسبوعا 31-22) م بكر وقت تحليل طريق عن ال سالمونيللا قطعان مركز تحديدهم. أسبوعا 86-70 بين السكان، هجرة قبل ال سالمونيللا، لباك تيريدا إيدجابهية مزارع ثمانية. 2754 في جمعها تم التي البيئية العينات من عزلات 19 سوى ان تشالتم. الفرقة ومذ تصف بداية مع مقارنة الفرقة نهائية وتيرة ارتفاع مع عزلات عشر ثلاثة وكانت. مخدلة 9 serovars و حددت، 2754 في تحليلها تم التي العينات ثلاثة عن يقل لل مقاومة ستة بينها، من لميكروبات مضاد عامل الأقل على ل واحد مقاومة لكن تاكي مقاومة ال سالمونيللا عزلات كانت. الميكروبات مضادات من مخدلة فئات مؤشرات تحديد المسح، الاستبيانات من لتر / ملغ  $CMiCipro \geq 8$  مع ال فلوروكينولونات إجراء تم. ال سالمونيللا المباني حالة أن يحدتمل المرتبطة الاستبيانات التحليل المخاطر خلال جمعها تم التي البيانات من والإذسان الماشية الحالات من ولتمعزل سلالات الوراثة توصيف هذه. PCR-ERIC و 12 وملامح ملامح، 13 IS-PCR، pulstotype PFGE هكذا ولدت 21 جذع. سذتين وجود فرضية يؤكد مما serovars بعض نسيلي الوباء وطبيعة جهة، من أظهرت الثلاثة الطرق الأخرى المصدلية الأماط من لمحات تجانس عدم فإن أخرى، جهة ومن المناطق، هذه في نسيلي نشر سلالات بين بالتوازي. الجارين المناطق هذه في التلوث مصادر تنوع ممكن تركت فترض الجين 35 كان. والأمينوغلوكوزيد  $\beta$ -لاكتامات المقاومة الجينات حددنا جمعها، تم التي الإذسان نوع من CMY. بنسلي ناز TEM كما، سلالات 50 في حاضرا كان ESBL CTX-M الجين تحديدهم وأخيرا، ال سالمونيللا سلالات 50 في A تحديدهم كما cephalosporinases جنتاميسين، لمقاومة عال مستوى على تمنح، ESBL CTX-M سلالات 18 في ARMA ل. لسترب. توماي سبين المقاومة وت قلب الكاناميسين

ومؤشرات الميكروبات، مضادات ومقاومة وان تشار، سالمونيللا، والاللدجاج تربية: **الكلمات** الجزائر، ARMA، ESBL، PFGE، IS-PCR، ERIC-PCR، المخاطر،

# ***INTRODUCTION***

Les maladies d'origine alimentaire sont une cause importante de morbidité dans le monde. Des millions de personnes tombent malades et un grand nombre d'entre elles décèdent après avoir ingéré des aliments impropres à la consommation. Fortement préoccupés par ce problème, les États Membres de l'OMS ont adopté en 2000 une résolution reconnaissant que la sécurité sanitaire des aliments est un aspect essentiel de la santé publique. Dans les pays industrialisés, elle est devenue une demande exigée par les consommateurs, et surtout un enjeu sanitaire majeur, comme en témoigne la dernière crise sanitaire qui a survenu en juin 2011 dans certains pays d'Europe. Cette alerte sanitaire qui était liée à la présence d'une bactérie *Escherichia coli*, sérotype très rare STEC O :104 :H4 (graines germées), avait causé 31 cas de décès parmi les 3000 cas qui sont tombés malades à travers les 14 pays d'Europe touchés. A cet enjeu sanitaire s'ajoutaient les enjeux commerciaux et économiques puisque cette épidémie à l'*Escherichia coli* a levé l'alerte contre la consommation de salades, concombres et tomates crus, ce qui a coûté des centaines de millions d'euros aux agriculteurs européens.

Parmi ces pathogènes alimentaires zoonotiques, *Salmonella* est la seconde cause de ces toxico-infections alimentaires bactériennes en Europe et dans le monde (Bouwknegt et al., 2004; Collard et al., 2007). Elle provoque chez l'homme des symptômes d'un large éventail de sévérité, allant de légers maux de ventres jusqu'à la septicémie, et dans certains cas, elles engendrent la mort (Lo Dix-Foe et al., 2007). Cette zoonose représente pour la société de nombreux pays, une charge importante pour la santé publique et un coût considérable. En effet, chaque année, 93.8 millions de cas humains sont signalés partout dans le monde, entraînant 155 000 décès (Majowicz et al., 2010).

Un large éventail d'animaux, particulièrement les animaux de rente ont été identifiés comme des réservoirs de *Salmonella* non typhoïdiques (Uzzau et al., 2000 ; Pires et al., 2009). Les aliments contaminés, y compris le bœuf, le porc, la volaille ainsi que les ovo-produits sont également, de fréquents vecteurs responsables de la transmission de cette bactérie à l'homme (Andrews-polymenis et al., 2009). Cependant, les sources de contamination les plus importantes restent cependant les œufs et la viande de volaille (EFSA, 2009). C'est pour toutes ces raisons, et étant donné que ce pathogène zoonotique alimentaire est ubiquitaire, *Salmonella* est inscrite dans la réglementation dans la majorité des pays, et fait l'objet à la fois d'efforts en termes de surveillance et de lutte par les pouvoirs publics.

Les fluoroquinolones, telle que la ciprofloxacine et les céphalosporines à spectre étendu sont considérés comme le traitement de choix dans les cas sévères de salmonelloses humaines. Cependant, on assiste ces 15 dernières années, à la diffusion de la résistance aux antimicrobiens parmi les isolats de *Salmonella* non typhoïdiques chez l'homme. Cette résistance aux antibiotiques représente un danger pour la santé humaine et un réel problème de santé publique, dès lors que cette résistance est de plus en plus régulière et en augmentation (Varma *et al.*, 2005).

En effet, ces infections dues à ces bactéries résistantes ont été associées à une augmentation du taux de morbidité et mortalité chez l'homme (Helms et al, 2000 ; Molbak, 2005). Selon la communauté scientifique, cette diffusion de résistance pourrait être principalement due à l'utilisation abusive d'agent antimicrobiens dans les denrées alimentaire destinés aux animaux (White, 1998 ; Angulo et al., 2000). Il faut savoir, que certaines souches de *Salmonella* multi résistantes d'origine animale sont soupçonnées d'avoir acquis leurs gènes de résistance avant d'être transmis à l'homme par la voie alimentaire (Ungemach *et al.*, 2006).

Depuis les années 80s, et dans le but de pallier à un déficit de protéines animales et ainsi répondre aux besoins de la population en denrées alimentaires et produits dérivés, l'aviculture algérienne a connue une grande évolution. Ainsi de nombreuses régions du pays ont vu fleurir leurs investissements dans ce secteur. De ce fait, l'Algérie est passée d'un pays importateur d'œufs de consommation et de viande blanche durant les années 1980, à une production nationale qui couvre largement les besoins du pays dans le début des années 1990. A ce jour, la production avicole en Algérie est estimée entre 330 et 342 millions de tonnes de viande blanche (soit environ 240 millions de poulets par an) et plus de 3 milliards d'œufs de consommation par an (Ayachi et al., 2010). Concernant la consommation de la population, et selon les statistiques de la FAO (2009), L'Algérie est arrivée en 2008, à des consommations moyennes de 8.4 Kg/an/habitant en viande blanche et de 108 unités œufs/ an /habitant. Cependant, toutes ces mutations, le manque d'investissement ainsi que la prise de conscience ont rendu la chaîne alimentaire dans notre pays risquée en multipliant les possibilités de prolifération d'agents pathogènes, et causant ainsi, d'importantes épizooties dans les élevages (Ayachi et la., 2010). Malheureusement, la présence de ces épizooties dans nos élevages, et surtout leur impact sur la santé publique n'est pas à ce jour évalué, et cela en raison de la nette déficience de systèmes de surveillance épidémiologique (Ayachi, 2010).

Ainsi, l'objectif de ces travaux de thèse était d'apporter des données expérimentales sur les infections des élevages algériens par les salmonelles, et cela à partir d'une enquête épidémiologique terrain dans les élevages de poules pondeuses situées dans la région extrême Est du territoire national.

# ***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

## 1. Revue générale de *Salmonella* et les salmonelles

### 1.1. *Salmonella*

#### 1.1.1. Historique

Les salmonelles sont des bactéries communément retrouvées dans le monde animal. Ces bactéries sont à l'origine des salmonelloses qui se manifestent principalement sous forme de fièvres typhoïdes et de gastro-entérites ou encore sous forme asymptomatique. La caractérisation de la fièvre typhoïde date du 19<sup>ème</sup> siècle. Louis nomma cette maladie contagieuse ainsi en 1829 et en 1868, Pettenkoffer mit en évidence le rôle de l'eau de boisson dans sa dissémination. Cependant, ce n'est qu'en 1880 que le premier bacille ne fut observé par Eberth dans des coupes de rate et de ganglions lymphatiques. La culture *in vitro* de cette bactérie fut mise au point par Gaffky en 1884 (Le Minor & Véron, 1989).

#### 1.1.2. Taxonomie et nomenclature

*Salmonella* représente certainement le genre le plus complexe et le plus vaste de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa classification a fait l'objet de beaucoup de modifications et de controverses ces dernières années. Elle repose notamment sur le schéma de Kauffmann-White (Grimont *et al.*, 2000) qui tient compte des caractères antigéniques O (paroi), H (flagelle), Vi (capsule) auxquels les données biochimiques et moléculaires (hybridation ADN-ADN) ont été ajoutées. En 2004, deux espèces étaient distinguées : La première est *Salmonella enterica* qui se divise en six sous-espèces : *S. enterica* subsp. *enterica* (sous-espèce I), *S. enterica* subsp. *salamae* (sous-espèce II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (sous-espèce IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (sous-espèce IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (sous-espèce IV) et *S. enterica* subsp. *indica* (sous-espèce V). La deuxième espèce est *Salmonella bongori* (anciennement sous-espèce V) (Popoff *et al.*, 2004; Reeves *et al.*, 1989). Ainsi, le CDC (*Center for Disease Control*, Atlanta, Georgie) et l'ASM (*American Society for Microbiology*) ont adopté les deux espèces de *Salmonella* décrites plus haut. Depuis, un troisième nom d'espèce, *Salmonella subterranea* a été proposé récemment pour une souche isolée de sédiments contaminés aux nitrates et à l'uranium (Shelobolina *et al.*, 2004). Le nom de cette espèce a été validé en 2005 (Euzéby, 2005). Cette nomenclature est utilisée par ces deux organismes suscités. Le nom des sérovars relatifs à la sous-espèce *enterica*, portent un nom évoquant le lieu où la souche a été découverte ou la maladie qu'elle était suspectée provoquer lors de son isolement. Les sérovars s'écrivent avec une majuscule et en caractère romain (et non en italique) (Le Minor and Popoff, 1987 ; Brenner *et al.*, 2000). Ainsi, le sérotype Typhimurium par exemple, s'écrit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium ou de façon plus concise *Salmonella* Typhimurium ou *S.* Typhimurium.



### 1.1.3. Structure antigénique et distribution en sérovars

Le schéma de Kauffmann-White (Kauffmann, 1966) permet de subdiviser les salmonelles en sérovars en se basant sur l'identification de trois différents types d'antigènes. L'antigène somatique (O), l'antigène flagellaire (H) qui est associé avec les flagelles péritriches, et l'antigène capsulaire (Vi) qui est retrouvé seulement chez quelques sérovars de *Salmonella*, comme par exemple Typhi (Guthrie, 1992). Selon la nomenclature, un antigène qui peut être absent ou présent sans que le diagnostic du sérotype soit changé, est écrit entre crochet (ex : O:[5]). Un extrait du tableau de Kauffmann-White est présenté ci-dessous pour les sérotypes de la sous-espèce *enterica* les plus fréquemment isolés (Tableau 1).

Groupe	Sérotype	Ag O	Ag H <sub>1</sub>	Ag H <sub>2</sub>
B (O : 4)	Typhimurium	<u>1,4</u> ,[5],12	i	1,2
	Saintpaul	<u>1,4</u> ,[5],12	e,h	1,2
	Brandenburg	<u>1,4</u> ,[5],12, <u>27</u>	l,v	e,n,z <sub>15</sub>
	Derby	<u>1,4</u> ,[5],12	f,g	[1,2]
C1 (O : 6,7)	Infantis	6,7, <u>14</u>	r	1,5
C2 (O : 6,8)	Bovismorbificans	6,8, <u>20</u>	r,[i]	1,5
	Hadar	6,8	z10	e,n,x
D (O : 9)	Enteritidis	<u>1,9</u> ,12	[f],g,m,[p]	-
	Dublin	<u>1,9</u> ,12[Vi]	g,p	-

**Tableau 1 : Formules antigéniques des sérovars les plus fréquemment isolés de *Salmonella enterica subsp enterica*, extrait du tableau de Kauffmann-White (Le Minor and Popoff 1987 ; Popoff and Le Minor, 1997), d'après (Brisabois, 2001).**

#### ➤ L'antigène O

L'antigène O est associé à la membrane cellulaire et composé de lipopolysaccharides. Dans le schéma de Kauffmann-White, 67 antigènes O sont considérés. On en distingue deux types :

\* les antigènes O majeurs, qui permettent de classer les souches en sérogroupes O. Par exemple dans le groupe D, sont retrouvés les sérotypes qui présentent l'antigène O:9 tels que Typhi et Enteritidis.

\* Les antigènes O accessoires qui sont toujours liés à un antigène majeur. Ils peuvent n'avoir aucun intérêt pour le diagnostic. Ils peuvent aussi être liés à la présence d'un phage dans le cadre d'une conversion lysogénique qui entraîne la modification de l'antigène O.

#### ➤ L'antigène H

L'antigène flagellaire (H) est associé aux flagelles péritriches (il est diphasique. En effet, pour la majorité des *Salmonella*, deux gènes de la flagelline peuvent se présenter avec 2 variants de l'antigène H (Guthrie, 1992 ; Le Minor, 1984). Ces structures permettant à la bactérie de se mouvoir. Ces polymères de flagelline permettent l'agglutination rapide et l'immobilisation

des bactéries avec de 46 à 114 formes antigéniques (Grimont et Weill, 2007 ; McQuiston et al., 2004). Pour la plupart de *Salmonella*,

\* un état unique où la bactérie ne produit qu'un type de flagelle. Ce cas qui est le moins fréquent chez *Salmonella*, est retrouvé chez *S. Typhi* ou encore chez *S. Enteritidis*.

\* un état diphasique où la bactérie peut exprimer alternativement deux types de flagelle, présentant des spécificités antigéniques différentes. Par exemple, *S. Typhimurium* peut présenter un antigène H soit de type i soit de type 1,2. La phase 1 de l'antigène H correspond à l'expression de la flagelline *FliC*. Les souches monophasiques comme *S. Enteritidis* expriment ce type de flagelle. La phase 2 correspond à la flagelline *FljB*. Le passage de la phase 1 à la phase 2 s'opère via l'inversion d'une région chromosomique, nommée région H. Cette région comporte le promoteur de l'opéron codant la flagelline *FljB* et une protéine *FljA*. L'inversion de cette région conduit ainsi à l'absence de transcription de cet opéron (position « off ») ce qui provoque la synthèse de la flagelline *FliC* (phase1). Lorsque cette région est en position « on » (le promoteur dans le sens de transcription de l'opéron), les gènes *fljB* et *fljA* sont transcrits.

### ➤ L'antigène Vi

Le seul antigène capsulaire connu chez *Salmonella* est l'antigène Vi. Il a été découvert par Felix et Pitt chez *S. Typhi*. Ce dernier n'a été identifié que chez 3 sérovars, Typhi, Paratyphi C et Dublin. Leurs formules simplifiées peuvent être trouvées dans le tableau de Kauffmann-White (Popoff and Le Minor, 1997). L'antigène Vi, d'intérêt diagnostique, masque l'antigène O, rendant les bactéries « O-inagglutinables ». Par chauffage de la suspension bactérienne à 100°C pendant 10 min, l'antigène Vi est solubilisé et l'antigène O devient accessible aux agglutinines.

#### 1.1.4. Classification en sérovars

Le genre *Salmonella* compte actuellement 2541 sérovars (Tableau 2) (Popoff *et al.*, 2004). La plupart de ces sérovars appartiennent à l'espèce *S. enterica*. La sérotypie (*subsp. enterica*) regroupe la majorité des sérovars identifiés (1504 sérovars) (Popoff *et al.*, 2004). L'espèce *S. bongori* comprend uniquement 22 (Popoff *et al.*, 2004). Par ailleurs, les isolats appartenant à la sous-espèce *enterica* sont retrouvés chez les animaux à sang chaud, alors que les isolats des autres sous-espèces, incluant l'espèce *S. bongori*, sont isolés chez des animaux à sang froid et dans l'environnement. Il est intéressant de noter que les isolats de toutes les espèces et de toutes les sous-espèces de *Salmonella* peuvent être isolés chez les humains (Popoff *et al.*, 2004). Le tableau présenté ci-dessous montre le nombre de sérovars déjà identifiés dans chaque espèce ou sous-espèce de *Salmonella* (Tableau 2).

<b><i>S. enterica</i></b>	
Sous-espèce <i>enterica</i>	1504
Sous-espèce <i>salamae</i>	502
Sous-espèce <i>arizonae</i>	95
Sous-espèce <i>diarizonae</i>	333
Sous-espèce <i>houtenae</i>	72
Sous-espèce <i>indica</i>	13
<b><i>S. bongori</i></b>	22
Total	2541

**Tableau 2 : Nombre de sérotypes identifiés dans chaque espèce et sous-espèce de *Salmonella* en 2004 (Popoff et al., 2004).**

### 1.1.5. Bactériologie de *Salmonella*

#### 1.1.5.1. Caractères cultureux et morphologiques

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des bacilles à Gram négatif, généralement mobiles (possédant une ciliature péritriche) (à l'exception de *S. Pullarum-Gallinarum*). Ces bâtonnets de 2 à 3 µm de long sont des bactéries mésophiles, peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel. Elles peuvent se cultiver sur milieu ordinaire contenant des extraits de viande (Le Minor et Richard, 1993), et donnent en 18 à 20 heures, des colonies de 2 à 3 millimètres de diamètre à l'exception de certains sérovars donnant toujours des colonies naines (*Abortus ovis*, *Abortus equi*).

#### 1.1.5.2. Caractères biochimiques

Les caractères permettant l'identification biochimique du genre *Salmonella* sont l'absence d'uréase, de tryptophane désaminase, mais également l'absence de production d'indole et d'acétoïne (test de Voges-Proskauer négatif). Elles réduisent les nitrites en nitrates, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, et fermentent le glucose. Cependant elles ne fermentent ni le lactose ni le saccharose. Par ailleurs, elles produisent du gaz à partir du glucose (sauf *Salmonella Typhi*). La réaction au test à l'oxydase est toujours négative (Le Minor, 1984 ; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996 ; Hanes, 2003). Les deux espèces du genre *Salmonella* peuvent être différenciées par leur caractères biochimiques : *Salmonella bongori* ne fermente pas le sorbitol, contrairement à *Salmonella enterica*, et à l'exception de la plupart des souches de cette dernière, elle se cultive sur un milieu contenant du KCN.

Les six sous-espèces de l'espèce *Salmonella enterica* peuvent aussi être identifiées et différenciées par leurs caractères biochimiques. Les caractéristiques biochimiques des différentes espèces et sous-espèces sont résumées dans la table 3 (Korsak, 2004).

Propriétés et caractères biochimiques	<i>Salmonella enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	Habitat	Hommes et animaux à sang chaud	Animaux à sang froid et environnement				
Sous-espèce	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indiana</i>	
Nombre de sérovars (2005)	1504	502	95	333	72	13	22
<b>Caractères biochimiques :</b>							
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Gélatinase à 36°C	-	+	+	+	+	+	-
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
γ-glutamyl transférase	d	+	-	+	+	+	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
L(+)-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	+

Tableau 3 : Caractères généraux et classification des *Salmonella* (Le Minor, Popoff et al., 1986 ; Korsak, 2004).

+ : positif pour 90 à 100 des souches ; - : négatif pour 90 à 100% des souches.  
d : variable selon les souches.

### 1.1.5.3. Capacité de survie

Le développement de *Salmonella* est optimal pour des températures proches de la température corporelle des animaux à sang chaud, entre 35 et 37°C, et pour un pH de 6,5 à 7,5. Leur multiplication reste cependant assurée pour des températures variant de 6,7 à 41°C. Le large spectre de températures (-20 à 60°C) et de pH (4,1 à 9) auxquels elles sont capables de survivre, ainsi que leur capacité à résister à de aw (activité de l'eau) de 0,94 en font des bactéries extrêmement résistantes aux conditions environnementales même parfois difficiles (congélation), tout en expliquant leur caractère ubiquiste (Griffith et al., 2006). Cependant, la survie de ces micro organismes est stoppée à des pH extrêmes (< 3.8 ou > 9.5) (Henry et al., 1983), et à une valeur d'a<sub>w</sub> inférieure à 0.94.

### 1.1.6. Méthodes de détection

#### 1.1.6.1. Méthode de référence ISO 6579

La norme NF en ISO (International Standard Organisation) 6579 est la méthode de référence pour la détection de *Salmonella* spp. dans une denrée alimentaire, mais également dans des échantillons d'environnement. Dans la nouvelle version (Association Française de Normalisation, version 2002) (Figure 1).

- L'étape de pré-enrichissement est restée la même, dans la quelle l'échantillon est dilué au 10<sup>ème</sup> dans de l'eau peptonée tamponnée.
- Pour l'étape d'enrichissement dans deux milieux liquide sélectifs, le sélénitité-cystine a été remplacé dans cette version 2002 par le milieu Muller- Kauffmann tétrathionate novobiocine (MKTTn), et le Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé à la place de la formule simple de Rappaport Vassiliadis. Ce dernier milieu est souvent le plus approprié pour *Salmonella*, étant donné son excellence sélectivité (Oboegbulem, 1993 ; Busse, 1995 ; Watman, 2000).
- Cette même méthode prévoit ensuite un isolement sur boites de Pêtri, contenant également le milieu d'isolement « Xylose-Lysine-Deoxycholate » (XLD) conjointement avec un autre milieu de choix. Dans un contexte de globalisation des échanges commerciaux de denrées alimentaires, cette norme est la référence internationale pour la détection de *Salmonella* dans les aliments. La figure 1 ci-dessous schématise les différentes étapes de détection de *Salmonella* spp. selon la norme international ISO 6579.

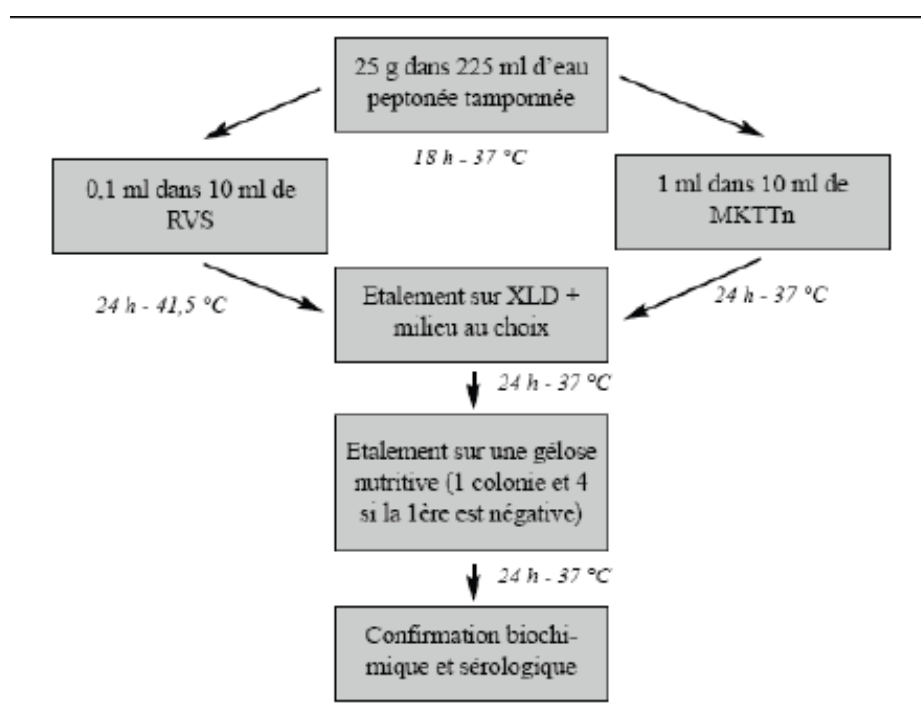


Figure 1 : Détection de *Salmonella* spp. dans les aliments selon la méthode normalisée ISO 6579 :2002- Mode opératoire (Korsak, 2004) (RVS, MKTTn, XLD désignent des milieux de culture de composition spécifique).

#### 1.1.6.2. Nouvelles techniques de détection de *Salmonella* spp.

Les bactériologistes ont sans cesse tenté d'améliorer les techniques d'identification et d'isolement de *Salmonella*, et cela dans le but d'atteindre un seuil très bas de détection de *Salmonella* (Busse, 1995).

- Une des premières voies d'amélioration a résidé dans l'utilisation de milieux semi-solides, exploitant la propriété de mobilité de la plupart des salmonelles. Pour cet effet, De Smedt et al. (1986) ont montré une meilleure performance avec le milieu semi solide appelé « modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis » (MSRV) par rapport à un enrichissement classique avec le tétrathionate. L'ISO a proposé également un amendement à la norme 6579 (2004) destiné à utiliser le MSRV comme milieu d'enrichissement dans les échantillons prélevés dans les exploitations.

- Plus récemment, une nouvelle formule a été proposée ; il s'agit du Diasalm. Ce milieu a montré son efficacité en particulier dans les viandes de volailles (Landman et al., 1996 ; De Zutter et Daube, 1998). Cette méthode utilisant le Diasalm est la méthode officielle belge pour la recherche de *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires (méthode SP-VG-M002). Elle permet de mettre en évidence un grand nombre de sérovars cependant, peut avoir comme inconvénient majeur la non détection de *S. Gallinarum-Pullarum* chez la volaille, étant donné qu'elle est immobile.

D'autres méthodes existent également telles que la « Polymerase Chain Reaction » (PCR), qui abaisse considérablement le seuil de détection de la bactérie. Cette méthode peut être utilisée pour un simple diagnostic rapide, lors des enquêtes dans les cas de toxico-infections alimentaires collectives (TIAC). A cet effet, plusieurs kits de détection ont vu le jour, les plus connus d'entre eux sont BAX<sup>TM</sup>, iq-Chek<sup>TM</sup> et Probelia ». Ce dernier a été validé par AFNOR (Dilasser et al., 1997 ; Benett et al., 1998). Des méthodes immunologiques ont été aussi mises en œuvre dans la détection de *Salmonella*, tel le cas de « Dynabeads » qui utilise des particules magnétiques sur lesquelles des anticorps anti-*Salmonella* ont été fixés pour la capture de la bactérie. Comme exemple, le système automatisé VIDAS (BioMérieux), est largement utilisé dans les diagnostics de routine.

#### **1.1.7. Mécanismes de virulence et pouvoir pathogène**

En théorie, tous les sérotypes de *Salmonella* peuvent être pathogènes chez l'homme. Cette virulence et cette pathogénicité dépend de la dose ingérée de la souche, et notamment du sérotype (Coleman et al., 2004; Weinberger et al., 2004; Foley and Lynne, 2008; Jones et al., 2008). Les salmonelles peuvent causer une infection systémique chez l'humain au statut immunitaire diminué, alors que la plupart d'entre elles engendreront une simple diarrhée fébrile, parfois des vomissements, et des douleurs abdominales. Une fois ingérée, et de l'hôte *Salmonella* va gagner l'intestin qu'elle va pouvoir coloniser. Après avoir survécu au pH acide de l'estomac qui exerce un effet bactéricide, la salmonelle entre en contact avec l'épithélium intestinal et révèle un tropisme pour les tissus lymphoïdes comme les plaques de Peyer, situées au fond des cryptes intestinales chez les mammifères et les tonsils cœcaux chez les oiseaux. Ensuite, *Salmonella* va résider dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules M localisées au niveau de l'épithélium associées aux follicules. Il semblerait que des fimbriae (adhésines) sont présentes pour permettre la reconnaissance et la liaison de *Salmonella* aux plaques de Peyer (Dibb-Fuller et al., 1999 ; Thorns et Woodward, 2000 ; Vimal et al., 2000). Par la suite, *Salmonella* est prise en charge par les macrophages de la lamina propria, qui constituent une niche privilégiée pour sa persistance.

En parallèle, la bactérie peut franchir la barrière intestinale par une autre voie d'entrée, celle des cellules phagocytaires exprimant le CD-18 comme le cas des cellules dendritiques. Ces dernières sont capables de projeter des dendrites à travers l'épithélium intestinal, d'internaliser la bactérie présente dans la lumière de l'intestin et de la transporter vers le côté baso-latéral de l'épithélium (Santos et Baumler, 2004).

### **1.1.8. Epidémiologie des salmonelles**

#### **1.1.8.1. Habitat**

Les salmonelles sont des pathogènes intestinaux (D'Aoust, 1991), qui sont ainsi présentes dans les intestins de l'homme et dans ceux des animaux. Il s'agit d'agents zoonotiques ; transmissibles de l'animal à l'homme et vice-versa. Leur désamination dans l'environnement provient essentiellement de contamination fécale (Berends et al., 1996 ; Murray, 2000) ; Hanes, 2003). Les salmonelles peuvent survivre pendant plusieurs mois dans l'environnement (Korsak, 2004) ; de quelques jours à 9 mois dans les sols et en surface des matériaux de construction des bâtiments agricoles (bois, béton, acier et brique). Elles peuvent aussi survivre dans les aliments d'origine animale (Haeghebaert et al., 2003 ; Oliver et al., 2005) ou végétale (Kirk et al., 2008), les fruits et légumes (Brandl, 2006). Leur capacité de survie leur permet également de persister dans les boues d'épuration (Sahlstrom et al., 2006), dans les poussières, le duvet et les matières fécales bovines (Gray et Fedorka-Cray, 2001). Ces bactéries peuvent se fixer également sur de nombreux supports, comme les bottes, les brosses, les pelles, les roues et les vêtements. Les rongeurs et les insectes sont aussi une source importante de *Salmonella* dans les élevages (Letellier et al., 1999).

#### **1.1.8.2. Réservoirs et spécificité d'hôte**

D'un point de vue épidémiologique, les sérovars de *Salmonella* peuvent être classés selon l'espèce animale cible et le degré de pathogénéicité de ces sérovars (Kingsley et Bäumlér, 2000 ; Korsak, 2004), en trois catégories écologiques ;

Un premier groupe de sérotypes particulièrement pathogènes pour l'homme (responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde) n'est exclusivement isolé que chez celui-ci (Bäumlér et al., 1998 ; Hu et Kopecko, 2003). A ce jour, on ne connaît pas de réservoir animal à *S. Typhi*, *S. Paratyphi* (bien que la *Paratyphi B* a été isolée chez les bovins) et *S. Sendai*.

Un deuxième est constitué par toute une série de sérotypes qui sont spécifiques aux espèces animales, auxquelles ils sont étroitement adaptés et chez qui ils sont de responsables de maladies parfois graves (diarrhées, avortements...).

On peut citer *Abortus ovis* chez les ovins, *Abortus equi* chez les équidés, *Gallinarum-pullorum* chez les volailles, *Dublin* chez les bovins et *Salmonella Arizona* chez les reptiles (Griffith et al., 2006, Libby et al., 2004). Chez les porcs, les sérovars *Choleraesuis* et *Typhisuis* se sont adaptés spécifiquement à cette espèce (Barnes et bergeland, 1968, Griffith

et al., 2006, Libby et al., 2004). Bien que fortement liés aux espèces citées, les sérotypes adaptés sont transmissibles à l'homme pour qui ils peuvent être pathogènes, voire hautement pathogènes (D'Aoust 1991).

Enfin, la majorité des salmonelles sont ubiquistes. Leur ubiquité se traduit par un large spectre de réservoirs : humains (Todd et al., 2008), animaux, et mammifères (Dechet et al., 2006 ; Swanson et al., 2007), volatiles (Uyttendaele et al., 1998 ; Hennessy et al., 2004 ; Kimura et al., 2004 ; Arsenault et al., 2007 ; Letellier et al., 2007b ; Arsenault et al., 2007 ; Letellier et al. 2007c), reptiles (Woodward et al., 1997 ; De Jong et al., 2005), crustacés (Butt et al., 2004). Elles franchissent la barrière d'espèce et peuvent se transmettre de l'animal à l'homme et réciproquement. Elles sont potentiellement pathogènes pour l'homme, à différents degrés, et déclenchent des cas de salmonelloses par le biais de la chaîne alimentaire (Jones et al., 2000 ; Wallis et Barrow, 2006 ; Ingram et al., 2008). Elles font la plupart du temps l'objet d'un portage sain chez l'animal voire d'une infection subclinique (Korsak, 2004). Ainsi, La majorité des sérovars de *S. enterica* ne sont pas associés à un hôte ou à une maladie en particulier. *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont souvent isolées chez les vertébrés présentant ou non des signes cliniques (Libby et al., 2004). *S. Typhimurium* est identifiée comme le prototype des sérovars à large spectre d'hôtes, elle a été isolée chez plusieurs espèces incluant les humains et des animaux domestiques ou sauvages, des rongeurs et des oiseaux (Rabsch et al., 2002).

### **1.1.8.3. Sources et voies de transmission**

La principale voie de contamination des salmonelles pour l'homme est alimentaire (D'Aoust, 1994; Angulo et al., 2000). Mead et al. (1999) estime en effet que l'alimentation est, aux Etats-Unis, la cause de 95% des infections à salmonelles. Pour ceux-ci, la contamination peut être intrinsèque, comme cela peut être le cas pour les œufs de consommation (Tauxe, 1997 ; Rabsch et al., 2002 ; Tschäpe et al., 2001). Tous les animaux de rente peuvent être également contaminés et constituer une source de contamination. Toutefois, les œufs et les viandes de volailles restent les plus importantes (Telzak et al., 1990 ; Altekruze et al., 1993 ; Henzler et al., 1994 ; Plummer et al., 1995). L'importance des œufs comme source de contamination a été davantage soulignée par Mumma et al. (2004). En effet, une augmentation de 1% de la production d'œufs en incluant un contrôle de *Salmonella* a entraîné une réduction significative des cas humains avec au moins 0.14%.

Une voie secondaire de contamination par *Salmonella* reste le contact avec des matières fécales lors de l'abattage pour les aliments issus d'animaux contaminés, ou encore avec une surface ou un autre aliment contaminé lors de la préparation ou de la transformation des denrées ; on parle alors de contamination croisée. Par ailleurs, la contamination peut également avoir lieu par contact avec des animaux infectés, notamment avec des animaux de compagnie et des NAC (nouveaux animaux de compagnie) (Woodward et al. 1997 ; De Jong et al., 2005 ; Swanson et al., 2007). Aux Etats Unis, *Salmonella* a été associée à des TIA à partir de reptiles, utilisés comme animaux de compagnie (Center for Disease Control, 1999 ; Mitchell et Shane, 2000).



## 1.2. Les salmonelloses

### 1.2.1. Les salmonelloses aviaires

#### 1.2.1.1. Introduction

Les infections aviaires causées par le sérovar Pullorum, responsable de la pullorose, et Gallinarum, responsable de la typhose, sont des maladies graves avec une forte morbidité et de mortalité dans les troupeau (Erbeck et al., 1993 ; Wong et al., 1996 ; Shivaprasad, 2003). Elles sont aujourd'hui rares en Europe, mais encore prédominantes dans les pays en voie de développement. Dans ces pays, ces infections sont responsables de véritables fléaux dans les élevages (ICMSF, 1996) et engendrent des pertes économiques assez importantes pour les producteurs de volailles (NISBET, 2001).

La pullorose est une salmonellose aiguë touchant les jeunes poussins, due à *S. Pullorum*. L'infection a lieu soit *in-ovo*, soit après l'éclosion. La maladie se traduit par une atteinte plus ou moins importante de l'état général associée à une diarrhée blanche, crayeuse et collante. Des formes subaiguës ou chroniques peuvent également subvenir, avec des atteintes localisées.

La typhose est une salmonellose aiguë touchant uniquement les adultes, qui est due à *S. Gallinarum*. Celle-ci se traduit par une importante atteinte de l'état général, une cyanose des appendices, une diarrhée verdâtre et hémorragique, une atteinte respiratoire et parfois des symptômes nerveux. Des formes chroniques peuvent également subvenir, et sont généralement la conséquence d'une pullorose. Dans les pays industrialisés, la quasi-éradication de la pullorose-typhose a créé un vide biologique qui aurait favorisé le développement des infections à salmonelles ubiquistes chez la volailles (Ganière et al., 2005). Théoriquement, elles sont fréquemment dues à cinq sérovars : *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Virchow* et *S. Infantis*. Les salmonelloses aviaires sont généralement des infections asymptomatiques. S'il existe de nombreux sérovars de salmonelles ubiquistes connus chez la Poule (plus de 200 ont été identifiés chez les volailles), *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium prédominent dans les problèmes de santé publique. Ces bactéries ubiquistes ne sont souvent la cause que de symptômes très limités, pouvant se présenter dans les élevages avicoles, selon trois modalités :

- ✓ Le portage sain, avec la présence de quelques bactéries dans l'organisme, mais sans excrétion. *Salmonella* est ainsi hébergée dans les monocytes et les macrophages ou elle est capable de survivre et de se multiplier (Humbert, 1992 ; 1994 ; 1998).
- ✓ Le portage sain, strictement limité au tube digestif des volailles, avec un nombre de salmonelles excrétées allant de moins de 10 à plus de 10<sup>7</sup> microorganismes par gramme de matières fécales. Dans ce cas, l'excrétion peut être intermittente, et l'événement déclenchant peut être le stress, le transport, la mue, les traitements médicamenteux, et l'état immunodéprimé des poules (Van Giessen et al., 2006 ; Golden et al., 2008).

- ✓ L'expression d'une maladie avec des symptômes diarrhéiques et une hyperthermie, lorsque le système immunitaire de l'hôte est soit déficient, soit dépassé par le nombre de salmonelles envahissant l'organisme. Elle peut être due à l'ingestion d'une forte dose de *Salmonella* ou à une importante multiplication de la bactérie dans le tube digestif (Humbert, 1992 ; 1994 ; 1998).

Il est à noter que les pertes directes par des salmonelles en élevage sont en général mineures alors que les conséquences hygiéniques pour l'alimentation humaine et les pertes indirectes liées aux limitations commerciales qui en découlent, par leur fréquence et leur gravité, en font une zoonose majeure. Voici les sérotypes impliqués dans le statut réglementaire des différentes salmonelloses des oiseaux et élevages (Tableau 4).

Sérovar	Espèces cibles	Statut réglementaire
<i>S. Enteritidis</i>	Poules et dindes reproductrices et futures reproductrices	MRC
<i>S. Typhimurium</i>		
<i>S. Virchow</i>		
<i>S. Hadar</i>		
<i>S. Infantis</i>		
<i>S. enterica</i> tous sérotypes		MDO
<i>S. Enteritidis</i>	Poules pondeuses d'œufs de consommation et futures pondeuses	MRC
<i>S. Typhimurium</i>		
<i>S. enterica</i> tous sérotypes		MDO

**Tableau 4 : Statuts sanitaires des différentes salmonelloses des oiseaux en France (Ganière et al., 2008).**

**MRC** : Maladie Réputée Contagieuse

**MDO** : Maladie à Déclaration Obligatoire

### 1.2.1.2. La pathogénèse de l'infection à salmonelles chez la volaille

La pathogénèse de *Salmonella* débute par l'ingestion orale de la bactérie. L'environnement des oiseaux est la source habituelle de cette transmission. L'aliment ainsi que l'eau contaminé sont les plus importantes sources d'infections à *Salmonella* chez la volaille (Cox et al., 1991 ; Heyndrickx et al., 2002). La transmission verticale de certains sérotypes de *Salmonella* peut aussi être une importante source : les poussins d'un jour peuvent aussi être infectés par les poules productrices porteuse de la bactérie ainsi que leurs œufs (Barrow, 1999 ; Poppe, 2000; Liljebjelke et al., 2005). Une fois que quelques animaux de l'élevage sont infectés, l'infection peut se propager dans tout le troupeau par contact direct entre animaux (Byrd et al., 1998 ; Gast et Holt, 1999), par le biais de certains vecteurs tels les rongeurs et les mouches (Kinde et al., 2005 ; Carrique-Mas et al., 2009), ou bien par voie aérienne (Lever et Williams, 1996 ; Nakamura et al., 1997 ; Holt et al., 1998).

L'adhésion de *Salmonella* à la surface des cellules épithéliales de l'intestin de l'hôte est une étape cruciale dans l'interaction entre l'agent pathogène et son hôte (Finlay et Falkow, 1989) comme dans la pathogénèse d'autres infections bactériennes intestinales. Ce processus d'adhésion se produit principalement par le biais de fimbriae, bien que certaines protéines de la membrane externe semblent jouer un rôle aussi important (Fadl et al., 2002 ; Kingsley et al., 2002).

Une fois attachée, *Salmonella* stimule son absorption par les différents types de cellules épithéliales intestinales en utilisant un système de sécrétion du type III codé par l'îlot de pathogénéicité numéro 1 (*Salmonella* Pathogenicity Island, SPI-1) de l'agent pathogène *Salmonella* (Darwin et Miller, 1999; Zhou et Galmán, 2001). Il s'agit de la phase d'invasion de la pathogénèse. Chez la volaille, cela se produit principalement dans le caecum (Desmidt et al., 1997 ; 1998). Les bactéries s'attachent à la paroi caecale par des interactions de type récepteur-ligand.

Dans un deuxième temps, l'invasion des cellules épithéliales de l'intestin s'établit par la production des cytokines pro-inflammatoires (Kaiser, 1994 ; Klasing, 1998). Ces protéines codées par le SPI-1 attirent les granulocytes hétérophiles et les macrophages du système immunitaire de l'hôte (Van Immerseel et al., 2002). Les bactéries de *Salmonella* sont ingérées et phagocytées, et passent ainsi à travers la muqueuse caecale, et sont capables de survivre et de se répliquer dans les macrophages. Cette étape nécessite également un système de sécrétion de type II codé par SPI-2, permettant la propagation des macrophages infectés, et les bactéries sont en mesure d'atteindre d'autres organes internes tels que le foie, la rate, et le tractus génital (Barrow et Lovell, 1991 ; Barrow, 1999). Il s'agit de la phase systémique de l'infection. Une fois que l'infection systémique s'est établie, la mort rapide de la cellule hôte constituerait un désavantage pour la bactérie. A ce stade, la bactérie demeure dans une niche intracellulaire et retarde la mort cellulaire afin d'avoir plus de temps pour se multiplier dans la cellule hôte et atteindre d'autres organes et tissus de l'hôte (Jesenberger et al., 2000 ; Van der Velden et al., 2000).

### **1.2.1.3. Symptômes et lésions chez la volaille**

Chez le poulet, les biovars du même sérotype *S. Gallinarum* et *S. Pullorum*, provoquent des maladies graves chez le poulet, avec un fort taux de morbidité et de mortalité au sein du troupeau (Erbeck et al., 1993 ; Wong et al., 1996 ; Shivaprasad, 2003). A l'exception de ces 2 biovars, les infections par les autres sérovars de *Salmonella* sont souvent la cause d'un nombre très limité de symptômes, voire aucun chez le poulet. Toutefois, l'infection par *Salmonella* ubiquiste chez la volaille est plus observée chez les jeunes poussins âgés de moins de 15 jours, et moins fréquente chez les poulets de plus de 4 semaines. Les signes sont généralement similaires à ceux observés chez les autres salmonelloses aviaires, ou ayant de très fortes ressemblances avec des signes de maladies septicémiques (Shivaprasad, 2003). Chez le jeune poussin, les signes fréquents sont l'anorexie, et la dépression générale ; les poussins se blottissent en petits groupes avec des plumes ébouriffées, et des diarrhées (Marthedal, 1997 ; McIlroy et al., 1989). Chez les adultes de poules pondeuses infectés, on n'observe normalement pas de symptômes cliniques typiques qui se produisent, bien que

parfois une augmentation limitée du taux de mortalité peut être observée (Humphrey et al., 1991 ; Kinde et al., 2000). Chez les adultes, les symptômes ne sont pas spécifiques et sont similaires quel que soit le sérovar. Cependant, et dans quelques cas particuliers (hôtes à risques, ingestion d'une grande quantité de salmonelles, invasivité de certaines souches pour un même sérovar, particulièrement *Salmonella* Enteritidis, une pathologie transitoire et frustrée, essentiellement digestive avec diarrhée, est parfois accompagnée d'atteinte de l'état général. Compte tenu de son tropisme pour le tractus génital, lorsque *Salmonella* Enteritidis passe la barrière digestive et envahit l'organisme de l'hôte (bactériémie), l'infection peut être transmise verticalement. Dans le cas des poules pondeuses, l'infection est ainsi transmise aux œufs du fait de l'aptitude à coloniser l'ovaire et l'oviducte, et à la descendance dans le cas où il s'agit d'œufs issus de reproducteurs. *Salmonella* Typhimurium, actuellement sérovar le plus rencontré dans les salmonelloses aviaires ; provoque les formes cliniques les plus graves, surtout observées chez les jeunes animaux souvent d'allure septicémique, et notamment en période périnatale. Ce forme de salmonellose provoque une mortalité brutale dans les jours qui suivent l'éclosion, de la prostration (poussins en boules, frileux), une diarrhée liquide blanchâtre et un ventre gonflé. On observe également de nombreuses mortalités en coquille.

#### **1.2.1.4. Les mécanismes de contamination des œufs et le nombre d'œufs contaminés**

Généralement, les œufs peuvent être contaminés par *Salmonella*, par transmission horizontale ou verticale (Gantois et al., 2009). La transmission horizontale signifie que les œufs sont contaminés à travers la coquille de l'œuf pendant ou après la ponte (Messens et al., 2005 ; De Reu et al., 2006), avec les bactéries provenant des matières fécales (Gast and Beard, 1990b ; Barrow et Lovell, 1991 ; Humphrey et al., 1991b).

Il est également possible que la contamination ait lieu directement avant la ponte dans les différents composants de l'œuf (jaune, blanc, la membrane interne de l'œuf) (Keller et al., 1995 ; Miyamoto et al., 1997 ; Okamura et al., 2001), suite à l'infection du système reproducteur de la poule pondeuse (Timoney et al., 1989 ; Shivaprasad et al., 1990).

##### **1.2.1.4.1. Contamination de la surface de l'œuf et la pénétration à travers la coquille**

La présence de *Salmonella* sur la surface extérieure de la coquille de l'œuf et la contamination du contenu de l'œuf représentent une menace réelle pour la santé publique, puisque la consommation d'œufs ou d'ovo-produits contaminés sont les principales sources d'infection par *S. Enteritidis* chez l'homme (Delmas et al., 2006 ; EFSA, 2006). La contamination de la surface se fait soit dans la partie distale de l'oviducte, soit par le biais d'une contamination fécale. C'est le mode de contamination le plus souvent mis en cause. Beaucoup de travaux scientifiques suggèrent que la contamination de la coquille se produit pendant le passage dans le cloaque au moment de la ponte, plutôt que par l'infection de l'ovaire (Rodrigue et al., 1990 ; Barrow and Lovell, 1991). Afin de faire la distinction entre une contamination de la surface de l'œuf provenant de l'environnement, et celle qui a lieu pendant la formation de l'œuf, certains auteurs ont approfondi cette problématique en immergeant l'œuf entier dans le

milieu de culture et en faisant ensuite des cultures de coquilles après avoir assuré préalablement la désinfection de leurs surfaces (Bichlet et al., 1996 ; Miyamoto et al., 1997 ; Okamura et al., 2001). La coquille assure la protection de l'œuf contre toute pénétration microbienne susceptible de le contaminer au travers d'une fêlure ou lavage de la coquille. L'intégrité de la coquille est donc déterminante pour le maintien de la qualité sanitaire de l'œuf. Pour cela, en France, sur une production de 16 milliards, 1 milliard d'œufs est déclassé pour défaut de coquille (INRA, 2006). Il est à préciser que dans l'industrie agro-alimentaire, les salmonelles survivent au cours du stockage mais n'ont aucune possibilité de multiplication à la surface de la coquille. Cependant, la contamination des denrées alimentaires se fait au cours de la préparation et l'intoxication pourrait avoir lieu à la faveur d'une rupture de la chaîne du froid avant la consommation (Humbert, 2001).

#### **1.2.1.4.2. Contamination interne des œufs pendant sa formation**

La contamination du contenu de l'œuf ait lieu pendant sa formation dans le tractus reproducteur de la poule. Ce passage de l'adulte au jeune peut s'effectuer par la voie trans-ovarienne, on parle alors de transmission verticale vraie, où bien la contamination s'effectue lors du passage de l'œuf dans l'oviducte.

\* En effet, une contamination réelle présuppose la contamination des organes génitaux de la femelle et donc une dissémination des salmonelles à partir d'une voie d'entrée digestive ou encore une contamination rétrograde à partir du cloaque.

Bien que *S. Enteritidis* soit le sérotype prépondérant dans le contenu de l'œuf, comparé à d'autres sérotypes, et que le rapport entre la fréquence de contamination du contenu de l'œuf et de l'extérieur de la coquille par *S. Enteritidis* est faible (Humphrey et al., 1991c ; Methner et al., 1995), l'endroit et le moment exact où se contamine l'œuf au cours de sa formation restent à déterminer. Des études expérimentales sur la contamination des œufs pondus par des poules infectées n'ont pas permis de mettre en évidence une relation entre le portage intestinal/fécal et la présence de la bactérie dans le contenu de l'œuf (Gast et Beard, 1990a ; Humphrey et al., 1991b). De plus, des souches de *S. Enteritidis* ont pu être isolées du système reproducteur de poules pondeuses en l'absence de colonisation intestinale (Bygrave et Gallagher, 1989 ; De Buck et al., 2004a).

\* Le contenu de l'œuf peut être également contaminé lors du passage dans l'oviducte. Ce long organe, ouvert en ses deux extrémités, peut être considéré comme une source potentielle de diffusion bactérienne suite à la réception d'un follicule contaminé ou à une contamination cloacale. La plupart des auteurs ont démontré que l'albumen constitue le compartiment de l'œuf le plus fréquemment contaminé (Gast et Beard, 1990a ; Shivaprasad et al., 1990 ; Humphrey et al., 1991c. Gast et Beard, 1993 ; Humphrey, 1994). Pour Humphrey (1994), le fait que l'on retrouve des œufs contaminés à des taux très différents et parfois faibles, implique que la contamination n'a pas toujours lieu au moment de la formation du jaune. Dans ce cas de figure, tous les œufs contaminés le seraient à des niveaux très élevés. Le fait que *S. Enteritidis* a été isolée du jaune aussi bien que du blanc d'œuf provenant de poules

infectées montre que la contamination du blanc d'œuf ait lieu pendant le passage de l'œuf dans l'oviducte (Gast et Beard, 1990b ; Shivaprasad et al., 1990 ; Humphrey et al., 1991c ; Keller et al., 1995 ; Bichlet et al., 1996). En conclusion, la contamination interne des œufs semble résulter essentiellement de la capacité des souches de salmonelles à coloniser les tissus reproducteurs (ovaire et partie haute de l'oviducte). Il s'agit essentiellement de Enteritidis, mais aussi de Heidelberg (Gast et al., 2004).

#### **1.2.1.4.3. Le nombre d'œufs contaminés**

Selon la dose d'infection et le nombre d'animaux utilisés dans les conditions d'inoculations expérimentales, les taux de contamination des œufs à partir des pondeuses infectées par *Salmonella* varie considérablement, allant de 0% à 27% (Keller et al., 1995 ; Okamura et al., 2001). Cependant, dans les conditions d'infections naturelles des troupeaux de poules pondeuses par *Salmonella*, il est admis que ce pourcentage varie fortement, même si la plupart des études indiquent qu'il ne dépasse pas les 3% (Humphrey et al., 1989 ; Kinde et al., 1996 ; Schlosser et al., 1999). En se basant sur les modèles statistiques d'évaluation quantitative des risques, et en passant par la littérature, les estimations du nombre d'œufs infectés par *Salmonella* vont d'1 œuf sur les 12000 à 1 sur 30.000 œufs pouvant être infectés (Ebel et Schlosser, 2000 ; Hope et al., 2002). Le nombre d'œufs contaminés peut également être déterminé au niveau détail. Selon le rapport de l'enquête transversale de la Food Standards Agency (2004) réalisée au Royaume-Uni, et dont l'objectif était d'étudier la proportion d'œufs contaminés par *Salmonella* au niveau d'un point de vente au détail (des boîtes de 6 œufs), a montré que dans 0.34% des 14 753 boîtes de 6 œufs testés (IC95%] 0.17-0.62]), au moins un œuf sur 6 a été déclaré positif pour *Salmonella*. Cependant, une autre petite étude avec des objectifs similaires n'a pas décelé de *Salmonella* dans le contenu d'une dizaine d'œufs testés (Schutze et al., 1996). En résumé, le nombre d'œufs infectés par *Salmonella* dans un troupeau est logiquement en corrélation avec le nombre de poules infectées dans ce même troupeau, et le calendrier de production d'œufs par rapport à l'infection ; les œufs produits peu après l'infection sont beaucoup plus susceptibles d'héberger des salmonelles (Gast et Beard, 1990). Toutefois, il est très difficile d'obtenir des informations précises sur la prévalence intra-troupeau de *Salmonella* dans les cheptels de poules pondeuses, et cela complique l'évaluation quantitative de la gestion de plusieurs mesures de prévention au niveau de la production primaire.

#### **1.2.1.4.4. Réceptivité et doses infectantes**

La susceptibilité de l'infection salmonellique des poulettes est très importante à l'âge d'un jour mais diminue rapidement. Il suffit quelques centaines de bactéries pour infecter le poussin, mais il faut un million de germes pour infecter un poulet à l'âge de 3 semaines.

Cette sensibilité d'infection est à nouveau importante lorsque la poulette entre en production, mais diminue jusqu'au pic de production, période à laquelle il est difficile de l'infecter. Bailey et al. (1998) ont rapporté que seulement 1 à 3 œufs contaminés par *Salmonella* parmi 200 œufs suffisent pour infecter 98% d'un lot de poussins, et cela en 1 semaine. Lorsque ces oiseaux contaminés sont placés dans un enclos au sol au contact avec un lot d'oiseaux sain, à un ratio de 1/10, et seulement 50% des animaux seront contaminés. Par ailleurs, la durée de

l'excrétion des germes dans les fientes des oiseaux est directement liée à la dose infectante. Par exemple, des poulettes infectées respectivement par des doses de  $10^3$ ,  $10^6$ , et  $10^8$  de *Salmonella* Enteritidis, ont une durée d'excrétion de respectivement, 3, 16 et 37 jours (Poppe, 2000).

#### **1.2.1.4.5. Facteurs de risques liés à la présence et la persistance de *Salmonella* spp dans les élevages de poules pondeuses**

Les élevages de volailles peuvent s'infecter par différentes voies. On distingue généralement la voie verticale et la voie horizontale. On entend par la voie verticale, une transmission trans-ovarienne et donc la contamination de l'œuf fécondé, lors du passage de la bactérie des parentaux aux poussins. Et dans ce cas, le contrôle de l'infection chez les parentaux est capital dans un programme de lutte. Pour la voie horizontale, plusieurs études ont rapporté que ce mode est tout aussi important que la voie verticale. Et de ce fait, plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la transmission horizontale ;

Le système dans lequel les poules sont logées a souvent été décrit comme un facteur de risque pour les élevages de poules pondeuses, même si les études publiées montraient des résultats contradictoires, allant d'aucune influence (Schaar et al., 1997), à un effet préventif du système de cages en batteries conventionnelles (Mollenhorst et al., 2005), et jusqu'à à un risque élevé de contamination des élevages par *Salmonella*, élevés en cages comparés à d'autres systèmes d'élevages (Mølbak et Neimann, 2002; EFSA, 2007 ; Van Hoorebeke et al., 2010). Pour interpréter cette variabilité de ces résultats, trois éléments doivent être pris en compte. Premièrement, les grandes différences dans la taille des échantillons ainsi que la méthodologie utilisée dans les différentes études. Deuxièmement, aucune de ces études citées n'a été spécifiquement mise en place afin de déterminer l'influence du système de logement des pondeuses sur la prévalence de contamination par *Salmonella*. Enfin, des facteurs tels que la taille du troupeau et le statut vaccinal peuvent jouer un rôle de confusion, et par conséquent, ça rend très difficile de tirer une conclusion cohérente sur l'influence du système de logement sur la prévalence de contamination des salmonelles dans les troupeaux de poules pondeuses.

Plusieurs études ont démontré que le stress avait un effet immunosuppresseur chez les poules pondeuses, et la volaille en général (El-Lethey et al., 2003 ; Humphrey, 2006). Cela pourrait avoir par la suite des conséquences négatives à l'égard de l'infection des élevages par *Salmonella*, ainsi que sa dissémination (Hughes et al., 1989). Effectivement, il y'a plusieurs périodes dans la vie d'une volaille et tout au long de la où elle est soumise à un stress tels que le début de ponte (Jones et Ambali, 1987 ; Humphrey, 2006), dernière étape de la période de production, les températures extrêmes (Thaxon et al., 1974 ; Marshally et al., 2004), ou le transport du troupeau d'élevage jusqu'à l'abattoir (Beuving et Vonder, 1978).

Le rôle des rongeurs, mouches, coléoptères et les oiseaux sauvages comme vecteurs dans le transfert de *Salmonella* ont été largement rapportés (Garde-Petter, 2001; Davies et Breslin, 2001 ; 2003; Kinde et al., 2005 ; Stenzel et al., 2008 ; Carrique-Mas et al., 2009a). En effet, il a été démontré que les souris capturées dans les environs d'un bâtiment hébergeant des poules pondeuses infectées, étaient 4 fois plus souvent trouvées positives pour *Salmonella* que les

souris capturées aux alentours d'un bâtiment hébergeant des poules pondeuses non infectées (Garber et al., 2003). Concernant les insectes, une étude a montré que dans 14 bâtiments pour poussins à l'engrais, les coléoptères hébergeaient la même souche de *Salmonella* que les poussins (Skov et al., 2004). Une autre étude a démontré également que lorsqu'on relâche des coléoptères contaminés par *Salmonella* dans une chambre contenant des poussins sensibles, ces derniers sont infectés dans les 4 jours qui suivent (Hald et al., 1998). Plus spécifiquement aux élevages de poules pondeuses ; il s'agit de « l'acarien rouge des volailles (*Dermanyssus gallinae*) ».

L'aliment contaminé constitue également une importante source d'infection des élevages de volailles. Ainsi, une étude portant sur l'examen d'échantillons prélevés dans l'environnement des élevages de poules, a révélé que 13.4% des échantillons d'aliments étaient contaminés par des salmonelles (Poppe, 2000).

Les aliments sont souvent contaminés durant le stockage et la préparation. Au Royaume-Uni, entre 1995 et 1997, sur 15000 échantillons d'aliments complets pour volaille et porcs, 3% de ces échantillons étaient positifs pour *Salmonella* (Davies et Hinton, 2000).

Enfin, l'utilisation de la vaccination contre *Salmonella* a sans aucun doute une influence significative sur la protection des cheptels de poules pondeuses contre *Salmonella*, étant donné que les vaccins actuellement disponibles réduisent à la fois l'excrétion et la colonisation du tractus génital de la poule, et conduisant ainsi à une diminution significative du nombre d'œufs contaminés intérieurement (Feberwee et al., 2001 ; Woodward et al., 2002; Gantois et al, 2006). Le schéma ci-dessous (Figure 2) représente le cycle de contamination par les salmonelles à travers toutes les chaînes animales et environnementales.



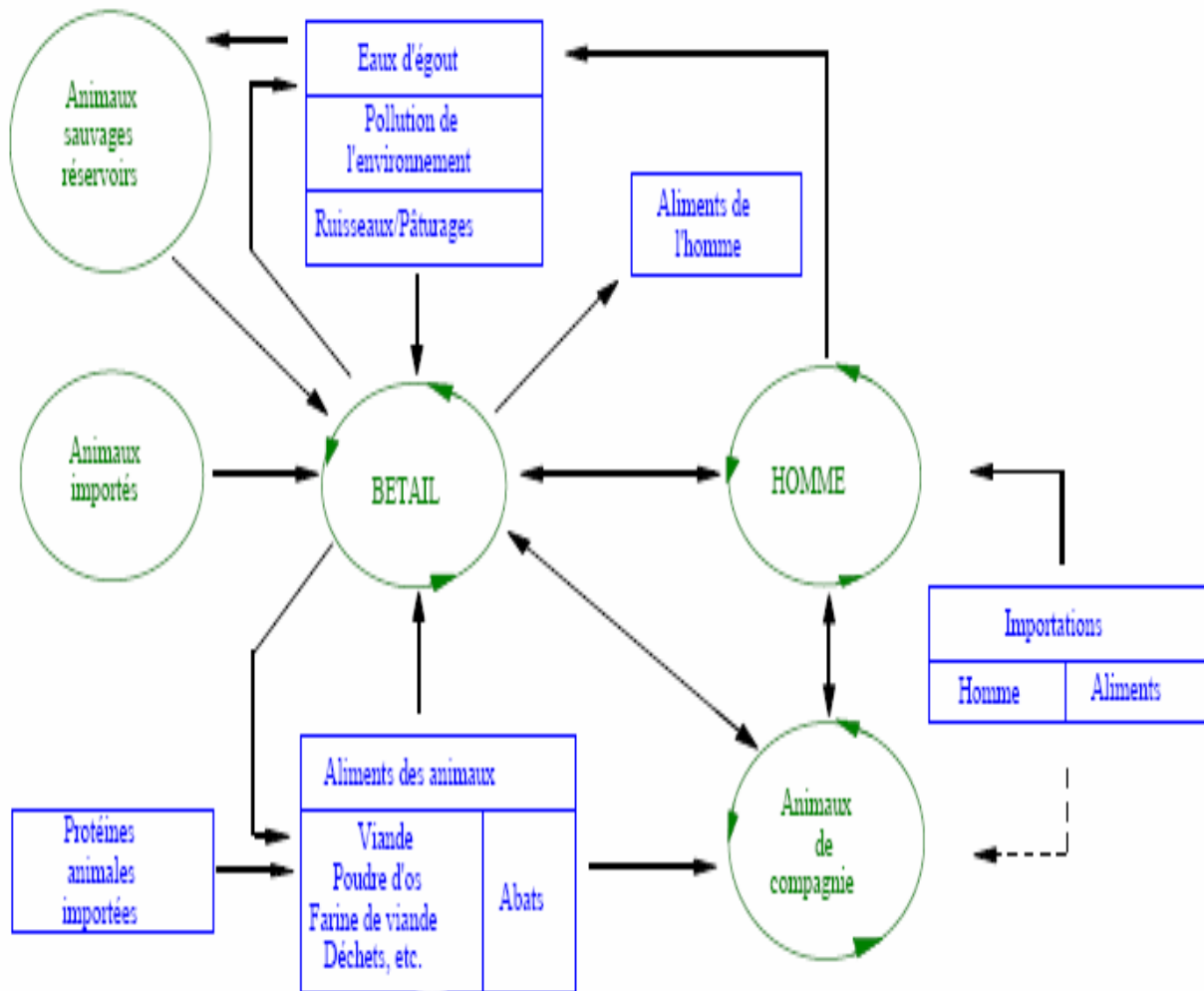


Figure 2 : Cycles de salmonelles selon Bouvet et al. (2001)

#### 1.2.1.5. Programme de contrôle de *Salmonella* dans les élevages aviaires selon le contexte législatif de l'UE

L'augmentation importante des cas d'infections humaines à *S. Enteritidis* dans le monde, depuis les années 1980, a été largement associée à la montée du nombre de foyers de ce sérotype chez les volailles entre les années 1960 et les années 1980 (Hogue et al., 1997; Rabsch et al., 2000).

En raison du rôle important de la volaille dans l'épidémiologie des salmonelloses humaines, et étant donné que la grande majorité des cas humains provient de la consommation d'œufs contaminés, le Conseil européen a émis la directive 92/117/CEE concernant les mesures à prendre contre certaines zoonoses et agents zoonotiques chez les animaux et les denrées alimentaires d'origines animales afin d'éviter des toxi-infections alimentaires. Dans cette directive, on proposait de mettre en place un programme de surveillance et de mesures afin de réduire le risque d'introduction de *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis dans les exploitations de poules productrices. Bien que cette directive fût une tentative pour réduire significativement l'importante augmentation des salmonelloses humaine dans les pays de

l'UE, le bénéfice en santé humaine a été plutôt limitée. L'une des raisons est que l'accent était mis sur le contrôle de la transmission verticale de *Salmonella*. Cependant la transmission horizontale a été négligée, bien qu'elle soit aussi importante que la transmission verticale, tant en production d'œufs qu'en production de viande.

Afin d'affiner les mesures de cette première directive, le parlement de l'UE a adopté le règlement 2160/2003, qui avait pour objectif de faire en sorte que des mesures efficaces doivent être prises par les états membres afin détecter et de contrôler les salmonelles et d'autres agents zoonotiques à chaque étape de la production, la transformation et de la distribution, en particulier au niveau de la production primaire (Anonymous, 2003a). Effectivement, chaque type de mesure et chaque étape a une certaine importance dans la réduction de *Salmonella* et le risque qu'elle représente pour la santé publique. Une directive ultérieure (2003/99/CE) a déclaré que des agents zoonotiques et de leur résistance aux antimicrobiens doivent être strictement contrôlés (Anonymous, 2003b). L'accent de l'approche européenne dans cette réglementation est le contrôle de la contamination des œufs par *Salmonella* et la prévention et la surveillance épidémiologique au cours de l'élevage des poules pondeuses et la production d'œufs dans ces exploitations en vue d'évaluer les tendances et les sources. L'un des faits de cette législation est que les états membres doivent établir des programmes nationaux de contrôle des salmonelles. Les exigences minimales dans ces programmes pour les bandes commerciales de poules pondeuses ont été fixées dans le règlement 1091/2005 (Anonymous, 2005c). Elles comprennent a) qu'un antimicrobien ne peut être utilisé pour contrôler *Salmonella*, b) que dans les états membres où la prévalence de *S. Enteritidis* dans les élevages de poules pondeuses est supérieure à 10%, la vaccination contre *S. Enteritidis* est obligatoire, c) et que les vaccins vivants ne peuvent être utilisés au cours de la période d'élevage des poulettes, et que le fabricant doit fournir une méthode pour distinguer le vaccin à partir des souches sauvages de *S. Enteritidis*.

Les données de surveillance, disponible depuis l'application de la directive 92/117/CEE du Conseil, a permis de fixer des objectifs de réduction de la prévalence des salmonelles dans les cheptels des parentaux reproducteurs. Ces objectifs ont été fixés dans le règlement 1003/2005 (Anonymous, 2005b), ce qui implique que la prévalence des 5 sérotypes réglementés, dans les cheptels reproducteurs de plus de 250 poules pondeuses ne peut excéder 1%. Une des mesures pour y parvenir était l'échantillonnage obligatoire de tous les troupeaux de reproducteurs et les couvoirs depuis le 1<sup>er</sup> Janvier 2007. Si *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* est détectée, les œufs de ces troupeaux ne peuvent plus être éclosés et les poules sont abattus ou soumis à l'abattage sanitaire. Si *S. Infantis*, *S. Virchow* et *S. Hadar* sont détectées, l'agriculteur doit élaborer un plan d'action spécifique afin d'éliminer l'infection et empêcher la dissémination. Les états non-membres de l'UE fournissant des œufs de volailles à couvrir pour les élevages se trouvant dans les pays de l'UE doivent avoir présenté un programme de contrôle des salmonelles qui doit être équivalent ou similaire aux exigences de de l'UE.

### **1.2.1.6. Réseau d'épidémiosurveillance des maladies animales en Algérie**

Le réseau d'épidémiosurveillance national Algérien a été initié en 1984, consolidé en 1988 suite à la promulgation de la loi régissant la médecine vétérinaire et la protection de la santé animale. La réglementation en vigueur impose à tout vétérinaire quelque soit son secteur d'activité, la déclaration obligatoire de toute maladie animale contagieuse tant celles confirmées ou celles fortement suspectées.

Selon les bases réglementaires établies sur ;

La loi N° 88-08 relative aux activités de la médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale.

- Décret N° 95-66 du 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leurs sont applicables modifié et complété.
- Décret exécutif N°06-118 du 12 mars 2006 complétant le décret exécutif N°88-252 du 31 décembre 1988 fixant les conditions d'exercice à titre privé des activités de médecine vétérinaire et de chirurgie des animaux.

#### **1.2.1.6.1. Structure et fonctionnement du réseau**

En Algérie, il existe 48 Wilayates (provinces), elles même divisées en 400 daïra (arrondissement). Le système de surveillance actuel relie la Direction des Services Vétérinaires (DSV) avec les 48 Inspections Vétérinaires de Wilaya (IVW), les 7 Laboratoires Vétérinaires de l'Institut National de la Médecine Vétérinaire (INMV) et les bureaux d'hygiène. La figure 3 montre le système de surveillance des maladies animales en Algérie.

##### **- Direction des services vétérinaires**

L'unité d'épidémiologie de la DSV centralise l'ensemble des données provenant des différents maillons. Ces données sont traitées, analysées et interprétées. Les bulletins mensuels et annuels sont établis. Ils sont ensuite transmis vers toutes institutions concernées des 48 wilayas du pays, qu'elles soient étatiques ou privées (vétérinaires vétérinaires privés et étatiques ; instituts techniques (INMV, Institut Pasteur d'Alger, Institut National de la Santé Publique), aux écoles et instituts des sciences vétérinaires ainsi que les pays étrangers conventionnés avec l'Algérie. La figure 4 montre les dernières estimations ministérielles du nombre de vétérinaires publiques et privés exerçant sur tout le territoire national.

##### **- Inspections vétérinaires de wilayas (IVW)**

Pour consolider le réseau, et le rendre plus opérationnel, un vétérinaire responsable du réseau d'épidémiosurveillance est désigné au niveau de chaque wilaya. Ce vétérinaire est installé à l'IVW afin de pouvoir suivre de près la situation sanitaire des élevages, et être en relation direct avec le bureau de la surveillance sanitaire de la DSV.

## - **L'institut national de la recherche vétérinaire (INVM)**

L'INVM est un organisme public à caractère administratif créé en 1976, placé sous la tutelle du Directeur des services vétérinaires. Il regroupe à Alger une direction scientifique et technique ainsi que le laboratoire central vétérinaire (LCV), et en région, un ensemble de 6 laboratoires vétérinaires régionaux décentralisés.

## - **Inspecteurs vétérinaires à l'échelle des Dairas**

Chaque Daïra (province locale) compte au moins un fonctionnaire vétérinaire fonctionnaire portant le grade « inspecteur ». Le rôle de l'inspecteur vétérinaire de la Daïra est de coordonner l'action des bureaux d'hygiène communaux de la Daïra, tout particulièrement lors des opérations de prophylaxie et de police sanitaire. Tout foyer déclaré d'une maladie animale fera l'objet d'un suivi par un vétérinaire de l'état jusqu'à l'éradication totale du foyer. Ces inspecteurs vétérinaires sont chargés des contrôles au niveau des bureaux d'hygiène, des abattoirs, des postes frontières et des centres de quarantaines.

Ils récoltent les données, et les transmettent aux bureaux d'hygiènes, à l'Inspection Vétérinaire de Wilaya et à la DSV. Ces informations sont véhiculées à travers le formulaire officiel de déclaration, les rapports de suivi des foyers et les rapports mensuels des activités vétérinaires.

## - **Bureaux d'hygiènes**

La plupart des communes disposent d'un Bureau d'Hygiène Communal (BHC), sous l'autorité du président de l'assemblée populaire communale (le maire), comprenant au moins un vétérinaire fonctionnaire.

Certaines communes peu peuplées se regroupent pour constituer un bureau d'hygiène commun. Le BHC exerce particulièrement des missions d'hygiène alimentaire et porte un appui au vétérinaire de Daïra pour les campagnes annuelles de vaccination (clavelée, fièvre aphteuse).

## - **Laboratoires régionaux**

Les laboratoires sollicités pour une éventuelle confirmation ou infirmation de la maladie, assurent le retour d'informations aux vétérinaires demandeurs par des bulletins d'analyses, et à la direction des services vétérinaires à travers les bilans mensuels.

## - **Observatoires**

Vu la situation épidémiologique des pays du sahel, constituant un risque potentiel pour le cheptel Algérien à partir des frontières sud, deux observatoires ont été mis en place, l'un à Adrar et l'autre à Tamanrasset. Ces observatoires sont chargés de constituer une base de données qui renseignera sur le statut sanitaire de la région sud du pays à travers la

surveillance clinique permanente et la mise en place progressive d'un système de séro-surveillance de certaines maladies.

#### - **Vétérinaires libéraux**

Les vétérinaires praticiens disposent des mêmes fonctions que les vétérinaires inspecteurs. Il s'agit de la collecte et de l'acheminement des données élémentaires concernant les maladies animales. Afin de renforcer leur intégration dans le réseau d'épidémiosurveillance, un mandat sanitaire leur a été attribué dès 2004 pour la réalisation de certains programmes officiels de prophylaxie ordonnés par la DSV.

#### - **Eleveurs**

Les liens entre éleveurs et secteur vétérinaire varient selon les filières de production. Dans la filière avicole et la filière lait, les éleveurs bénéficient d'un encadrement vétérinaire plus au moins rapproché. Dans les filières extensives telles que l'élevage de petits ruminants, les relations avec les vétérinaires sont bien plus lâches.

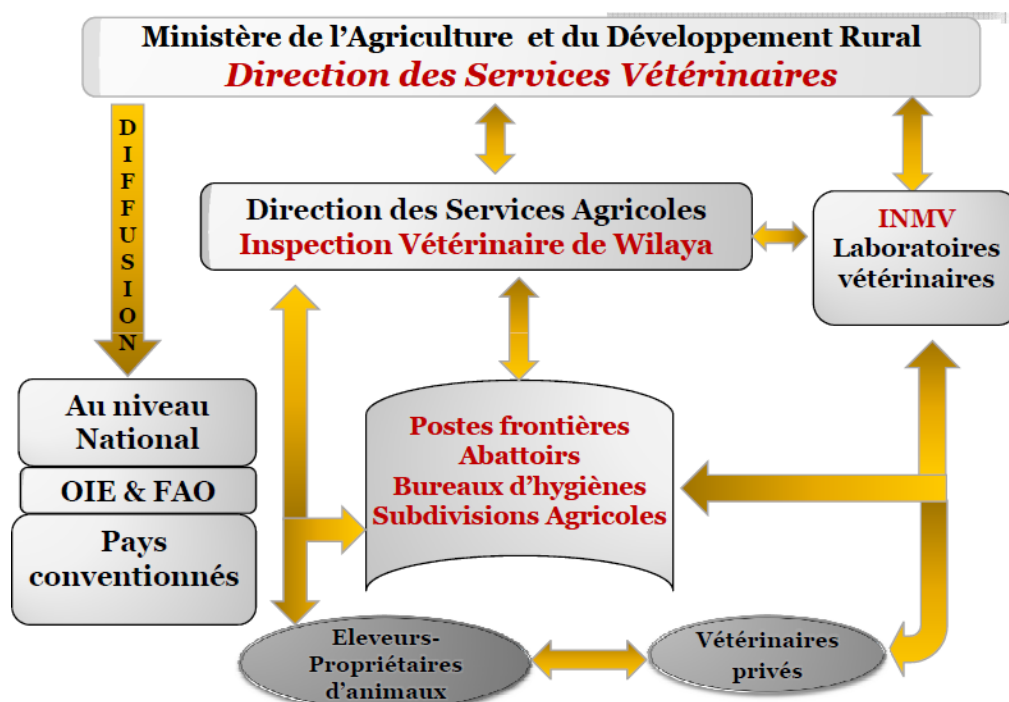


Figure 3 : Le système d'organisation des Services Vétérinaires en Algérie.

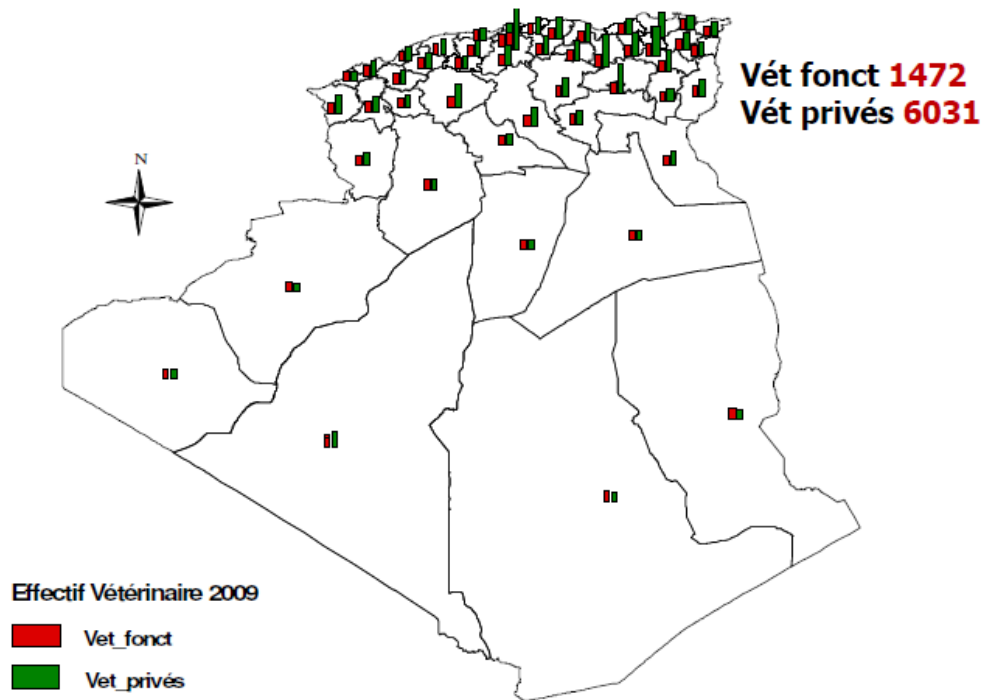


Figure 4 : Le Nombre de vétérinaires à travers le territoire Algérien selon les estimations du ministère de l'agriculture et du développement rural.

### 1.2.2. Les salmonelloses humaines

La Salmonellose est l'une des maladies infectieuses les plus fréquentes dans le monde, et c'est la plus importante en termes d'impact sur la morbidité et la mortalité chez l'Homme. Plus de 2500 sérotypes de salmonelles sont considérés comme pathogènes pour l'homme parmi lesquels on distingue ;

\* Les salmonelloses spécifiquement humaines, connues sous le nom de fièvre typhoïde ou paratyphoïde. Elles sont causées respectivement par *S. Typhi* et *S. Paratyphi*, et *S. Sandaï*, qui sont des sérotypes strictement adaptés à l'Homme.

\* Les salmonelloses non typhiques responsables des salmonelloses dites mineures. Leur réservoir majoritaire est le règne animal avec parfois un portage asymptomatique par l'animal et certaines préférences selon l'espèce animale. Par exemple les sérotypes Enteritidis, Virchow et Hadar contaminent principalement les volailles tels que le poulet, la dinde ou le canard. Le sérotype Dublin et Bovismorbificans infectent surtout les bovins tandis que Derby et Panama sont fréquemment isolés chez le porc (Weill, 2008). Bien que plus de 2500 sérotypes de *Salmonella enterica* ont été identifiés, la plupart des infections humaines sont causées par un nombre limité de sérotypes (Jones et al., 2008). En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé que parmi les cas de salmonelloses déclarées en 1995, dont la cause étiologique a été établie, trois sérotypes seulement se partagent 76 % des infections humaines: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* et *S. Typhi*.

### **1.2.2.1. Salmonelloses spécifiques à l'homme**

La fièvre typhoïde touche chaque année 16 millions de personnes dans le monde, conduisant ainsi à 600 000 décès (Pang et al., 1995 ; Hu et Kopecko, 2003). Il s'agit de la forme la plus grave des salmonelloses humaines puisqu'en absence de traitement, elle évolue sous forme de septicémie généralement mortelle. Le réservoir strictement humain est entretenu par des personnes contaminées (malades, convalescents ou porteurs asymptomatiques) qui excrètent la bactérie via leurs selles ou leurs urines. Ces cas de fièvre typhoïdes estimés sont essentiellement répertoriés dans les pays du tiers-Monde. Dans les pays industrialisés, les cas sont généralement importés, via les voyageurs, les immigrants ou la nourriture. Les bactéries ainsi éliminées peuvent contaminer l'eau et les denrées alimentaires (surtout non cuits, comme les produits laitiers). Cinq pour cent des cas infectés par *S. Typhi* deviennent des porteurs chroniques asymptomatiques (Mermin et al., 1999).

#### **1.2.2.1.1. Pathologie**

Après une période d'incubation de 7 à 21 jours, la maladie peut revêtir diverses formes (Hu et Kopecko, 2003). Elle se manifeste par des troubles digestifs (constipations ou diarrhées) et des céphalées importantes accompagnées de fatigue. La fièvre atteint 39 à 40°C à la fin de la première semaine.

L'infection peut être asymptomatique ou provoquer des symptômes très légers, avec de maux de tête intenses, douleurs abdominales, des nausées, de la diarrhée. Ces symptômes s'observent dans les cas de *S. Paratyphi*. Dans les cas sévères, la fièvre typhoïde peut s'accompagner de septicémie. Elle touche surtout les enfants en bas âge et les adultes immunodéprimés (Bäumler et al., 1998). En cas d'absence de traitement ou de traitement tardif, des complications surviennent généralement (troubles neurologiques, diarrhées cholériques, hémorragies et perforations intestinales,...) pouvant aboutir à la mort du malade.

#### **1.2.2.1.2. Traitement**

Chez l'Homme, le diagnostic s'effectue à travers la recherche du micro-organisme à partir d'hémocultures et de coprocultures voire par la mise en évidence des anticorps circulants. L'antibiothérapie repose sur l'utilisation de molécules à bonne diffusion dans le système lymphatique et à bonne pénétration tissulaire : triméthoprim sulfaméthoxazole, chloramphénicol, ampicilline, céphalosporines de troisième génération (ceftriazone, céfopérazone). Par ailleurs, et dans certains pays notamment ceux en voie de développement, les fluoroquinolones sont devenues le traitement de choix pour la fièvre typhoïde étant donné que les salmonelles sont maintenant résistantes à de multiples autres antimicrobiens (Bahan et al., 2005 ; Parry et Threlfall, 2008 ; Wain et al., 1997). C'est le cas pour les 60-65% des souches isolées de *S. Typhi* en Inde et 89-93 % de celles isolées au Vietnam (Pang et al., 1998). D'un autre côté, la prévention repose sur l'hygiène alimentaire et le contrôle de la qualité bactériologique de l'eau. La vaccination concerne les populations des régions

endémiques. Deux types de vaccins sont utilisés actuellement : un vaccin vivant atténué de la souche de *S. Typhi* Ty21a (Suisse) et un vaccin d'antigène capsulaire Vi (France). L'efficacité de ces vaccins n'étant pas de 100%, ils ne sont pas une alternative aux mesures classiques de prévention et représentent un coût non négligeable pour les pays en voie de développement.

### 1.2.2.2. Salmonelloses non typhiques

Les salmonelloses non typhiques sont chez l'homme des pathogènes intracellulaires facultatifs, principalement d'origine alimentaire (Mead et al., 1999). Ces infections sont causées généralement par des sérotypes de salmonelles ubiquistes, affectant 1.3 milliards d'humains, et dont 3 millions périssent (Pan et al., 1995 ; Hu et Kopecko, 2003). Depuis quelques années, les problèmes liés aux salmonelles ont pris de l'importance entre autre à cause de l'augmentation de l'incidence et de la gravité des cas, même si certains pays ont réussi à diminuer le nombre de cas associés à la salmonellose chez l'humain (WHO, 2003). Les salmonelles surviennent sous forme sporadiques ou de TIA. Cependant, elles peuvent aussi entraîner des épidémies régionales, voire internationales. En France et dans les pays industrialisés, *Salmonella* non typhique est une des premières causes de toxi-infections d'origine alimentaire collectives (TIAC).

Les TIAC se définissent par la survenue dans un espace de temps d'au moins deux cas groupés ayant une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Les sérotypes les plus fréquemment impliqués dans les TIAC sont Enteritidis (70.5%), Typhimurium (20.1%), Virchow (1.4%), Heidelberg (0.7%), et Hadar (1.4%) (Anonymous, 2003b). En France, entre 2001 et 2004, les salmonelles étaient responsables de 60% des cas de TIAC (Brisabois et al., 2006). La salmonellose est devenue l'une des zoonoses les plus importantes transmises par la viande dans les pays développés. Il existe de nombreuses sources de contamination humaine dues à la diversité des réservoirs animaux (sauvages ou domestiques) et humains. La contamination survient par l'ingestion de produits alimentaires contaminés d'origine animale. La volaille, les produits de la viande et les œufs sont les aliments les plus souvent identifiés comme source de contamination chez l'homme (Delmas, 2005 ; Sanchez et al., 2002). D'autres aliments peuvent également être incriminés tels que le lait, les fruits frais et les jus, les épices, la crème glacée et les légumes (Sanchez et al., 2002 ; Sivapalasingam et al., 2004).

La viande de porc et les produits transformés du porc sont également des sources significatives d'infection pour l'humain (Baggesen et al., 1996 ; Berends et al., 1998). Généralement, lorsque l'animal infecté développe une salmonellose clinique, celui-ci sera écarté de toute la chaîne de transformation et dans ce cas, la transmission par voie alimentaire est peu probable. Cependant, l'animal infecté est susceptible de contaminer l'environnement d'élevage et même d'autres animaux proches, si bien que la transmission de *Salmonella* à l'homme est encore possible soit par contact direct avec l'animal infecté, soit de façon indirecte par l'environnement proche de l'animal infecté (Nataro et al., 2007). Dans la plupart des cas, la transmission féco-orale est le mode de transmission le plus utilisé par les salmonelles virulentes (Griffith et al., 2006). Les deux sérovars les plus prévalents chez l'humain sont *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*. *S. Enteritidis* est plus souvent associée aux



œufs et à la volaille, il est d'ailleurs le sérotype le plus retrouvé dans 35 pays, faisant de lui la principale cause mondiale de salmonelloses en 1995 (Herikstad et al., 2002). D'un autre côté, *S. Typhimurium* est plus souvent associée aux produits contaminés provenant des porcs et du bœuf (EFSA, 2009).

#### 1.2.2.2.1. Pathologie

Les salmonelloses non-typhiques peuvent s'exprimer sous différentes formes cliniques en fonction d'une part du sérotype, et d'autre part de l'état de réceptivité de l'hôte : de l'infection asymptomatique à une entérite grave pouvant mimer la fièvre typhoïde (Varnam et Evans, 1996). La période d'incubation d'une infection salmonellique chez l'homme varie de 5 heures à 7 jours (Plym Forshell et Wierup, 2006), mais les signes cliniques commencent habituellement de 12 heures jusqu'à 36 heures après la consommation d'un aliment contaminé (Omwandho et Kubota, 2010). Les symptômes courants de la maladie sont ; céphalées, douleurs abdominales, nausées, vomissements, fièvre ((Steinert et al., 1990 ; Anon, 1992 ; InVS, 2004).

Ces symptômes résultent d'une inflammation de la paroi intestinale conduisant à une déshydratation importante, et la maladie dure entre 4 et 10 jours. Dans certains cas, la gastroentérite peut durer plus longtemps qu'une semaine et la sévérité de la maladie peut se traduire par une infection systémique sévère et parfois mortelle (Hohmann, 2001; Mc Cabe Sellers et Beattie, 2004). Des formes septicémiques et /ou extradigestives (pleuropulmonaires, ostéomyélite, neuroméningées, bactériémie, spléniques) peuvent être observées notamment chez les patients immunodéprimés ou atteints de pathologies (Hohmann 2001). Hohmann rapporte que dans 5% des cas de gastroentérite causés par des *Salmonella* non-typhoïdes, une bactériémie se développera (Hohmann, 2001). Ces cas s'observent surtout chez les personnes âgées, les enfants et les immunodéficients (Gordon, 2008 ; Hohmann, 2001 ; Sirinavin et al., 1999) mais des bactériémies peuvent se rencontrer aussi chez des personnes en bonne santé de façon sporadique ( Camart-Périer, 2006).

Certains sérovars sont réputés plus invasifs que d'autres et peuvent engendrer des bactériémies, voire des septicémies, et des lésions extra-intestinales. Les sérotypes Enteritidis et Typhimurium sont responsables de la majeure partie de ces infections particulièrement sévères (respectivement 26% et 50%). Dans le cas des infections extra-intestinales, le taux de décès est plus élevé, de l'ordre de 9% pour les enfants et de 17% pour les immunodéprimés (Ruiz et al., 2004). Enfin des formes cutanées peuvent être observées chez des vétérinaires, des éleveurs, le personnel d'abattoirs et de centres d'insémination. Elle se caractérise par une dermatite pustuleuse avec une atteinte de l'état général plus ou moins importante. Cette affection peut évoluer vers la guérison ou une extension des lésions dermatologiques et une atteinte importante de l'état général (Acha et al., 2005). Enfin pour les formes les plus courantes, l'excrétion fécale peut durer respectivement de 4 à 7 semaines chez l'adulte et les enfants (Buchwald et Blaser, 1984). Cependant, il existe des porteurs chroniques (moins de 1% des infections), pour lesquels l'excrétion peut durer au-delà d'un an. Les salmonelles peuvent ainsi se nicher dans les schistosomes (parasites) ou dans des anomalies structurelles des systèmes urinaires et biliaires. Une étude scientifique a révélé que 7% à 66% des personnes infectées sont des porteurs chroniques (Plym Forshell et Wierup, 2006).

#### **1.2.2.2.2. Traitement**

##### **- Formes habituelles**

Le diagnostic repose sur l'isolement de la bactérie par coproculture. En général, l'antibiothérapie n'est pas mise en place. La guérison est spontanée en quelques jours, relèvent essentiellement d'un traitement symptomatique reposant principalement sur la réhydratation orale du sujet (Cezard et al., 2002).

##### **- Population à risque**

Le traitement antibiotique est donc réservé à une population qui présente des formes sévères, et qui est composé des nouveau-nés de moins de trois mois voire moins d'un an, des personnes de plus de 50 ans et des patients dont le système immunitaire est affaibli (transplantés, immunodéprimés, maladies lympho-prolifératives, schistosomoses, HIV, joints prosthétiques, ...).

Les fluoroquinolones (FQ) sont considérés comme le traitement de première intention chez l'adulte. Chez l'enfant, il est fait largement appel aux céphalosporines de troisième génération (C3G), administrées par voie parentérale. Les fluoroquinolones étant contre-indiquées, elles ne seront prescrites qu'en cas de résistance aux C3G. Les antibiotiques plus anciens, les aminopénicillines ou triméthoprime-sulfaméthoxazole et beaucoup plus rarement les phénicolés peuvent être utilisés si le germe est sensible. Le traitement de première intention est court, afin d'éviter les risques de portage chronique et de récurrence associés aux traitements prolongés (Ruiz et al. 2004; Stoycheva and Murdjeva, 2006).

#### **1.2.2.3. Impact et importance des infections provoquées par *Salmonella* spp**

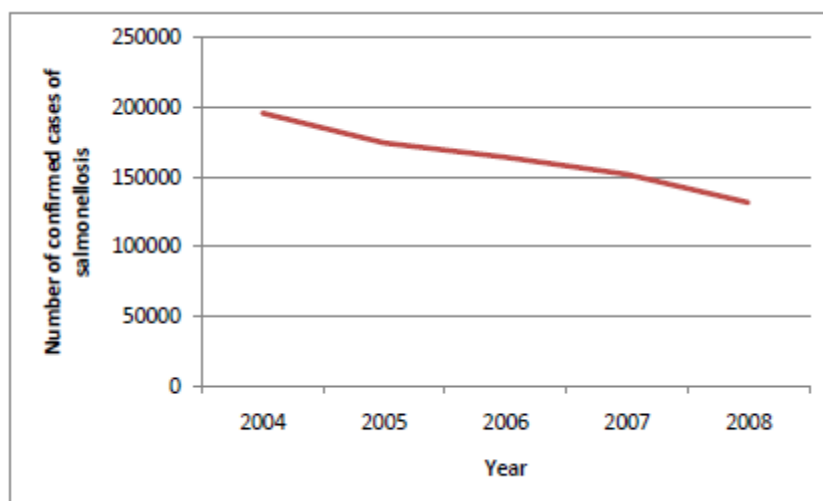
##### **1.2.2.3.1. Enjeu de santé publique**

*Salmonella* peut causer des maladies chez les humains allant de la gastroentérite (*S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*) à une maladie systémique qui peut résulter en la mort (*S. Typhi* : qui cause la fièvre typhoïde).

Les récentes données de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) sur les zoonoses indiquent que *Salmonella* représente la deuxième maladie d'origine alimentaire après *Campylobacter* en Europe (EFSA, 2010 ; Anonymous, 2009a).

Chaque année aux États-Unis, les *Salmonella* non typhiques causent environ 1.4 million de cas de maladies transmises par la nourriture, résultant en 168 000 visites chez le médecin, 15 000 hospitalisations et 580 mortalités (Voetsch et al. 2004, Mead et al., 1999 ; WHO, 2003). En Europe, plus de 150 000 cas confirmés sont enregistrés annuellement (Anonymous 2009b). Cependant, Depuis 2004, l'EFSA remarque une diminution générale de la fréquence du nombre de cas de salmonellose chez l'humain qui serait expliqué par le contrôle intensif

chez les populations animales, particulièrement la volaille, ainsi qu'une meilleure hygiène tout le long de la chaîne alimentaire (EFSA, 2009). Récemment, en 2008, il y a eu 131.468 cas confirmés de salmonelloses humaines dans 27 Etats membres de l'UE. Ce nombre de cas de salmonellose humaine a montré une tendance à la baisse au cours de ces 5 dernières années (Figure 5), et qui est statistiquement significative. Cependant, cela n'a concerné que 10 pays parmi les 27 Etats membres. Dans les autres pays, aucune différence significative n'a pu être observée au cours de cette période, même qu'une augmentation significative a été observée chez 7 états membres.



**Figure 5 : L'évolution temporelle des cas confirmés de salmonelloses humaines dans les pays de l'EU (EFSA, 2010).**

En France, l'Institut de Veille Sanitaire (InVS, 2004) a estimé pour la période 1995-1999, le nombre annuel de cas confirmés entre 32000 à 43000 cas entraînant de 6000 à 10700 hospitalisations. Il a également évalué le nombre annuel de cas confirmés (sporadiques ou liés à des foyers) en 2004 entre 30 600 et 41 140 cas dont 92 à 535 décès, soit un taux de mortalité de 0,3 à 1,3%, ce qui en fait la première cause de gastro-entérites bactériennes d'origine alimentaire. Par ailleurs, il faut noter que les cas confirmés correspondent à des malades ayant consulté un médecin pour la gastro-entérite, auxquels a été prescrite une recherche de salmonelles, dont les résultats (positifs) ont été enregistrés dans l'une des sources ayant servi à l'estimation faite par l'InVS.

Au Royaume-Uni, près de 107 000 cas seraient liés annuellement à *Salmonella*, qui y est la quatrième cause de gastro-entérites aiguës et se place au premier rang en terme de décès relatifs (Flint et al., 2005). Dans d'autres continents, par exemple en Australie, *Salmonella* apparaît au deuxième rang en ce qui concerne les cas sporadiques et au premier rang des causes de foyers épidémiques (Anonymous, 2005), avec un total annuel estimé à 5,4 millions de cas (Flint et al., 2005). Chaque année, au Canada, on dénombre de 6 000 à 12 000 cas de salmonellose humaine (Santé Canada, 2005).

### 1.2.2.3.2. Enjeu économique

Les infections humaines à *Salmonella* ont également un impact économique considérable notamment en termes de perte de productivité liée aux absences temporaires au travail.

Ainsi, des études américaines intégrant à la fois les coûts médicaux et les pertes de productivité estiment le coût annuel lié aux infections à salmonelles non typhiques entre 500 millions et 3,5 milliards de dollars par an (Frenzen et al., 1999). Pour l'année 2008, le coût estimé de ces infections était de 2.6 milliards de dollars américains (USDA, 2009).

En Europe, les coûts annuels liés aux salmonelloses d'origine alimentaire sont estimés entre 560 millions et 2,8 milliards d'euros. Ces estimations sont basées sur un coût de 24 euros par cas à 3,8 millions pour un décès (Anonymous 2001). Pour l'année 2007, l'EFSA a rapporté 151 995 cas confirmés de salmonellose humaine dans l'Union Européenne (EFSA, 2009).

Au Danemark, le coût annuel des infections alimentaires causées par des salmonelles est estimé à 15.5 millions de dollars américains en 2001 (WHO, 2003). Depuis 1995, ce pays a lancé un programme national de surveillance et de contrôle pour *Salmonella* chez les porcs et la volaille. Ce programme impliqué à tous les stades de production, a permis de réduire la prévalence de *Salmonella* chez les porcs de 3.5% en 1993 à 0.7 % en 2000 (Nielsen et al., 2001). Cette réduction de la salmonellose humaine transmise par la nourriture est le résultat du contrôle de *Salmonella* au niveau des fermes et des usines agroalimentaires (Wegener et al., 2003). On a ainsi remarqué une diminution significative de l'incidence des cas rapportés chez les humains. Le coût de ce programme de contrôle (volailles et porcs) est estimé annuellement à 14 millions de dollars américains. Ce qui permet d'économiser annuellement 25.5 millions de dollars américains aux dépenses publiques du Danemark (Wegener et al., 2003 ; WHO, 2003).

Aux Pays-Bas, une étude a estimé les couts des infections par salmonelles en 1999 à 4 millions d'€ (Van den Brandhof, 2004). Robert et al. (2003) a conclu que les couts hospitaliers des infections salmonelliques étaient les plus élevés comparés aux autres maladies infectieuses intestinales.

En Australie, chaque année, 1,2 millions de visites chez un médecin, 300 000 prescriptions d'antibiotiques et 2,1 millions de jours de congé maladie sont associés aux TIAC, dont les salmonelloses, pour un coût annuel de 1,2 milliards de dollars (Kirk et al., 2008).

### 1.2.2.3.3. Sérovars dominants impliqués dans les cas humains

Depuis des années, *S. Enteritidis* caracole en tête des classements de sérotypes parmi les cas humains aux Etats Unis et en Europe, en devenant une pandémie mondiale ces dernières années (Rabsch et al., 2001). C'est également le sérotype le plus souvent identifié lors de cas groupés ou foyers épidémiques (Delmas et al., 2007; Greig and Ravel, 2009). Cela est particulièrement associé aux espèces aviaires et a la capacité de ce sérotype de provoquer une infection trans-ovarienne et de ce fait contaminer les œufs. Egalement, *S. Typhimurium* est un des sérovars le plus souvent retrouvé dans les cas de diarrhée chez l'humain.

En 2007 en Europe, l'infection salmonellique est davantage associée à *S. Enteritidis* (64.5%) qu'à *S. Typhimurium* (16.5%) (EFSA, 2009). En 2008, *S. Enteritidis* était le sérotype le plus fréquemment signalés dans l'UE (58,0% de tous les cas confirmés), suivi de *Salmonella* *Typhimurium* (21,9%) (EFSA, 2010). Cependant, il est à observer que le nombre de cas de *S. Enteritidis* a tendance à diminuer au niveau Européen en faveur de l'augmentation de la proportion relative des cas de *S. Typhimurium*. Par exemple, en Belgique, Depuis le sommet de 15.774 cas en 1999, une diminution du nombre de cas de salmonellose humaine a été observée avec une baisse considérable à partir de 2005, jusqu'à atteindre seulement 3.944 cas confirmés en 2008 (Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, 2009). Cette tendance à la baisse est fortement associée à une diminution drastique des cas de *S. Enteritidis* (Collard et al., 2008). On pense que la vaccination des poules pondeuses commerciales contre *Salmonella* a joué un grand rôle dans cette évolution. Cependant, *S. Typhimurium* est devenu le sérotype le plus souvent isolés, ce qui représente 57,78% des cas (Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, 2009).

Pour le continent américain, aux États-Unis, l'infection est associée autant à *S. Enteritidis* qu'à *S. Typhimurium* et représente environ 45% des infections humaines (Arshad et al., 2007 ; Humphrey, 2000). Une étude de la période 1996-1999 montra que 31% des souches isolées appartiennent au sérotype *S. Typhimurium* et 13% appartiennent au sérotype *Enteritidis* (Kennedy et al., 2004). Au Canada, en 2006, parmi les isolats cliniques de *Salmonella*, *S. Enteritidis* a représenté 22.2% des isolats et 16.8.% des isolats pour *S. Typhimurium* (Gouvernement du Canada, 2006). Quelques chiffres des 2 sérovars dominants isolés à travers le monde sont représentés sur le tableau 5.

Région	Répartition de <i>Salmonella</i>	
	<i>S. Enteritidis</i> (%)	<i>S. Typhimurium</i> (%)
Afrique	19	31
Amérique du Nord	22	27
Amérique du Sud et Centrale et les Caraïbes	39	17
Asie	33	5*
Europe	75	13
Océanie	7†	59

\* *S. Typhimurium* est en 5<sup>ème</sup> position, précédée par *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden*, *S. Anatum* et *S. Stanley*.

† *S. Enteritidis* est en 3<sup>ème</sup> position précédée par *S. Typhimurium* et *S. Virchow*.

**Tableau 5 : La répartition mondiale des deux sérovars dominants *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* des cas humains (WHO, 2009).**

## **2. Caractérisation des souches de salmonelles**

Les bactéries pathogènes d'origine alimentaire sont une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. Leur impact significatif tant sur la santé humaine, que sur l'aspect économique, a nécessité la mise en place et le développement des outils pour leur typage, et dont l'intérêt majeur est de déterminer les origines et les sources de contamination. Ceci s'est défini par l'apparition de marqueurs épidémiologiques permettant ainsi le repérage et le suivi des souches bactériennes au cours du temps, mais aussi de relier les foyers d'infections après consommation d'aliments contaminés avec les sources de contamination. On distingue classiquement les marqueurs phénotypiques qui prennent en compte les caractères exprimés par les micro-organismes et les marqueurs génotypiques qui analysent le génome (Brisabois, 2001 ; Foxman al., 2005 ; Deplano al., 2007 ; Hyytia-Trees et al., 2007 ; Weill, 2008 ; Foley et al., 2009).

### **2.1. Méthodes de caractérisation phénotypique et génotypique des souches bactériennes**

#### **2.1.1. Marqueurs phénotypiques**

Les méthodes phénotypiques étudient les propriétés exprimées par les bactéries. Ces marqueurs relativement faciles à mettre en œuvre, ont pour principal inconvénient est que l'expression phénotypique varie en fonction de l'activité des gènes régulateurs de la bactérie. C'est ainsi que certains caractères sont exprimés ou non en fonction du milieu de culture sur lequel la bactérie s'est développée, de la température d'incubation, etc. Concernant les isolats bactériens de salmonelles, plusieurs techniques phénotypiques sont disponibles pour leurs caractérisation: le sérotypage, le lysotypage, le biotypage et le profil de résistance aux antimicrobiens (Foley et al., 2006 ; Threlfall et Frost, 1990).

##### **2.1.1.1. La sérotypie**

La méthode de sérotypage est utilisée en première intention. Elle est basée sur la détermination des antigènes de surface par l'utilisation d'une série de sérums contenant des anticorps mono et polyclonaux, permettant ainsi selon le schéma de KAUFFMANN-WHITE de classer les différents isolats en sérotypes, L'inconvénient de cette technique est que les antisérums sont coûteux et ne sont pas toujours disponibles dans les laboratoires de bactériologie clinique. Egalement, toutes les souches ne sont pas sérotypables.

Bien que cette méthode soit simple d'emploi et d'interprétation, mais aussi techniquement reproductible, elle est de discrimination souvent limitée. C'est le cas pour les deux sérotypes Enteritidis et Typhimurium, qui sont très fréquemment isolés parmi les cas humains et sont de plus largement présents dans la plupart des sources. Il est donc nécessaire d'introduire une catégorisation des souches d'Enteritidis et de Typhimurium (Galanis et al., 2006), permettant si possible d'obtenir des sous-types inégalement répartis parmi les sources. Dans ce cas de figure, la lysotypie peut être la plus appropriée comme méthode phénotypique (Hald et al., 2004 ; Hald et al., 2007 ; Pires et al., 2008 ; Mullner et al., 2009).

### 2.1.1.2. La lysotypie

La lysotypie consiste à étudier la sensibilité des souches à une série de bactériophages sélectionnés. La plupart des bactériophages sont dits sauvages car ils ont été isolés d'égouts ou en provenance de bactéries lysogéniques. C'est une méthode généralement lourde, pour laquelle la principale difficulté est le maintien des stocks de phages biologiquement actifs et de souches témoins.

Divers schémas internationaux ont été développés. Pour les sérotypes Typhimurium et Enteritidis, nous citerons par exemple, le schéma de COLINDALE, qui a utilisé 37 bactériophages pour distinguer 210 lysotypes pour *Salmonella* Typhimurium, et le schéma de WARD qui a utilisé 16 phages, et qui ont permis de distinguer 65 lysotypes pour *Salmonella* Enteritidis. Cette technique est réservée à quelques centres de référence qui peuvent l'utiliser comme système définitif, car sa mise en œuvre, sa lecture ainsi que son interprétation sont relativement délicates.

### 2.1.1.3. La biotypie

Chez *Salmonella*, la présence fréquente de la gélatinase, la bêtaglucuronidase ou la fermentation du dulcitol et du lactose permettent de subdiviser l'espèce *enterica* en six sous-espèces. Il est facile maintenant de coder les caractères biochimiques en utilisant des galeries API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Ce marqueur est simple à utiliser, d'approche empirique, peu coûteux, mais cependant, est trop peu discriminant au-delà de l'espèce pour être utilisé seul. Cette méthode est généralement peu reproductible (Dijkshoorn et al., 2001).

### 2.1.1.4. L'antibiotypie

L'antibiotypie est basée sur l'étude de la sensibilité des souches à un panel d'antibiotiques. Elle est fréquemment réalisée dans un but thérapeutique, mais également utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques (Kariuki et al. 1999; Harbottle et al., 2006). Le principal avantage de l'antibiogramme est que celui-ci est réalisé quotidiennement au laboratoire sur la plupart des souches isolées de malades.

La résistance aux antibiotiques chez *Salmonella* est déterminée par des gènes situés sur certaines souches sur le chromosome, auquel la résistance sera stable pour une lignée, mais également dans une grande partie des cas sur des éléments génétiques mobiles tels les plasmides. L'inconvénient dans ce cas, le profil de résistance sera moins stable et cette méthode sera à considérer avec circonspection quant aux résultats. Cependant, l'émergence des nouveaux phénotypes multi-résistants constitue fréquemment un signal d'alerte suggérant la dissémination épidémique d'un clone (Struelens, 1996 ; Struelens et al., 1993). Elle permet aussi, une surveillance épidémiologiques de certains sérotypes, notamment *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis (Wray, 1987 ; Stubbs, 1994 ; Moore, 2003).

## 2.1.2. Marqueurs génotypiques

Les méthodes génotypiques permettent de différencier les isolats au niveau du génome et leurs analyses génomiques donnent une meilleure compréhension des relations entre les souches des différents sérovars, en détectant ainsi le degré de parenté génétique entre les différentes souches (Chan et al., 2003). Ces méthodes reposent sur trois principaux mécanismes de discrimination ; (i) celle sur la restriction ou l'analyse de l'ADN total, chromosomique ou plasmidique, (ii) celles basées sur la Polymérase Chain Reaction (PCR), (iii) et celles fondées sur le séquençage des locus spécifiques du génome bactérien. Lors d'une enquête ou investigation épidémiologique, un certain nombre d'éléments et caractéristiques doivent être évalués et pris en compte pour le choix de la méthode de typage moléculaire appropriée et l'interprétation des résultats. Pour chaque méthode choisie, il faut tenir compte de la capacité de discrimination permettant ainsi de distinguer les différences clonales entre les différents isolats, la force de typage et la force de générer des résultats interprétables, et enfin la force de reproductibilité des résultats entre le personnel et les différents laboratoires (Busch et Nitschko, 1999).

### 2.1.2.1. Techniques basées sur la restriction de l'ADN

#### 2.1.2.1.1. Analyse du profil plasmidique

C'est l'une des premières méthodes de typage moléculaire utilisée pour les agents pathogènes d'origine alimentaires tels que *Salmonella* (Mayer, 1988; Schaberg et al, 1981). Elle permet de mettre en évidence le nombre de plasmides hébergés par la bactérie ainsi que leurs tailles sur la base de leurs mobilités électrophorétiques. Les salmonelles peuvent héberger des plasmides de tailles différentes, entre 1 et 200 kb. Ce sont des molécules d'ADN circulaires extra chromosomiques et auto répliquatives. Ainsi, les plasmides peuvent héberger des gènes de résistance aux antibiotiques, des métaux lourds, mais également les facteurs contribuant à la virulence de la souche (Threlfall et Frost, 1990). C'est une technique relativement grossière. Plusieurs procédures d'isolement de plasmides ont été décrites. Généralement ces méthodes se reposent sur l'extraction plasmidique de l'ADN, suivie d'une séparation électrophorétique, et enfin une révélation après coloration au bromure d'éthidium (BET) (Kado et Liu, 1981; Olsen, 2000; Sambrook et Russell, 2001). Enfin, le nombre et la taille des bandes de plasmides sont analysés afin de définir le profil plasmidique pour chaque isolat (Nauerby et al., 2000).

La comparaison des profils plasmidiques entre les souches accroît leur discrimination et permet de délimiter les différentes lignées clonales des souches (Aktas et al., 2007 ; Foley et al, 2006). Pour *Salmonella*, cette technique a permis de subdiviser des lysotypes chez Typhimurium et Enteritidis (Threlfall et al., 1989). Egalement, les profils plasmidiques ont été également employés dans différentes investigations épidémiologiques pour caractériser les souches de *Salmonella* de divers sérotypes et de diverses origines (Millemann et al., 1998; Wachsmuth, 1991; Olsen, 1992; Maré et al., 2001; Liebanna et al., 2002a ; Olsen, 2004 ; Brown et al., 2006).

En général, cette technique s'est avérée intéressante pour suivre le vecteur génétique de résistance associé à des épidémies. Par exemple, un gène de résistance, codant pour une  $\beta$ -



lactamase à spectre élargi de type SHV-34, localisé sur un plasmide a été retrouvé dans 3 espèces d'*Entérobactéries* prouvant ainsi la transmission d'un plasmide épidémique dans une unité pédiatrique (Heritage et al., 2003).

Concernant les limites de cette méthode pour *Salmonella*, elles proviennent du fait qu'un certain nombre de souches manque de plasmides (Hoszowski et Wasyl, 2001; Liebana et al., 2001), ou dans certains cas, les souches de *Salmonella* contiennent de multiples plasmides de poids moléculaires similaires, qui co-migrent et apparaissent ainsi sur le gel comme une seule bande de plasmide (Nauerby et al., 2000).

#### **2.1.2.1.2. L'analyse des profils de restriction de l'ADN génomique (Restriction Fragment Length Polimorphism)**

Le principe de ces méthodes consiste à digérer l'ADN chromosomique de la bactérie par une endonucléase de restriction possédant de fréquents sites de coupure, permettant ainsi de produire un certain nombre de fragments d'ADN qui seront séparés par électrophorèse sur gel. L'inconvénient de cette technique réside dans la difficulté d'interprétation à cause du nombre important de fragments (>100) (Olsen et al., 1993). Pour pallier à cet inconvénient, deux approches ont été développées ; la première est la diminution du nombre de fragments d'ADN par une restriction modifiée, et en utilisant des enzymes spécialisées, tel le cas pour la PFGE, ou bien une seconde approche qui consiste à transférer un grand nombre d'ADN sur des membranes filtre de nitrocellulose ou du nylon. Ainsi fixé, l'ADN s'hybride avec des éléments répétés présents seulement sur quelques fragments du génome bactérien.

#### **➤ Ribotypie**

Le ribotypage repose sur les différences dans la localisation et le nombre de fragments obtenus en utilisant l'ARN ribosomiaux 16S et 23S comme sondes, pour hybrider les gènes présents dans le génome bactérien (Bouchet et al., 2008). Avec cette technique, l'ADN chromosomique est coupé avec une enzyme de restriction largement utilisée, les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel. Une fois séparés, les fragments sont transférés sur une membrane et incubés avec une sonde spécifique d'une région conservée de l'ARNr (Chisholm et al., 1999). Les différences dans le nombre de gènes ribosomiaux et la variabilité génétique des ces régions correspondants conduit à la production de profils distincts qui seront utilisés par la suite afin de discriminer les différentes souches bactériennes (Bouchet et al., 2008).

Le ribotypage a été appliqué à différents sérotypes de *Salmonella* en utilisant plusieurs types d'enzymes de restriction tels ; PvuII (Bailey et al., 2002), ou PstI SphI (Landeras et Mendoza, 1998), et hybridés pour l'une ou l'autre avec une sonde spécifique codant pour les ARNr 16S ou 23S de *Escherichia coli* (Chowdry et al., 1993 ; Grimont et al., 1986). Plusieurs études ont utilisées cette méthode afin de déterminer les relations phylogéniques entre les souches de nombreux sérotypes de *Salmonella* (Stanley et al., 1991 ; Christensen et al., 1993 ; Chowdry et al., 1993 ; Usera et al., 1994). Cette technique a montré un grand

pouvoir de discrimination pour *S. Dublin*, ainsi que pour l'étude des clones de *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium*, et *S. Enteritidis*. Toutefois, son pouvoir est très variable d'un sérotype à un autre ; dans certains cas, il n'est pas possible de relier un ribotype obtenu avec un sérotype donné (Selander et al., 1990). Cette méthode est très reproductible et facilite l'interprétation des résultats en raison de l'absence de variabilité entre utilisateurs (Bailey et al., 2002). Elle a fait ses preuves et largement utilisée bien que sa mise en application soit relativement longue et fastidieuse. Millemann (1996) a utilisé la ribotypie pour l'étude épidémiologique des *Salmonella Typhimurium* isolées en élevage avicole, en utilisant 4 enzymes de restrictions, et qui présentaient entre elles de probables liens de clonalité. Cette étude a recensé 9 ribotypes parmi les *Salmonella Typhimurium*, prouvant ainsi des liens de clonalité entre les différentes souches.

### ➤ **Electrophorèse en Champ Pulsé (PFGE)**

C'est une technique qui repose sur la digestion du génome bactérien par une enzyme de restriction à faible fréquence de coupure, permettant directement par électrophorèse de générer un plus petit nombre de fragments d'ADN, entre 15 -20 bandes. Les fragments ainsi obtenus peuvent être exploités pour l'interprétation des profils. A ce jour, elle est considérée comme la méthode de choix pour le typage moléculaire des bactéries pathogènes (Tenover et al., 1997). Elle est utilisée par le programme PulseNet pour identifier les épidémies des infections bactériennes d'origines alimentaire (Swaminathan et al., 2001).

Le principe de la PFGE consiste à soumettre les fragments d'ADN à un champ électrique particulier permettant la migration des fragments par la méthode d'électrophorèse dite CHEF (Clamped Homogenous Electric Field). Cette méthode alternative de champs électriques homogènes et orientés à des angles de 90° à 120°, permettent une migration en trajectoire des fragments d'ADN de grosse taille allant de 20 à 800 kb (Lukinmaa et al., 2004 ; Van Belkum et al., 2007). La révélation des fragments se fait ensuite de façon classique avec le Bromure d'Ethidium. Concernant les souches de *Salmonella*, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), est actuellement considérée comme la méthode de sous-typage moléculaire de référence. De ce fait, des protocoles standardisés ainsi que des bases de données publiques sont développés pour permettre une comparaison de profils rapide et à grande échelle (Swaminathan et al., 2001 ; Gerner-Smidt et al., 2006). Les enzymes utilisées sont des enzymes reconnaissant des sites rares et générant donc un petit nombre de fragments de grande taille. Les enzymes de macro-restriction utilisées pour le PFGE des *Salmonella* sont *XbaI*, *BlnI* ou *SpeI* (Murase et al., 1995 ; Ribot et al., 2006). Lorsque le PFGE est utilisé avec l'enzyme *XbaI*, la méthode est considérée comme un test épidémiologique, valable pour le sérovar Typhimurium (Doran et al., 2005). Cependant, une deuxième enzyme peut être utilisée pour augmenter le pouvoir discriminant (Davis et al., 2003 ; Fernandez et al., 2003).

Le *PulseNet USA* (*the national molecular surveillance network for foodborne infections in the United States*) utilise une première enzyme pour étudier les relations entre les différents isolats et une deuxième enzyme pour confirmer les résultats ou obtenir une discrimination supplémentaire (Gerner-Smidt et al., 2006).

Les images du gel sont numérisées et analysées à l'aide de logiciels largement commercialisés tels ceux disponibles par le groupe Bio-Rad (Olive et Bean, 1999). L'ADN de

la souche de *S. Branderup* (H9812) est utilisée comme marqueur de poids moléculaires standard lors de l'interprétation des profils (Hunter et al., 2005). La technique de pulstypage a montré un très bon pouvoir discriminant pour les salmonelles, reproductible et efficace (Weide-Botjes et al., 1998 ; Schwarz et Liebisch, 1994a ; Baggesen et al., 1997b ; Boonmar et al., 1998 ; Struelens et al., 2001 ; Moore et al., 2003 ; Eriksson et al., 2005). Toutefois, il existe des variations en fonction du sérotype étudié (Barrett et al., 2006).

### ➤ **Typage par les séquences d'insertion (*IS-200*)**

L'*IS*-RFLP est une technique similaire au ribotypage, seule différence c'est l'utilisation d'une sonde *IS* (séquences d'insertion) comparée aux sondes ARN ribosomiques. Des travaux de caractérisation avec cette technique « *IS*-typie » ont été réalisés pour les sérotypes Typhimrium, Enteritidis, Heidelberg, Paratyphi B, Dublin (Millemann et al., 1995 ; 2000 ; Stanley et al., 1991 ; Olsen et al., 1997). Les séquences *IS200* sont des éléments transposables d'environ 700 pb, et qu'on trouve dans le génome de nombreuses souches de *Salmonella* (Lam et Roth, 1983). Cependant, certains isolats de *Salmonella* manquent de ces séquences *IS* tel le cas, pour le sérotype Agona (Gibert et al., 1990), et certaines souche de *S. Hadar* (Fantasia et al., 1997 ; Wiede-Botjes et al., 1998), ce qui rend la méthode inefficace pour ces isolats (Millemann et al., 2000). L'*IS200* a montré un bon pouvoir discriminant pour les souches de *Salmonella* résistantes et sensibles aux antibiotiques (Threlfall et al., 1993). Elle est généralement utilisée dans les investigations épidémiologiques en association avec d'autres techniques, telles que la PFGE et la ribotypie (Chadfield et al., 2001 ; Millemann et al., 2000).

## **2.1.2.2. Techniques basées sur l'amplification par PCR**

Ces techniques permettent de réaliser une amplification génomique de certaines séquences d'ADN choisies de façon judicieuse. La technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme (*Taq polymérase*), thermostable et de certaines amorces soient universelles qui seront utilisées de façon constante quel que soit le genre bactérien auquel appartient la souche, ou bien des amorces bien ciblées afin de détecter certains gènes, facteurs génétiques, ou bien des facteurs de virulences (Hudson et al., 2000 ; Bruant et al., 2006 ; Gordon, 2001 ; Zheng et al., 2008).

### **2.1.2.2.1. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Cette méthode élégante consiste en 3 étapes : a) restriction de l'ADN génomique, b) ligation d'adaptateurs (oligonucléotides doubles brins) aux extrémités des fragments de restriction, et c) PCR avec différentes amorces complémentaires des adaptateurs et d'un ou plusieurs nucléotides adjacents.

En effet, elle consiste à amplifier des fragments, une fois digérée par 2 enzymes de restriction. Pour cela, le génome bactérien est limité par les deux enzymes *EcoRI* et *MseI* au niveau des multiples sites de restriction qui sont au préalable liés à des adaptateurs. Les adaptateurs sont en effet, des oligonucléotides de courtes séquences, et dont les extrémités sont complémentaires aux sites de restrictions (Mueller et Wolfenbarger, 1999).

Ces séquences d'adaptateurs sont ensuite utilisées comme cibles par les amorces de la PCR pour l'amplification des fragments de restriction. Selon les amorces utilisées, une sélection particulière des fragments de restriction est amplifiée, produisant des profils très lisibles (Janssen et al., 1996 ; Mazurek et al., 1996). Cette technique est très performante pour séparer des isolats de *Salmonella* lors des investigations épidémiologiques.

Elle a démontré des capacités de discrimination similaires à celles de la PFGE (Aarts et al., 1998 ; Desai et al., 2001, Tsai et al., 2005). Par exemple, lors d'une enquête épidémiologique, elle a montré 48 profils différents parmi 97 souches de *Salmonella* étudiées dont un bon nombre de ces souches appartenaient au sérotype Typhimurium (Lindstedt et al., 2000). Cependant, l'utilisation d'un séquenceur d'ADN pour la séparation des produits limite le recours à cette technique par les laboratoires qui n'ont pas accès à des séquenceurs automatiques (Tamada et al., 2001).

#### **2.1.2.2.2. Polymorphism de l'ADN amplifié au hasard ou RAPD (Random Amplification of polymorphic DNA)**

RAPD-PCR repose sur l'amplification aléatoire de certaines séquences d'ADN. Cette technique nécessite une seule amorce et dont la séquence est choisie au hasard (Swaminathan et Barrett, 1995). Les amorces utilisées pour la technique RAPD sont généralement de 6-10 paires de bases (Williams et al., 1990) et s'hybrident à plusieurs endroits du génome bactérien (Busch et Nitschko, 1999). A la différence de la PCR classique, l'utilisation d'amorces de séquences arbitraires présente l'avantage de ne nécessiter aucune information préalable sur la séquence de l'ADN étudié.

Les produits d'amplification sont séparés par la suite sur gel d'agarose. Les profils des produits amplifiés obtenus sont comparés pour déterminer les degrés de parenté entre les isolats (Franciosa et al., 2001. Franklin et al., 1999). Ces fragments reflètent la distribution de sites génomiques partiellement homologues de l'amorce et suffisamment proches pour permettre l'amplification.

La RAPD est une technique rapide, simple, et semble faire preuve d'une bonne discrimination pour le génotypage de nombreuses souches bactériennes, notamment une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné (Hilton et al., 1996).

Néanmoins, la reproductibilité et la répétabilité de la méthode sont passables, ce qui ne permet pas de l'utiliser pour un suivi de souches à long terme (Meunier et Grimont, 1993; Micheli et al., 1994 ; Towner et al., 2001 ; Eriksson et al., 2005). Cette technique RAPD a permis de séparer des isolats appartenant à certains sérotypes (Chansiripornchai et al., 2000), mais a montré ses limites pour différencier les isolats au sein d'un même sérotype.

#### **2.1.2.2.3. Amplification de séquences répétées (Rep-PCR)**

Le génome bactérien possède de courtes séquences d'ADN, dites séquences répétées, distribuées tout au long du génome. Des amorces PCR spécifiques sont conçues pour amplifier l'ADN compris dans les espaces, entre les séquences des unités répétées (Versalovic et al., 1991).

Ces amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse, et les profils obtenus sont comparés entre les différents isolats pour déterminer les liens génétiques. Plusieurs séquences répétées ont été ciblées pour la Rep-PCR, c'est ainsi qu'un élément répétitif hautement conservé appelé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC) a été décrit et utilisé de façon universelle car les positions des séquences « ERIC » sur le chromosome sont variables selon les espèces et les souches (Versalovic et al., 1991). L'ERIC-PCR a été utilisée avec plus ou moins succès pour le typage de certains sérotypes de *Salmonella* (Struelens et al., 1996).

Cependant, elle semble moins discriminante que la ribotypie chez *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis d'origine aviaire (Millemann et al., 1996), et n'a pas permis de discriminer les souches entre elles chez *Salmonella* Dublin (Kerouanton et al., 1996). Le ciblage des séquences *IS200* a également été utilisé dans les méthodologies Rep-PCR pour les sérotypes de *Salmonella* (Amavisit et al., 2001).

Les méthodes Rep-PCR sont généralement moins discriminatoire que la PFGE (Falcao et al., 2006 ; Olive et Bean, 1999), et peuvent avoir un certain problème de reproductibilité. En outre, si une souche n'a pas de nombre suffisant de séquences répétitives assez proches les unes des autres, trop ou peu d'amplicons peuvent être générés (Swaminathan et Barrett, 1995).

#### **2.1.2.2.4. L'analyse multilocus du nombre d'éléments répétés en tandem « Multilocus Variable number tandem repeats Analysis » ou « MLVA »**

La MLVA est une technique basée sur l'examen du polymorphisme de plusieurs locus, comprenant chacun un nombre variable de régions répétées en tandem ou VNTR. La méthode consiste à amplifier dans une ou plusieurs PCRs multiplex ces régions répétées et à analyser la taille des fragments avec un système haute résolution, tel un séquenceur capillaire à multiples colorants fluorescents.

Le séquenceur est utilisé pour déterminer de façon reproductible le type MLVA pour différents sérovars de *Salmonella enterica* (Lindstedt et al., 2004 ; Schouls et al., 2004). L'analyse de la taille des différents VNTRs permet l'assignation d'un profil allélique ou code numérique MLVA. Il s'agit d'une méthode reproductible et, de plus, particulièrement discriminante pour le sérotype Typhimurium.

#### **2.1.2.3. Techniques basées sur le séquençage**

Le génome microbien est sujet à la variabilité de séquence en raison de la mutation et la recombinaison de nucléotides. La variabilité de séquences tout particulièrement des gènes, peut être utilisée dans le typage moléculaire afin déterminer le degré de parenté des souches bactériennes.

### **2.1.2.3.1. Typage moléculaire par *Multilocus sequence typing (MLST)***

La méthode dite de Multi-locus Sequence Typing « MLST » se base sur les multiples changements des bases nucléotidiques au niveau des séquences des gènes. Ces séquences sont ensuite comparées entre elles, afin de déterminer les distance génétique entre les différents locus (Maiden et al., 1998 ; Spratt, 1999). Les allèles de chacun des gènes séquencés sont perçus comme un groupe et la souche se voit attribuer un type de séquence spécifique (ST) (Enright et Spratt, 1999 ; Feil et Enright, 2004). Pour un bon nombre d'espèces bactériennes, une base de données MLST a été mise en place sur internet ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) afin de faciliter l'échange des résultats entre différents partenaires (Enright et Spratt, 1999).

C'est le même principe du système PulseNet créée pour la technique PFGE (Swaminathan et al., 2001). Ainsi les utilisateurs peuvent télécharger des séquences de gènes établies dans la base de données. Si un allèle a été déjà archivé dans la base, on lui attribue le numéro correspondant. Par contre, si la séquence est nouvelle dans la base, on lui attribue un nouveau numéro. Par ailleurs, les résultats de la technique MLST peuvent être analysés en clusters. L'une des méthodes les plus courantes est l'utilisation de l'algorithme Eburst. La technique MLST apparaît comme un outil épidémiologique efficace. La sélection et le nombre des gènes utilisés doivent être suffisants pour différencier les isolats étroitement apparentés. L'utilisation de facteurs de virulence dans la technique MLST a été dénommé typage de la séquence multi-virulence-loci ou MVLST (Chen et al., 2007. Zhang et al., 2004).

Dans le cas des salmonelles, Fakhr et al. (2005) a constaté que la PFGE était plus discriminatoire que la méthode MLST pour les isolats du sérotype Typhimurium. En effet, l'étude a montré 50 profils PFGE parmi les 85 isolats de Typhimurium alors que la MLST a donné qu'un seul cluster. Cependant, ce résultat contraste avec les résultats obtenus par Kotetishvili et al. (2002) pour le même sérotype, qui a démontré un meilleur pouvoir discriminatoire pour MLST comparé à celui de la PFGE. Par ailleurs, Foley et al. (2006) a indiqué que les 2 méthodes étaient en mesure de différencier un nombre identique de profils, mais que selon lui, la technique MLST était capable de différencier 2 isolats qui partageaient le même profil électrophorétique.

### **2.1.2.3.2. L'analyse du polymorphisme de mutation ponctuelle ou « Single Nucleotide Polymorphism »**

L'accumulation récente de séquences de gènes ou de génome bactériens ainsi que des données de variations intra-espèce pour différents gènes, ont permis le développement du typage bactérien basé sur la détection de mutation ponctuelle (SNP). Elle est basée sur la détection de polymorphisme pour des nucléotides isolés. La technique SNP a été largement utilisée en génétique humaine pour l'identification de portions de gènes qui sont associés à certaines conditions de la maladie (Weiner et Hudson, 2002), mais également elle est utilisée dans la caractérisation des souches bactérienne (Cebula et al., 2005 ; Zhang et al., 2006). Comme les espèces bactériennes évoluent et se modifient génétiquement, soit par la suppression ou l'ajout de séquences génétiques via des mécanismes de transfert de gènes, ou par une simple mutation nucléotidique. L'analyse SNP s'adapte à ces mutations nucléotidiques au niveau du génome bactérien pour différencier les isolats entre eux.

Les critères de sélection dans le protocole de génotypage SNP sont les portions de gènes ou certaines séquences avec un taux élevé de polymorphisme, tels ceux associés à la résistance aux quinolones (Esaki et al., 2004. Levy et al., 2004). L'approche universelle pour identifier les nucléotides du gène susceptible d'être polymorphe est d'utiliser les données fournies à partir d'études de séquençage du génome bactérien (Zhang et al., 2006). À l'heure actuelle, un nombre limité d'études ont utilisé l'analyse de SNP de sous-typage moléculaire des bactéries Gram-négatives pathogènes d'origine alimentaire. Concernant *Salmonella*, beaucoup de travaux ont porté sur l'analyse du polymorphisme de certaines régions des gènes qui sont associés à la résistance aux quinolones (Esaki et al., 2004 ; Levy et al., 2004) ou les gènes flagellaire (Mortimer et al., 2004). En conclusion, les méthodes MLST et SNP sont particulièrement adaptées aux études de génotypage à grande échelle. Le principal avantage des méthodes de séquençage pour le typage des souches est l'interprétation non ambiguë des résultats permettant ainsi la création de bases de données internationales.

## **2.2. Interprétation des résultats de typage moléculaire**

La caractérisation moléculaire est basée sur l'analyse des profils génomiques résultant d'une migration électrophorétique des fragments d'ADN. De ce fait, elle permet d'établir les liens de parenté entre les souches bactériennes. En fonction de l'ampleur de l'étude et le nombre d'isolats, l'interprétation peut se faire soit visuellement, soit à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. L'analyse des profils ou des fragments obtenus se base sur les distances de migration ou sur le calcul des poids moléculaires de chacun des fragments. Le degré de parenté entre les différentes souches bactériennes s'appuie sur la comparaison et le pourcentage de similitude des profils de bandes (pouvoir de discrimination). L'indice de discrimination correspond à la probabilité de classer en type distincts deux isolats échantillonnés dans l'espèce étudiée. Cet indice dépend à la fois du nombre de type de profils obtenus par la méthode choisie et de la fréquence relative de chacun des types à l'intérieur d'un échantillon de souches bactériennes indépendantes (Hunter et al., 1988).

Pour la majorité des méthodes de typages, la similitude et le regroupement entre les isolats repose généralement sur le calcul de l'Indice de Dice. Le coefficient de similitude de Dice analyse les profils deux à deux, et qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils (Tenover et al., 1995 ; Struelens et al., 1996 ; Van Ooyen, 2001). Ce coefficient de Dice peut être soumis à des méthodes d'agrégation mathématiques, ainsi calculé automatiquement avec certains logiciels (Molecular analyst Fingerprinter plus, BIO-RAD ou Gel Compar, Applied Maths). Après comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice des similitudes est alors obtenue permettant la construction de dendrogrammes, qui reflètent les liens de parenté au sein des populations étudiées. Celui-ci peut être obtenu par la méthode de groupement du diamètre moyen, dite UPGMA (Unweighted-Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

### **3. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques et un état des lieux de la résistance des salmonelles chez l'homme et l'animal.**

#### **3.1. Résistance bactérienne aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques peut être inhérente à une espèce ou un genre bactérien, où peut être acquise par certaines souches chez une espèce habituellement sensible à l'antibiotique considéré. En effet, ces dernières années, en réponse à la sélection des antibiotiques, les bactéries ont développé, tant sur le plan biochimique que génétique, de nombreux mécanismes de résistance à ces molécules.

Aujourd'hui, l'antibiorésistance est devenue un problème de plus en plus présent tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Ce phénomène a été reconnu comme étant un problème émergent de santé publique. En effet, la plus grande préoccupation actuelle de la communauté scientifique est que l'ensemble des gènes de résistance augmentent et que ceux-ci se retrouvent sur des plasmides ou d'autres éléments mobiles qui permettent leur dispersion (Helmuth, 2000). Par ailleurs, cette émergence est largement suivie de lourdes conséquences humaines et socioéconomiques (Pena et al., 2008).

##### **3.1.1. Les types de résistance bactérienne**

###### **3.1.1.1. Résistance naturelle**

La résistance naturelle ou la résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne sur laquelle l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Pour la Société Française de Microbiologie (SFM), la résistance naturelle se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI) supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné.

Cette caractéristique est partagée par toutes les souches bactériennes d'une espèce ou d'un genre bactérien. Par exemple, *Salmonella* a des résistances naturelles aux classes d'antimicrobiens suivantes : les polypeptides (bacitracine), les lincosamides (clindamycine), les macrolides (érythromycine) (Schwartz et al., 2006), les streptogramines (quinupristine/dalfopristin) et les glycopeptides (vancomycine) (Guardabassi et Kruse, 2008). Généralement le support de cette résistance est chromosomique.

Ceci peut être dû à l'absence de la cible (l'absence de paroi chez les mycoplasmes rendant les bêta-lactamines inactives vis à vis de ces bactéries) ou encore à l'absence de pénétration de l'antibiotique.

###### **3.1.1.2. Résistance acquise**

La résistance acquise est une caractéristique d'une souche ayant la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches



de la même espèce. Cette acquisition peut généralement résulter d'une modification génétique de la cible de l'antibiotique par mutation chromosomique (Chopra et al., 2003) ou d'une acquisition de matériel génétique exogène via un plasmide chez certains isolats de l'espèce (Davies, 1997 ; Prescott, 1999).

#### **3.1.1.2.1. Résistance par mutation chromosomique**

Ce type de résistance est spontané, rare, stable et transmissible uniquement de façon verticale. Ce phénomène spontané n'explique qu'une faible partie de résistance rencontrée en clinique. L'antibiotique n'induit pas la mutation mais dans l'éventualité où celle-ci survient, l'antibiotique favorise et sélectionne les mutants qui sont devenus résistants. La diffusion de ce type de résistance est liée à la diffusion de la souche mutante.

Généralement, l'augmentation de résistance se fait progressivement. Cependant, on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante (Prescott et al., 2000). La résistance mutationnelle est en fonction d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotique ; par exemple on observe les plus grandes fréquences de mutation pour la streptomycine et la rifampicine.

#### **3.1.1.2.2. Résistance par acquisition de l'ADN exogène**

La résistance par acquisition d'ADN, peut être la conséquence d'un transfert horizontal, y compris entre espèces éloignées phylogénétiquement.

Le transfert de ces gènes sera plus efficace après leur intégration sur des éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons, les intégrons (Rowe-Magnus et al., 2001 ; Rowe-Magnus et Mazel, 2001) ou encore sur des phages.

**La résistance croisée** correspond à une résistance conférée par un seul gène de résistance et entraîne la résistance à plusieurs molécules d'antibiotiques appartenant à la même famille ou à des familles différentes.

Un exemple de cette résistance croisée est celui de la résistance des staphylocoques à la méticilline par la production d'une nouvelle PLP2. Cette dernière procure également la résistance aux autres molécules de la famille des  $\beta$ - lactamines. La conséquence majeure de la résistance croisée est la sélection croisée.

Dans **la co-résistance**, plusieurs gènes de résistance à différentes molécules ou familles d'antibiotiques sont associés chez la même bactérie au sein d'une structure génétique comme les transposons, les plasmides ou les intégrons. Chacun des mécanismes confère à la bactérie un large spectre de résistance (Soussy et al., 2007).

#### **3.1.1.3. Supports génétiques impliqués dans le transfert des gènes**

Les éléments génétiques impliqués dans le transfert des gènes de résistances sont des éléments capables de se répliquer et transmettre cette résistance aux cellules filles. Ces supports sont les chromosomes et les plasmides. Ils sont également le support de diverses structures génétiques comme les transposons et les intégrons capables de véhiculer les gènes de résistance soit au

niveau intracellulaires (transposons, cassette de gène des intégrons) ou intercellulaires (plasmide, transposons).

### 3.1.1.3.1. Intégrons et transposons

Les transposons sont constitués d'ADN double brin (< 1 à 60 kb) et ne peuvent généralement se répliquer. Cependant, ils codent pour les déterminants de leur transposition. Cette absence de système de réplication permet aux transposons d'être plus stables lors de leur intégration aléatoire dans l'ADN chromosomal ou plasmidique (Schwartz et Chaslus-danclas, 2001). Il en existe deux classes ; les transposons de petite taille connus sous le nom de séquences d'insertion (IS), et qui n'encodent que les fonctions nécessaires à leur transposition, et ceux de plus grande taille qui incluent des gènes de résistance aux antibiotiques et ne servent pas aux fonctions de transposition entre les séquences inversées répétées.

Les intégrons sont des structures incapables de se mouvoir de façon autonome, mais possèdent un système de recombinaison à des sites spécifiques, leur permettant ainsi de se déplacer. Ce système de capture capable d'intégrer et d'exprimer de nombreux gènes de résistances sous forme de cassettes dont le support mobile est le transposon. Ces cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique.

Les intégrons paraissent comme un facteur très important dans la diffusion de résistance aux antibiotiques, fréquemment intégrés à des transposons, qui favorisent leur passage d'une souche à l'autre (Carattoli, 2001).

### 3.1.13.2. Plasmides

Les plasmides sont des structures d'ADN extrachromosomal double brin, mobiles, et circulaires. Ils sont de taille variable allant de quelques kilobases (kb) à 500 kb et peuvent être isolés autant chez les bactéries pathogènes que chez les bactéries de la flore normale de l'hôte (Schwartz et Chaslus-danclas, 2001).

Les plasmides peuvent se répliquer de façon autonome puisqu'ils possèdent des systèmes de réplication. Ils sont le support génétique de nombreuses propriétés comme des fonctions métaboliques, la résistance aux antibiotiques, aux désinfectants, aux métaux lourds et aux toxines bactériennes. Une bactérie peut contenir plus d'un plasmide, elle peut les intégrer dans un autre plasmide ou dans le chromosome, en partie ou au complet ou bien par un vecteur pour les transposons et les intégrons.

Par ailleurs, les plasmides sont classés selon leur transférabilité par conjugaison et/ou par mobilisation. Ainsi, ils peuvent être conjuguatifs ou non-conjuguatifs. **Les plasmides conjuguatifs** généralement de grande taille sont autotransférables et possèdent donc toute l'information génétique.

**Les plasmides non-conjuguatifs** peuvent être divisés en plasmides mobilisables ou non. Les plasmides mobilisables contiennent une origine de transfert et ils peuvent être transférés à une autre cellule uniquement par mobilisation d'un autre plasmide. Lorsque les plasmides

sont non mobilisables, seule leur intégration avec un plasmide conjugatif permettra le transfert par conjugaison à une autre cellule.

#### **3.1.1.4. Mode de transfert de la résistance bactérienne aux antibiotiques**

Le transfert horizontal est le principal mécanisme responsable de la dissémination des gènes de résistance au sein du monde bactérien et concerne 80 % des cas de résistances observés en médecine humaine (Bennett, 2008). Pour cela, il nécessite la présence de supports génétiques autonomes capables de se répliquer et de s'exprimer dans la cellule réceptrice. Le transfert horizontal comprend trois grandes classes de mécanismes : la transformation, la conjugaison et la transduction (Jain et al., 2002). La figure 6 représente le schéma montrant les 3 modèles du transfert horizontal de la résistance bactérienne.

##### **3.1.1.4.1. Conjugaison**

Il s'agit du mécanisme de transmission le plus important et le plus fréquemment rencontré (Alanis, 2005). La conjugaison est le transfert de matériel génétique d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice via un contact cellule-cellule et un système de transfert codé par les gènes localisés sur le chromosome, sur les plasmides et sur les transposons conjugatifs.

Le transfert se produit par l'intermédiaire d'un pont cytoplasmique ouvert qui relie les deux bactéries impliquées dans l'échange, et delà l'ADN transféré reste protégé des éléments de l'environnement qui pourraient le dégrader. Ce mécanisme peut s'effectuer entre bactéries de la même espèce, au sein d'un même genre ou parfois entre bactéries de genres différents d'où son efficacité. L'importance de la conjugaison dans la dispersion des gènes de résistance est bien établie chez les *Entérobacteriaceae* telle que *Salmonella* (Helmuth, 2000).

##### **3.1.1.4.2. Transformation ou compétence naturelle**

La transformation est un mécanisme par lequel la bactérie peut acquérir et intégrer de l'ADN libre présent dans le milieu externe. C'est un réarrangement de séquences d'ADN échangées entre deux bactéries.

Elle peut s'effectuer entre deux espèces bactériennes différentes. Ces espèces bactériennes sont capables au cours de leur cycle cellulaire de présenter un état physiologique (état de compétence) nécessaire à la fixation et l'absorption d'ADN étranger. Dans la bactérie réceptrice, l'ADN exogène subit une recombinaison génétique afin d'être intégré de façon stable au génome et d'être transmis aux cellules filles.

### 3.1.1.4.3. Transduction

La transduction est un processus par lequel le matériel génétique peut être transféré d'une espèce à une autre via des bactériophages (Schwartz et al., 2006). La quantité d'ADN à transférer est limitée par la taille du phage et les phages sont parfois restreints à un hôte en particulier (Ochman et al., 2000). Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée. **La transduction généralisée** a lieu au cours du cycle lytique d'un phage virulent ou tempéré et transfère n'importe quelle partie du génome bactérien (Davison, 1999). Dans **la transduction spécialisée** ou restreinte, la particule transductrice ne porte que certaines parties spécifiques du génome. Elle résulte d'une erreur dans le cycle lysogène. Ainsi seuls les gènes proches du site d'intégration du prophage peuvent être encapsidés et transférés à une autre bactérie. Chez *Salmonella*, la transduction semble importante parce que plusieurs souches transportent des phages de transduction (Schicklmaier et Schmieger, 1995). Enfin, la transformation et la transduction ne requièrent pas que les cellules donatrices et réceptrices soient présentes à la même place ou au même moment.

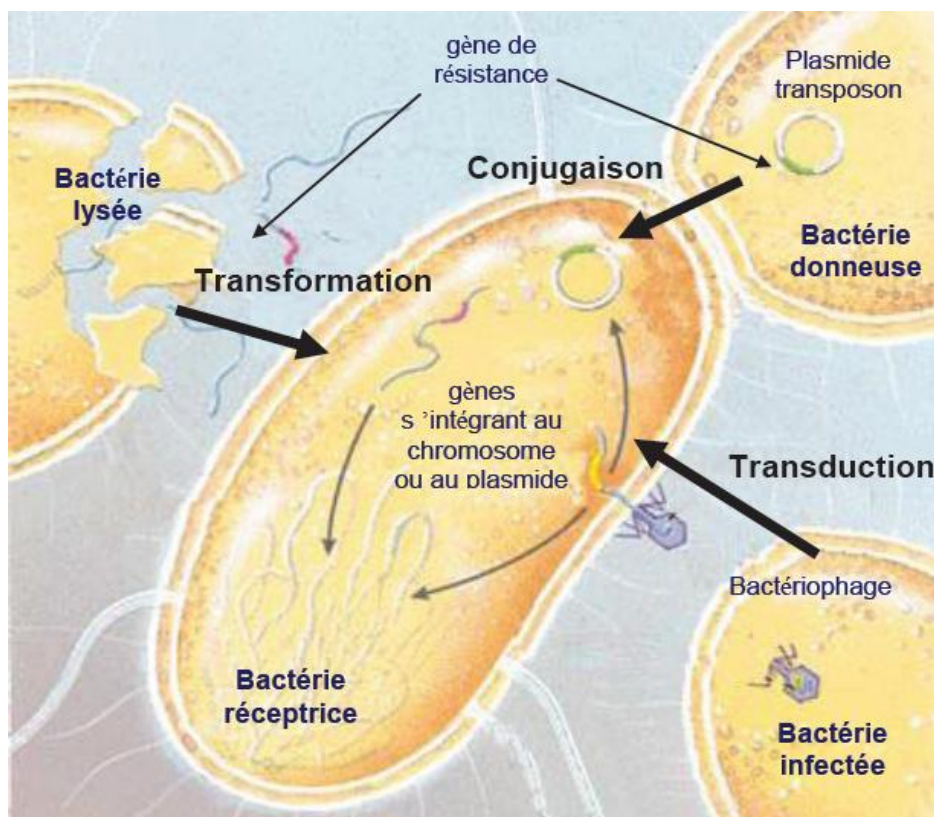


Figure 6 : Représentation schématique des différents mécanismes de transfert horizontal de gènes de résistance.

### **3.1.2. Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques**

#### **3.1.2.1. Diminution de la pénétration ou augmentation de l'excrétion d'un antibiotique**

Un des modes de résistance aux antimicrobiens est d'empêcher l'antibiotique d'atteindre sa cible en ne lui permettant pas de pénétrer dans le cytoplasme. Ce genre de mécanisme dépend de la perméabilité de la membrane externe de la bactérie. Cette perméabilité de la membrane dépend principalement du lipopolysaccharide (LPS) et des porines ancrées dans cette membrane. Le LPS est très compacte en profondeur grâce à ses acides gras insaturés et formés de structures hydrophiles grâce à ses charges électriques de surface. Cette organisation explique une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée. Les antibiotiques très lipophiles, tels que les macrolides, ont beaucoup de mal à traverser la membrane externe des bactéries à cause de la présence protectrice de LPS. Ce phénomène explique la résistance naturelle des bactéries vis à vis des macrolides. Quant aux molécules hydrophiles, elles doivent passer la couche de LPS à travers des porines ou des transporteurs actifs plus ou moins spécifiques. La diminution ou le caractère non fonctionnel de ces porines (par exemple après mutation chromosomique) rendent la bactérie beaucoup moins sensible par une diminution de la diffusion. Ce mécanisme se retrouve essentiellement chez les entérobactéries et les *Pseudomonas*. Enfin, la présence de certaines protéines membranaires peut également induire une augmentation de l'excrétion de l'antibiotique. On rencontre ce mécanisme chez certaines entérobactéries résistantes aux tétracyclines. La résistance s'explique par une concentration intracellulaire insuffisante de cette famille d'antibiotiques. Un mécanisme similaire est décrit pour les fluoroquinolones (Tableau 7).

#### **3.1.2.2. Système d'efflux**

Cet efflux empêche ainsi la concentration intracellulaire de l'antibiotique d'atteindre un niveau d'action, ce qui empêche son action. Le système d'efflux actif est efficace grâce aux protéines transmembranaires ancrées dans la membrane plasmique mais également dans la membrane externe des bactéries Gram négatif (Walsh, 2003). Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou au contraire responsables de « multidrug resistance » (MDR) de certaines bactéries, leur conférant une résistance simultanée à plusieurs classes d'antibiotiques.

#### **3.1.2.3. Modification de la cible**

Une mutation peut induire une modification de la cible de l'antibiotique utilisé, son efficacité sera ainsi réduite, et permettra de ce fait à la bactérie de continuer à se diviser. On retrouve ce phénomène pour de nombreuses familles d'antibiotiques : méticilline et nouvelles PLP (protéines de liaisons des pénicillines), macrolides (Tableau 7). Ce mécanisme de résistance est également fréquent pour les quinolones : la résistance est due à des mutations dans les gènes codant permettant la bactérie résistante de synthétiser une ADN gyrase moins sensible (Bryskier, 1999).

### 3.1.2.4. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Certaines enzymes synthétisées sont capables de dégrader la molécule d'antibiotique en réduisant son efficacité ou la rendant inactive. Il s'agit du système de résistance le plus fréquemment rencontré (Björkman, 2000). Ce phénomène est décrit contre les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et le chloramphénicol (Tableau 7). Dans le cas des  $\beta$ -lactamines, on peut distinguer des pénicillinases, ayant un support génétique essentiellement plasmidique et donc très répandues, et des céphalosporinases généralement chromosomiques et spécifiques d'espèces.

### 3.1.2.5. Modification du métabolisme

Ce mécanisme explique la résistance bactérienne aux sulfamides et le triméthoprim (ou équivalent) (Tableau 7). Ils bloquent la voie de synthèse des bases nucléiques en inhibant certaines enzymes. En augmentant la synthèse des précurseurs, des enzymes ou en fabriquant des enzymes moins sensibles, la bactérie peut devenir résistante.

Classe d'antimicrobiens	Exemples d'antimicrobiens	Mécanisme de résistance aux antimicrobiens†
<b>Inhibition de la synthèse de la paroi (peptidoglycane)</b>		
<b><math>\beta</math>-Lactamines</b>	amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline, céfoxitine, ceftiofur, ceftriaxone, céphalothine	1, 2, 3, 4
<b>Glycopeptides</b>	vancomycine	1, 3
<b>Polypeptides</b>	bacitracine	1
<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>		
<b>Aminoglycosides</b>	amikacine, apramycine, gentamicine, kanamycine, néomycine, streptomycine	1, 2, 3, 4
<b>Lincosamides-</b>	clindamycine	1, 2, 3, 4
<b>Macrolides</b>	érythromycine	1, 2, 3, 4
<b>Phénicoles</b>	chloramphénicol	1, 2, 3, 4
<b>Tétracyclines</b>	tétracycline	1, 2, 4
<b>Streptogramines</b>	quinupristine-dalfopristine	1, 2, 3, 4
<b>Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de l'ADN</b>		
<b>Quinolones</b>	acide nalidixique	1, 3, 4
<b>Fluoroquinolones</b>	ciprofloxacine, enrofloxacin	1, 3, 4
<b>Inhibiteur de la folate</b>	triméthoprim-sulfaméthoxazole, sulfisoxazole	1, 2, 3, 4

- 1) Modification de la cible, 2) inactivation enzymatique, 3) diminution de la perméabilité et 4) pompes à efflux.

**Tableau 6 : Mécanismes de résistance aux antimicrobiens (Cattoir, 2004 ; Rice et Bonomo, 2007 ; Salyers et Whitt, 2002 ; Schwartz et al., 2006 ; Yao et Moellering, 2007).**

### **3.1.3. Réservoirs et transmission de la résistance bactérienne aux antibiotiques à l'homme**

L'autre axe important de la résistance aux antibiotiques, est celui de l'origine de la propagation et la transmission de cette résistance. D'un point de vue de santé publique, l'absence d'étanchéité entre les écosystèmes animal - homme - environnement aggrave le risque de dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les préoccupations de plus en plus soulevées actuellement, sont l'utilisation systématique des antimicrobiens dans la production d'aliments pour les animaux.

L'émergence de la résistance aux antimicrobiens initiées par cette utilisation compromet, non seulement la santé et le bien être des animaux à cause des échecs thérapeutiques, mais aussi engendre quelques éventuelles conséquences négatives pour la santé publique en raison de la propagation de l'antibiorésistance des animaux aux humains, conduisant à l'échec du traitement dans les maladies infectieuses humaines (EFSA, 2009 ; Jordan et al., 2009).

#### **3.1.3.1. Transmission directe**

La transmission directe de la résistance à l'homme se fait dans la plupart des cas dans les milieux hospitaliers. En effet, l'état immunodéprimé transitoire du patient, ajouté aux traitements antibiotiques pourrait favoriser la sélection et la colonisation d'un germe infectieux résistant déjà présent chez l'individu (Brun-Buisson, 2005). En outre, s'ajoute la transmission entre patients malades porteurs de souches résistantes (transmission croisée) et le contact avec le personnel hospitalier. Des études ont révélé également qu'une partie du réservoir responsable de l'augmentation de la propagation des gènes de résistance était des bactéries d'origine communautaire. Effectivement, les nouvelles admissions ont été considérées comme un risque potentiel de transmission dans les services hospitaliers (Fontenoy et al., 2008). Dans une enquête réalisée en Israël par Ben-Ami et al. (2006), a montré que 10,8 % des personnes admises à l'hôpital étaient porteuses d'*Enterobacteriaceae* productrices de BLSE en majorité de type CTX-M-2 (53%). De ce fait, l'apport des entérobactéries productrices de BLSE d'origine communautaire contribuerait aussi et de manière non négligeable à la diffusion des bactéries résistantes au sein des hôpitaux (Ben-Ami et al., 2006 ; Valverde et al., 2008). Autres cas de transmission directe des gènes de résistance est le libre échange intercommunautaires. En effet, la circulation des biens, des marchandises et des personnes sont des facteurs pouvant favoriser la transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques. Selon un rapport canadien, 44 % des patients identifiés comme porteur d'une souche d'*E. coli* productrice de BLSE ont été contaminés lors de voyages notamment en Inde, au Moyen-Orient et en Afrique (Laupland et al., 2008).

#### **3.1.3.2. Transmission via les animaux et l'aliment d'origine animale**

Les animaux ainsi que les aliments d'origines animales jouent un rôle considérable dans la transmission de la résistance des bactéries à l'homme. Il y'a plusieurs voies par lesquelles la présence de la résistance dans les aliments dérivés d'animaux pourraient avoir des implications potentielles dans la santé humaine ; a) la résistance aux antimicrobiens des agents zoonotiques pathogènes tel que *Salmonella* dans les aliments contaminés provoque une infection humaine qui nécessite un traitement, et dont ce traitement pourrait être compromis, b) la sélection des bactéries non pathogènes résistantes aux antimicrobiens chez les animaux , transmise à l'homme après ingestion de la nourriture contaminée ; les déterminants de résistances sont transférés à d'autres bactéries commensales pathogènes se trouvant dans l'intestin humain, c) et enfin la présence des résidus d'antibiotiques dans les produits alimentaires, permettant ainsi une sélection des bactéries résistantes une fois la nourriture est consommée (Pidcock, 1996). Par ailleurs, le contact direct avec les animaux pourrait aussi être une voie par laquelle la bactérie résistante peut être transmise à l'homme.

En effet, beaucoup d'enquêtes ont prouvé que les animaux peuvent hébergés des entérobactéries productrice de béta lactamases à spectre élargi (Caratolli, 2008 ; Liebana et al., 2006). Dans des élevages au Pays-Bas, les enquêtes ont montré que les fréquences de portage intestinal d'entérobactéries résistantes à différentes classes d'antibiotiques et d'entérocoques résistants aux glycopeptides sont significativement plus élevées chez les sujets travaillant dans les élevages que chez les individus résidant en zone urbaine (Nijsten et al., 1996 ; Van den Bogaard et al., 2001 ; 2002). Egalement, que des profils similaires de résistances ont été décrits chez les animaux, agriculteurs et travailleurs des abattoirs, indiquant ainsi la circulation du matériel génétique bactérien entre les animaux d'élevages et les humains (Ozanne et al., 1987;. Nijsten et al., 1994; Van den Bogaard et al ., 2001 ; 2002). Bien que très peu documenté, les animaux de compagnies sont également porteurs de bactéries résistantes notamment par production de BLSE (Steen et Webb, 2007). Ainsi, il est tout à fait envisageable que les sujets ayant des contacts répétés avec les animaux de compagnie porteurs de bactéries résistantes aient une probabilité d'être porteurs eux-mêmes de bactéries résistantes.

Le rôle de la chaîne alimentaire dans la transmission de bactéries résistantes est non seulement possible mais certains arguments attestent de sa réalité pour certains pathogènes comme *Salmonella* et *Campylobacter*. De nombreux auteurs ont noté la présence de bactéries BLSE dans l'alimentation d'origine animale (Aarestrup et al., 2008 ; Caratolli, 2008). En 2004, à la suite d'une épidémie à salmonelle survenue en France, une étude de cas avait identifié que les malades infectés par *Salmonella enterica* Newport résistante à la ceftriaxone avaient consommé de la viande de cheval importée hébergeant une souche de *S. enterica* Newport véhiculant une céphalosporinase type CMY-2 (Egorava et al., 2008 ; Espié et al., 2004).

Plus récemment, Lavilla et al. (2008) rapportèrent que les aliments d'origine animale pouvaient être un vecteur de la résistance à BLSE. En effet, lors d'une enquête épidémiologique en Espagne, Lavilla et al. (2008) avaient identifiés parmi 10 foyers épidémiques de gastro-entérites d'origine alimentaire, deux à plusieurs convives qui partageaient la même souche productrice de BLSE (Lavilla et al., 2008). La figure ci-dessous



montre les différentes voies possibles de transmission et d'échanges de bactéries porteuses de gènes de résistance.

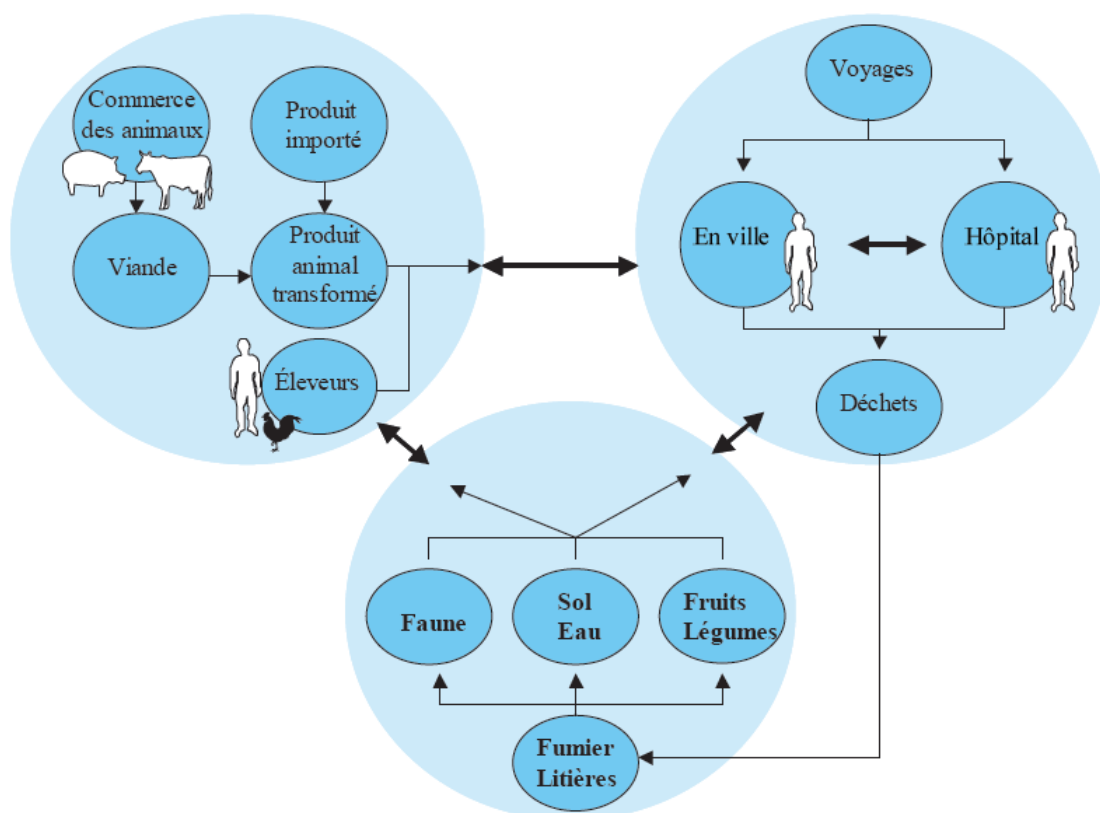


Figure 7 : Les différentes voies potentielles de transmission des bactéries résistance ainsi que les gènes de résistance.

### 3.2. Etat des lieux de la prévalence de résistance des souches de *Salmonella* aux antimicrobiens

Bien que l'incidence des *Salmonella* dans les pays développés est en diminution depuis quelques années, une augmentation de la résistance aux antibiotiques est constatée, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire (Weill et al., 2004). Compte tenu de la gravité des infections salmonelliques, de leur impact en santé humaine et surtout de l'importance du réservoir animal permettant la diffusion à de nombreuses espèces, il est apparu essentiel la mise en place d'une surveillance de l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques aussi bien des salmonelles d'origine humaine que de celles isolées chez l'animal, dans les aliments et dans l'environnement.

#### 3.2.1. Chez les animaux (élevages)

Chez les animaux, les agents antimicrobiens sont souvent utilisés pour traiter, ou prévenir une maladie (Guardabassi et Kruse, 2008 ; McEwen et Fedorka-Cray, 2002). En production

intensive, les antimicrobiens sont administrés chez des animaux malades pour les traiter ainsi que chez des animaux sains qui partagent le même environnement (métaphylaxie) ou pour améliorer la croissance des animaux (promoteur de croissance) (Guardabassi et Kruse, 2008 ; McEwen et Fedorka-Cray, 2002). Depuis la mise en marché en médecine vétérinaire de beaucoup de classe d'antibiotiques, les salmonelles ont su développer un certain nombre de résistance à l'égard de grandes familles d'antibiotiques tels que les bêtalactamines, les aminosides, les sulfamides et le triméthoprim, les phénicolés, les tétracyclines, la colistine et les quinolones. En France, le réseau « *Salmonella* » qui assure la surveillance et l'évolution des souches résistantes d'origine animale, alimentaire ou de l'environnement a mis en évidence 61% des souches de *Salmonella* qui présentaient une résistance pour au moins un des 15 antibiotiques testés. Pour l'année 2000, 50% des souches de *S. Typhimurium* présentaient un profil de multirésistance à cinq familles d'antibiotiques, appelé phénotype ACSSuT. Cette pentarésistance était d'origine chromosomique. Ce profil de multirésistance a été d'abord identifié chez le lysovar particulier de *S. Typhimurium* DT104, et ensuite a été découvert chez d'autres sérotypes ; *S. Agona*, *S. Paratyphi B*, *S. Saintpaul*, présentant le même phénotype qui est devenu fréquent depuis 1997.

Au Royaume-Uni, Le lysotype DT 104 multirésistant (phénotype ACSSuT) de *S. Typhimurium* a été isolé pour la première fois en 1989 chez l'homme. A partir de ce moment, ces souches multirésistantes de *S. Typhimurium* DT104 se sont installées dans la population bovine du pays (Threlfall et al., 1994). Quelques souches parmi elles ont également des résistances plasmidiques à l'apramycine (antibiotique exclusivement vétérinaire) et au triméthoprim. Depuis, ces souches de ce lysotype se sont propagées dans de nombreux pays européens et en Amérique du Nord vers les années 90 dans la filière bovine, associées à une pathologie, mais également en filière porcine, ovine et avicole (Hancock et al., 2000a). Cette propagation a été mise en évidence après une série d'épidémies liées à la consommation de fromage au lait cru (Baggesen et al., 2000 ; Threlfall, 2000 ; Walker et al., 2001).

En France, en filière bovine, l'étude de la résistance à l'apramycine et à la gentamicine chez *Salmonella Typhimurium*, isolée chez le veau, a montré une rapidité de diffusion de la résistance au sein des souches animales. En effet, les travaux de Chalus-Dancla et al. (2000) ont démontré que l'augmentation de la résistance aux aminosides au sein des élevages, a surgit 4 années après l'autorisation de mise sur le marché de l'apramycine. En revanche au Danemark, des travaux similaires ont indiqué que les taux de résistance des *Salmonella* à l'apramycine restait bas en filières porcine et bovine, voire nuls en filière aviaire (Aarestrup et al., 1998b). Chez la dinde, l'administration du chlortétracycline a permis la diffusion de résistance des salmonelles à cet antibiotique, et a généré l'apparition de résistance à de multiples antibiotiques (Nivas et al., 1976). Par ailleurs, depuis l'introduction du florfénicol (phénicolé à usage vétérinaire) dans les années 1990 au Japon, en 1995 en France, et en 2000 où il a obtenu une AMM européenne (Autorisation de Mise sur le Marché) pour les traitements d'infections respiratoires en filière porcine et bovines, des souches de *Salmonella* résistantes ont été observées, notamment parmi les souches de *S. Typhimurium* et *S. Newport* (Meunier et al., 2003a). Egalement le cas des fluoroquinolones, qui sont une des plus récentes classes d'antimicrobiens à large spectre efficaces pour le traitement d'infections intestinales et systémiques chez les animaux de consommation. Il s'avère que depuis leur introduction, l'apparition des souches résistantes a été observée. En effet, les travaux de Wiuff

et al. (2003) ont démontré qu'une utilisation par voie orale de l'enrofloxacin dans les conditions recommandées lors d'usage thérapeutique entraîne une augmentation de la pression de sélection ainsi que la fréquence des salmonelles résistantes aux quinolones. Par ailleurs, l'introduction du cefquinome et le ceftiofur, qui sont des C3G administrés en pommade intra-mammaire (cefquinome) ou en préparations injectables (ceftiofur et cefquinome) pour le traitement des infections respiratoires ont fait craindre la communauté scientifique de voir émerger et diffuser des mécanismes de résistances aux C3G en élevages, des bactéries zoonotiques dont *Salmonella*. Malheureusement cette crainte était avérée puisque peu de temps après leur introduction, des mécanismes de résistance sont apparus chez *Salmonella*. En effet, en 2003, une alerte a été signalée au Danemark suite à l'identification de souches de *Salmonella* Virchow résistantes aux C3G isolées de cailles importées de France, avec la mise en évidence de production de bêta lactamase de type CTX-M-9 (Weill et al., 2004). Durant cette période 2001 à 2003, le réseau « *Salmonella* », ANSES (anciennement AFSSA) a identifié dans la filière volaille, des souches résistantes à la céfalotine parmi lesquelles des souches du sérotype Virchow sont apparues résistantes au céfotaxime par production du gène CTX-M. c'est dans cette filière que les fréquences de résistance à l'acide nalidixique sont les plus élevées et quelques souches résistantes aux fluoroquinolones ont été identifiées. Au Royaume-Uni, les BLSE de type CMY étaient principalement apparues chez des souches de *Salmonella* isolées de volaille et de porc (Liebana et al., 2004).

Aux Etats-Unis, entre 1999 et 2003, le NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) rapporte que parmi les 34 000 souches de *Salmonella* d'origine animale récoltées durant cette période, 10,9 % étaient résistantes au ceftiofur et 0,3% étaient résistantes au ceftriaxone, une C3G utilisée en médecine humaine (Frye et Fedorka-Cray, 2007). Plusieurs études américaines ont rapporté l'origine plasmidique du gène *bla*<sub>CMY</sub> chez ces souches isolées de porcs, de volailles ou encore de bovins (Carattoli et al., 2002 ; Zhao et al., 2001). Toujours en Amérique du nord, précisément au Canada, d'après les données du réseau CIPARS (Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance), le nombre de souches de *Salmonella* spp isolées de poulet résistantes au ceftiofur est de 45%. Curieusement, la résistance au ceftiofur était corrélée avec la résistance au céfoxitine et au ceftriaxone, suggérant l'implication d'un mécanisme de résistance commun identifié comme étant une production de BLSE de type CMY (Li et al., 2007).

### **3.2.2. Transmission à l'homme des souches animales de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques**

Selon la communauté scientifique, la diffusion de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* chez l'homme pourrait être principalement due à l'utilisation d'agents antimicrobiens chez les animaux (White, 1998 ; Angulo et al., 2000). Par ailleurs, les infections humaines par des espèces bactériennes résistantes aux antimicrobiens tels que *Salmonella* sont associées à une morbidité et une mortalité accrues (Helms et al., 2002 ; Molbak, 2005).

Au Royaume Uni, entre 1960-1966, Anderson (1968) avait constaté une augmentation alarmante de l'incidence des infections dues à *Salmonella* Typhimurium lysotype DT29 chez les troupeaux bovins. Ces nombreuses épidémies signalées ont été dues au développement

des élevages intensifs de ces animaux. Chez l'homme, en 1965, 22% des souches de *Salmonella* Typhimurium appartenaient à ce lysotype DT29, alors qu'il n'existait pas en 1961. Selon les enquêtes épidémiologiques, les contaminations humaines étaient liées, soit directement à des contacts directs avec les élevages bovins, ou indirectement à la consommation du lait cru. Aux Etats-Unis, à partir de 1963, plusieurs épidémies de grande ampleur, liées à des produits commerciaux dérivés des œufs, avaient conduit le CDC à instauré une véritable surveillance microbiologique tous les cinq ans, des salmonelles non typhiques ainsi que leur sensibilité aux nombreux antibiotiques utilisés (Schroeder et al., 1968 ; Ryder et al., 1980 ; Riley et al., 1984 ; McDonald et al., 1987). En effet, 1975, l'étude américaine avait démontré qu'environ la moitié de 8300 tonnes d'antibiotiques produits dans ce pays était destinée aux animaux, plus particulièrement comme promoteurs de croissance afin de stimuler et d'améliorer le rendement. En 1986, toujours aux Etats Unis, Cohen et Tauxe (1986), avaient rapporté que l'augmentation du nombre de cas des infections humaines dues aux souches de *Salmonella* résistantes aux antibiotiques, sont dues aux aliments d'origine animale. Ils concluaient que l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique humaine ne jouait pas un rôle majeur dans l'émergence de ces souches résistantes, à la différence de leur utilisation chez les animaux destinés à l'alimentation humaine. Une des premières études concernant l'émergence de la résistante des souches de *Salmonella* aux céphalosporines a été publiée par Winokur et al. (2000) dans l'Etat de l'Iowa, aux Etats Unis. Cette étude a permis d'identifier des isolats de *Salmonella* spp. multirésistants de l'espèce bovine et porcine, qui étaient identiques aux souches humaines multirésistantes, isolées dans la même région. Ces souches humaines et animales étaient codées par le même gène CMY-2. Dans ce même pays, le premier cas signalé de souche humaine de *Salmonella* résistante à la ceftriaxone, a été un enfant de 12 ans habitant le Nebraska en 1998 (CDC, 2003). Une enquête épidémiologique a montré qu'avant que l'enfant tombe malade, le père étant vétérinaire traitait plusieurs infections salmonelliques dans des troupeaux de bétail. Cependant aucune information n'était disponible au sujet des traitements antimicrobiens utilisés pour ces infections. L'analyse PFGE des deux isolats humain et animale a montré le même profil génotypique. L'hypothèse probable émise était que l'utilisation dans les élevages bovins du ceftiofur, qui est une céphalosporine de troisième génération est liée à la contribution de l'émergence de la résistance des souches humaines aux ceftriaxone (Dunne et al., 2000 ; Gupta et al., 2003).

Concernant la première démonstration de l'émergence et la diffusion clonale de *Salmonella* résistante aux fluoroquinolones, entre l'animal et l'homme a été publiée par Heisig et al. (1995). Dans cette étude, les souches de *S. Typhimurium* variant Copenhague isolés chez l'homme et en filière bovine avaient les mêmes caractéristiques phénotypiques et génomiques. Plus récemment, quelques souches de *Salmonella* isolées résistantes aux fluoroquinolones (*S. Typhimurium*, *S. Hadar*) ont été reliées à l'utilisation de l'enrofloxacin en médecine vétérinaire.

# ***ETUDE EXPERIMENTALE***

## 1. Contexte et objectifs de l'étude

La synthèse bibliographique a mis en évidence l'enjeu majeur des salmonelloses en terme de santé publique lorsque ces bactéries sont transmises à l'homme. En effet, nous constatons ces dernières années que les problèmes liés aux salmonelles non typhiques se sont considérablement amplifiés, tant du point de vue de l'incidence de la salmonellose, que de la gravité des cas humains. En Europe, entre 1999-2008, plus de 1.6 million de cas confirmés au laboratoire ont été signalés dans 27 pays (ECDC, 2010). Dans les pays riches d'Amérique du nord, 1.7 millions de cas d'infections humaines à *Salmonella* sont annuellement estimés (Majowicz et al., 2010). Par ailleurs, il faut savoir que bien que *Salmonella enterica* comprend plus de 2500 sérotypes, la plupart des infections humaines sont causées par un nombre limité de sérotypes (Jones et al., 2008). En effet, *S. Typhimurium*, et *S. Enteritidis* sont les 2 sérotypes les plus fréquemment rapportés chez l'homme dans les pays industrialisés (Commission Européenne, 2004). L'objectif de thèse a donc été de réaliser une enquête terrain transversale afin d'estimer l'épidémiologie des infections par les salmonelles dans les élevages algériens de poules de pondeuses. Par un réel manque de moyens économiques, matériels et humains, nous nous sommes limités à deux régions voisines d'Annaba et ElTarf situées à l'extrême Est du territoire, d'autant plus que ces deux régions sont à caractère agricole. Ainsi, les objectifs de ce projet de thèse ont été entrepris afin ;

- D'estimer la prévalence de contamination des élevages de poules pondeuses des régions d'Annaba et Eltarf par *Salmonella* spp.
- Identifier les sérotypes rencontrés, et déterminer les profils d'antibiorésistance des isolats appartenant aux différents sérotypes.
- Déterminer les facteurs de risques potentiellement liés à la contamination des élevages de poules pondeuses par *Salmonella*.
- Discriminer les isolats entre eux et démontrer d'éventuels liens génétiques qui peuvent étayer l'hypothèse des liens épidémiologiques entre les souches de *Salmonella* provenant des différentes sources ; élevages de poules pondeuses et souches humaines recueillies aux services hospitaliers de microbiologie des deux régions.
- Déterminer la prévalence de résistance des souches humaines de *Salmonella* aux antibiotiques, et identifier les éventuels gènes dominants responsables de ces mécanismes de résistances, notamment aux bêta-lactamines qui constituent la classe d'antibiotique la plus utilisée en médecine humaine. Et enfin, voir l'émergence de ces résistances à certaines classes d'antibiotiques dans ces régions, ainsi que les éventuelles voies de leurs transmissions.

## **2. Matériels et Méthodes**

### **2.1. Enquête épidémiologique dans les élevages de poules pondeuses**

#### **2.1.1. Situation de la filière avicole, notamment ponte dans les deux régions étudiées d'Algérie**

La région Est du pays représentée par les wilayas de Batna, Sétif, Constantine, Guelma, Annaba et El Tarf, occupe une place importante à l'échelle nationale, en termes de production avicole. Cette place n'est pas seulement due à la présence constante de cette filière mais aussi aux différents types d'élevages existants. En effet, depuis plusieurs années, la région Est ne propose pas moins de six types d'élevages, à savoir ; le poulet de chair, la poule pondeuse, la dinde, la poule productrice du poulet de chair (repro-chair), le repro-ponte, couvoir, et les poussins ponte. L'organisation de cette filière avicole dans les différentes wilayas, comme dans la plupart des autres wilayas du pays est représentée par deux secteurs bien distincts, le secteur public (ORAVIE) et le secteur privé.

Concernant les deux régions étudiées d'Annaba et Eltarf, le secteur public pour la filière ponte est représenté par l'office avicole de la wilaya de M'sila (Ain Taghrout), qui est selon les sources officielles, l'unique office de reproducteurs ponte dans l'est Algérien. Cet office pourvoit toutes les unités étatiques de poulettes démarrées dans l'est Algérien en poussins ponte (Ayachi, 2010). Cependant et selon notre enquête terrain, le secteur privé, comprend un unique reproducteur ponte. Les unités de poulettes démarrées sont au nombre de trois, une unité privée pour la wilaya d'Annaba et 2 unités publiques pour la wilaya d'Eltarf.

Quant aux nombres d'élevages de poules pondeuses, et selon les récents enregistrements des directions des services vétérinaires (DSV) des 2 wilayas (Recensement 2007), ils sont respectivement au nombre de 18 élevages de poules pondeuses pour la wilaya d'Annaba et 7 pour celle d'Eltarf. Cependant, il faut savoir que ces élevages ne sont pas forcément tous en activité chaque année. Le nombre d'élevages de pondeuses varie d'une année à une autre, dépendant du marché des œufs et le prix de l'aliment. De ce fait, la liste et les recensements des élevages de pondeuses fonctionnels effectués par les DSV ne sont pas forcément annuellement exhaustifs, et parfois n'incluent pas la totalité des unités d'élevages opérationnelles pour chaque année (Figure 8).

Néanmoins, un bon nombre de ces élevages enregistre une présence annuelle avec des effectifs plutôt constants. Il est important également de préciser que dans certains cas, les éleveurs ne sont pas exclusivement fermiers et considèrent l'élevage aviaire comme une seconde activité lucrative, et cela fluctue aussi sur leurs nombres et l'identité du propriétaire de l'élevage, d'une année à une autre.

	Nombre d'unités	Capacité moyenne
<b>Grands parents</b>	non reporté	
<b>Reproducteur ponte</b>	1	5000
<b>Poulettes démarrées</b>	3	223 223
<b>Poules pondeuses</b>	25*	184 600

\* Nombres d'élevages de poules pondeuses existants.

**Tableau 7 : Le nombre d'unités d'élevages (publiques et privés) de la filière ponte dans les 2 régions d'étude (source 2007 DSV et enquête terrain 2008 et 2009).**

### **2.1.2. Distribution géographique des élevages**

Les deux wilayas voisines d'Annaba et Eltarf sont situées à l'extrême Nord Est du territoire Algérien, elles sont constituées respectivement de 12 et 24 communes. Cependant, toutes les communes ne sont pas concernées par l'élevage avicole, bien que ces deux wilayas soient impliquées dans ce domaine. En effet plusieurs communes concernées par l'aviculture n'ont pas une production constante ni en type d'élevage, ni en effectifs qui fluctuent d'une année à une autre pour des raisons déjà évoquées.

Concernant l'élevage de poules pondeuses, Les élevages de pondeuses sont répartis sur 8 communes d'élevages pour la wilaya d'Annaba, et 7 pour la wilaya d'Eltarf. Leurs bâtiments sont implantés dans l'espace géographique de façon fortuite, entourés généralement d'autres bâtiments appartenant à d'autres types d'élevages avicoles tels que ; poulets de chair, reproducteur chair, couvoirs, et dindes. Dans beaucoup de cas, les distances entre les différents types d'élevages sont souvent relativement réduites. La répartition et la distribution des élevages enquêtés dans les deux régions se trouvent dans la Figure 8.

### **2.1.3. Sélection des élevages enquêtés**

Notre étude a été conduite à une échelle régionale, dans deux régions voisines d'Annaba et Eltarf (anciennement dans la même wilaya). L'enquête épidémiologique a reposé sur une enquête transversale : le relevé des conditions d'élevages des poules pondeuses et la détermination de leurs statuts vis-à-vis des salmonelles ont été réalisés simultanément lors des visites des bâtiments.

La population étudiée incluait les élevages de poules pondeuses situés dans ces deux régions d'Annaba et Eltarf. La liste et la localisation des exploitations en activité pendant notre période d'étude comprenaient, d'une part, les élevages enregistrés auprès des autorités vétérinaires (DSV) de ces deux wilayas et d'autre part, les élevages que nous avons recensés lors de l'enquête épidémiologique et qui étaient en activité durant nos deux années d'étude. Vu le nombre relativement réduit des élevages de pondeuses dans ces deux régions, tous les



éleveurs ont été sollicités en garantissant l'anonymat et l'absence de répercussion négative pour les résultats obtenus.

Au total, 18 élevages sur les 22 opérationnels durant nos deux années d'étude, nous ont autorisé l'accès à leurs élevages. La capacité des bâtiments d'élevages enquêtés variait entre 2400 et 7200 poudeuses, tous disposés en cages, et la mise en place des poulettes était faite à 18 semaines.

Le prototype des bâtiments d'élevages dans ces 2 wilayas est commun pour tous les éleveurs. Tous les éleveurs sauf un possèdent un seul bâtiment de poudeuses dans l'exploitation. Pour la plupart, les élevages correspondaient à des investissements relativement moyens, de taille modeste, et la structure du bâtiment se réduisait à une toiture recouverte de plaques de zinc ou tertiaire, des murs en moules ou en briques recouverts d'une couche de ciment, et d'une plate-forme bétonnée.

### ➤ **Moments d'échantillonnages**

Notre étude a été menée et suivie, de Mars 2008 jusqu'à novembre 2009. Les élevages enquêtés ont fait l'objet d'une à 3 visites de prélèvements tout au long de la bande de poules poudeuses. Ainsi, 13 élevages ont été échantillonnés 3 fois tout au long de leurs campagnes d'élevages, 2 visites d'échantillonnages pour deux autres élevages, et une unique visite de prélèvements pour les 3 autres élevages. La première visite se déroulait au début de la ponte (22-31 semaines d'âge) et a concerné 15 élevages, la seconde visite était effectuée entre 47-60 semaines d'âge et a concerné 14 élevages.

La dernière visite s'est déroulée à la fin de la période d'élevage avant le vide du bâtiment. L'âge des poudeuses pour la dernière visite était rangé entre 70-86 semaines pour beaucoup d'élevages. Par ailleurs, parmi les 13 élevages visités 3 fois, 4 ont été échantillonnés en fin de bande, entre 74-82 semaines d'âge lors de la première bande et au début et au milieu de la seconde bande de poudeuses élevées dans les mêmes bâtiments d'élevages. Un élevage était déclaré contaminé si au moins l'un des 7 échantillons permettait l'isolement de *Salmonella* spp. lors des analyses bactériologiques.

#### **2.1.4. Questionnaire de visite d'élevage**

Pour l'étude des facteurs de risque potentiellement liés à la contamination par les salmonelles, un questionnaire a été dûment rempli lors des visites de collecte des prélèvements pour chaque exploitation. Le questionnaire épidémiologique comportait environ 95 questions, essentiellement de type fermées.

Les questions portaient sur la description de l'exploitation, la description du bâtiment d'élevage, les caractéristiques et la conduite d'élevage ; la gestion des oiseaux morts, le contrôle des rongeurs et autres animaux domestiques, des mesures de biosécurité, le personnel de l'exploitation et les visiteurs, la vaccination et l'administration d'antibiotiques.

Les notes ainsi obtenues basées à la fois sur des observations personnelles et des informations recueillies auprès des employés en charge des troupeaux des poules pondeuses étaient utiles pour établir des corrélations éventuelles entre les résultats de l'élevage vis-à-vis de la contamination par les salmonelles et ses caractéristiques. Le questionnaire est présenté en annexe 2.

### **2.1.5. Echantillonnages**

Un total de 2754 prélèvements a été collecté. La détermination du statut salmonellique des lots a reposé sur la recherche bactériologique de salmonelles dans 7 échantillons par troupeau, prélevés lors de chaque visite d'élevage ; 2 pools de fientes collectés dans les fosses de batteries, 1 pool de fientes collectés au niveau des cages, 1 pool de prélèvements de poussières de cages, 1 pool de prélèvements de surfaces, et 2 pools de prélèvements d'aliment et d'eau. Les 7 échantillons de matières fécales et de l'environnement du bâtiment dans lequel ont été élevées les poules pondeuses ont été collectés comme suit :

Les 2 pools de 15 fientes fraîches ont été pris au hasard sur la totalité de la surface du sol dans lequel sont disposées les batteries. Afin que les prélèvements soient représentatifs, le bâtiment a été divisé virtuellement en 5 quartiers (deux en avant et deux en arrière et un au milieu), et 3 fientes fraîches ont été recueillies dans chaque quartier. Chaque pool contenait environ 150 g de fientes fraîches. Un troisième pool de 5 prélèvements de matières fécales sèches mélangées a été pris par grattage de plusieurs cages, à raison d'1 prélèvement de fientes par quartier. Ce pool de matières fécales des cages contenait approximativement 25 à 50 g de fientes sèches. Un pool de 7 prélèvements de poussières en provenance des cages a été recueilli, et 1 pool de 7 prélèvements de surfaces a été collecté dans différents endroits du bâtiment tels que les surfaces des murs, mangeoires et abreuvoirs.

Pour des raisons techniques lors de la première visite, nous avons utilisé des écouvillons pour les prélèvements environnementaux. Les écouvillons ont été préalablement imbibés d'eau stérile afin de frotter 5- 10 centimètres de surface des cages ; à l'intérieur des cages vides, allant le long des lignes d'abreuvement jusqu'aux tétines. Les écouvillons ont été également utilisés pour essuyer environ 20 cm<sup>2</sup> des surfaces des mangeoires et bacs d'eaux. Pour cela, le bâtiment a été également divisé en 7 quartiers, et 3 écouvillons ont été appliqués pour chaque secteur.

Lors de la seconde période d'échantillonnage, des chiffonnettes stériles en coton humidifiées avec un neutralisant (25 cm x 25 cm, marque AES Chemunex, Combourg, France) ont été utilisées pour les prélèvements environnementaux ; Les chiffonnettes stériles ont été appliquées en dessous de 7 cages choisies au hasard à différents quartiers au sein du troupeau.

Le chiffonnage a été réalisé sur les parois des cages afin d'absorber la poussière et les grains de fientes séchées, à raison d'une chiffonnette pour deux cages. Les 3 autres chiffonnettes stériles humidifiées ont été utilisées pour le pool de 7 prélèvements de surfaces.

Les chiffonnettes stériles et individuelles ont été utilisées pour frotter et essayer les surfaces des mangeoires et les murs aux 7 différents endroits du bâtiment. Pour cela, deux chiffonnettes ont été utilisées pour essuyer les surfaces des mangeoires et surface des murs, et

l'autre pour les bacs d'eaux. Pour chaque secteur de prélèvement, le chiffonnage est réalisé sur les parois à une hauteur d'environ 0.5 m<sup>2</sup> de surfaces d'équipement et sur environ 20-30 cm<sup>2</sup> de surfaces de murs, des frottements énergiques étaient effectués horizontalement et verticalement.

Concernant les pools d'eau et d'aliment ; pour les bâtiments dont la capacité variait entre 2400- 3100 pondées, le pool d'eau était constitué de 4 prélèvements de 5 mL d'eau chacun, prélevés de différents bacs et réservoirs, et 1 pool d'aliment constitué de 4 prélèvements de 5 g d'aliment chacun prélevés de différentes mangeoires. Pour les bâtiments dont la capacité était comprise entre 4800-7200 pondées, 2 pools de 6 prélèvements de 5 mL d'eau chacun et de 5 g chacun d'aliment ont été prélevés de différents bacs, réservoirs d'eau, et mangeoires.

Après chaque type de prélèvements, une nouvelle paire de gants stérile était utilisée, et les pools de prélèvements étaient placés individuellement dans un sac en plastique ou récipient stérile préalablement identifié et numéroté. Au total, pour chaque visite d'échantillonnage, 61 prélèvements étaient collectés pour le bâtiment contenant 4800-7200 de pondées, et 57 prélèvements pour les bâtiments dont la capacité était comprise entre 2400 -3100 pondées.

Le tout était acheminé au laboratoire, sous froid (température de réfrigération) dans une glacière, dans un délai ne dépassant pas 2 heures après les prélèvements (en fonction de la distance). Les prélèvements étaient traités soit le jour même, où bien gardés au réfrigérateur jusqu'à très tôt le lendemain pour être analysés.

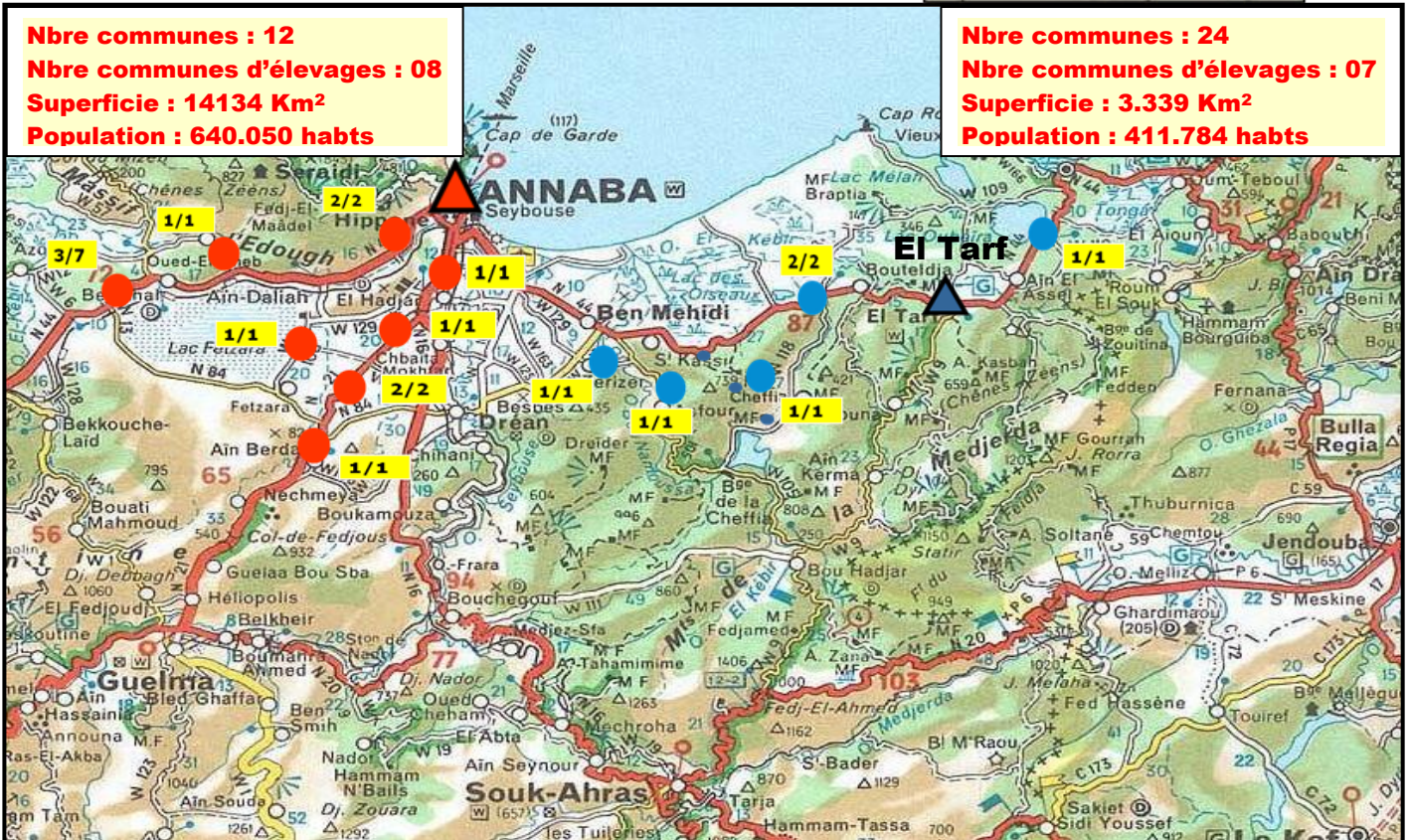


Figure 8: Localisation des élevages visités dans les 2 régions d'Annaba et ElTarf, par rapport au nombre d'élevages en activités durant les 2 années d'étude.

## **2.2. Les souches humaines collectées sur les deux années d'étude**

Afin d'estimer l'éventuel potentiel de contribution des salmonelles aviaires à certains cas de salmonelloses humaines, mais aussi étudier les clones circulant dans cette partie de l'Est Algérien, nous avons récupéré toutes les souches de salmonelles isolées durant les deux années 2008 et 2009, dans le laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire Dorban d'Annaba (CHU), mais aussi, celles isolées dans les laboratoires microbiologiques des hôpitaux (EPH) d'Eltarf et d'Elkala. L'origine des souches de *Salmonella* est hospitalière et communautaire (cas ambulatoires). Notre source d'information, pour les souches collectées était les registres des différents services hospitaliers ou les patients ont été hospitalisés.

## **2.3. Méthodes d'analyses**

### **2.3.1. Analyses bactériologiques des prélèvements aviaires**

Les analyses bactériologiques pour la recherche de *Salmonella* ont été réalisées selon un protocole adapté de la norme ISO 6579 (2002). Brièvement, 25 g de chaque pool de fientes, d'aliments, et 25 mL d'eau étaient repris avec 225 mL d'eau peptonnée tamponnée (AES Chemunex, Combourg, France), à raison d'1/10, homogénéisés durant 1min. Les écouvillons ont été placés individuellement dans 9 mL d'eau peptonnée tamponnée, et les chiffonnettes également pré-enrichis individuellement dans 100 mL d'eau peptonnée tamponnée. Tous les échantillons étaient ensuite incubés à 37°C pendant 18 h ± 2 h. Après cette phase de pré-enrichissement, 1 mL et 100 µL étaient ensuite enrichis respectivement dans 20 mL du bouillon Tétrathionate/novobiocine de Mueller Kauffmann (AES Chemunex, Combourg, France), et 10 mL du bouillon Rappaport-Vassiliadis (Fluka, Sigma Aldrich, France), et incubés respectivement à 37°C et 42°C pendant 24 h. Le lendemain, à partir des deux bouillons d'enrichissement, une boîte de gélose Hektoen et une boîte de gélose XLD (AES Chemunex, Combourg, France), étaient ensemencées, et étuvées à 37°C pendant 24 h.

La confirmation biochimique de deux colonies suspectes caractéristiques de *Salmonella* a été réalisée par un ensemencement en strie et pique centrale d'un tube de TSI (Biokar, Beauvais, France), et d'une galerie API-20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Les souches humaines de *Salmonella* non typhiques gracieusement fournies par les laboratoires de microbiologie ont été également confirmées biochimiquement en utilisant des API-20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

### **2.3.2. Sérotypage des souches de *Salmonella***

Le sérotypage des souches aviaires et de cas humains de *Salmonella* non typhiques a été réalisé au laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et des Procédés agroalimentaires (LERQAP), unité CEB (Caractérisation et Epidémiologie Bactérienne), du Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES) de Maisons Alfort, Paris.

Ainsi, les souches ont été serotypées par agglutination sur lame à l'aide d'une culture fraîche de 24 h, en utilisant des sérums somatiques polyvalents anti O et des sérums flagellaires anti H. La lecture et la détermination de la souche se faisait selon le tableau de Kauffmann-White (Popoff, 2001).

### 2.3.3. Les antibiogrammes

Les Antibiogrammes ont été réalisés par la méthode d'écouvillonnage en milieu gélosé Mueller-Hinton Agar (Bio-Rad, France), selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2009). La lecture et l'analyse des diamètres des zones d'inhibition ont été réalisées par un automate de lecture OSIRIS (Bio-Rad). Les résultats ainsi obtenus ont été interprétés selon les critères du CLSI (CLSI, 2010). Un premier panel de 16 antibiotiques a été testé. Dans le cas d'une souche de *Salmonella* résistante aux céphalosporines ou une diminution de sensibilité à l'enrofloxacin, une deuxième série de 16 autres antibiotiques était testée. Le contrôle de la qualité a été fait avec la souche de référence d'*Escherichia coli* ATCC 25922.

Pour les souches humaines multi résistantes (AMR), dont la détermination de la CMI d'une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (ceftazidime ou cefotaxime) par bandelette ETEST (AES Chemunex, Combourg, France) s'est révélée difficile, c'est-à-dire absence de sensibilité, et de synergie entre ces molécules avec l'acide clavulanique, nous avons réalisé des antibiogrammes standards sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250 mg/L de cloxacilline (Inhibiteurs de céphalosporinases).

La cloxacilline permet ainsi de vérifier si la résistance observée était bien liée à ce type de mécanisme en restaurant ainsi la sensibilité aux molécules précitées en l'absence de tout autre mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines et de détecter une éventuelle  $\beta$ -lactamase à spectre élargi associée qui aurait été masquée par une hyperproduction de céphalosporinases (AmpC) (Poirel et al., 2003).

**Panel 1 :** AMP : ampicilline (10 $\mu$ g, 14-19), AMC : amoxicilline+ acide clavulanique (30 $\mu$ g, 14-21), CTX : céfotaxime (30 $\mu$ g, 15-21), CHL : chloramphenicol (30 $\mu$ g, 19-23), CF : céfalotine (30 $\mu$ g, 12-18), CAZ : céftazidime (30 $\mu$ g, 15-21), SXT : cotrimoxazole (1.25/23.75  $\mu$ g, 11-15), SSS : sulfamides (300 $\mu$ g, 12-17), GEN : gentamicine (10UI, 14-16), STR : streptomycine (10UI, 13-15), KAN : kanamycine (30UI, 15-17), TET : tétracycline (30UI, 17-19), CT : colistine (50 $\mu$ g, 15), NAL : acide nalidixique (30 $\mu$ g, 15-20), OFX : ofloxacin (5 $\mu$ g, 16-22), ENR : enrofloxacin (5 $\mu$ g, 19-22).

**Panel 2 :** AML : amoxicilline (25 $\mu$ g, 14-21), TIC : ticarcilline (75 $\mu$ g, 18-22), PRL : pipéracilline (75 $\mu$ g, 12-20), TZP : pipéracilline/tazobactam (75/10 $\mu$ g, 14-21), TMP : triméthoprime (5 $\mu$ g, 12-16), MA : céfamandole (30 $\mu$ g, 15-22), CFP : céfopérazone (30 $\mu$ g, 14-21), FOX : céfoxitine (30 $\mu$ g, 15-22), CRO : céftiaxone (30 $\mu$ g, 15-21), AMC : amoxicilline/acide clavulanique (20/10 $\mu$ g, 14-21), TIM : ticarcilline/acide clavulanique (75/10 $\mu$ g, 18-22), ATM : aztréonam (30 $\mu$ g, 17-23), IPM : imipénème (10 $\mu$ g, 17-22), CXM : céfuroxime (30 $\mu$ g, 15-22), FEP : cefépime (30 $\mu$ g, 15-21), CIP : ciprofloxacine (5 $\mu$ g, 19-22).

### 2.3.4. L'analyse génotypique des souches isolées de *Salmonella*

Les 19 souches de *Salmonella* spp isolées des élevages de poules pondeuses durant les deux années de prélèvements, et les 67 souches collectées de cas humains durant ces deux années d'étude ont été comparées sur un plan génotypique. Pour cela, nous avons eu recours à



différentes méthodes de typages fondées sur l'étude du génome total déjà évaluées chez *Salmonella* : ERIC-PCR, IS-PCR et une méthode de référence : électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Ces méthodes ont été utilisées pour estimer les liens de clonalité entre les différents sérotypes d'origines humaines et aviaires, le caractère clonal de certains sérovars, et d'en déduire par la suite les hypothèses d'éventuels liens génotypiques et épidémiologiques entre les différents isolats selon les origines. Les résultats de cette étude ont également permis de tester le pouvoir discriminant de ces méthodes et leur capacité à différencier génétiquement les différents isolats de cette partie de l'Algérie.

### **2.3.4.1. Marqueurs moléculaires fondés sur la PCR**

#### **2.3.4.1.1. Extraction d'ADN selon le protocole « Qiamp DNA Mini Kit Qiagen »**

L'extraction de l'ADN a été réalisée sur colonnes à filtre en utilisant le mini Kit Qiamp Qiagen (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France). Le protocole appliqué était celui recommandé par le fournisseur. Brièvement, après une culture fraîche de 24 heures dans 5 mL de BHI (Brain Heat Infusion) à 37°C, on prélève 1 mL du bouillon de culture dans un tube eppendorf qu'on centrifuge à 5000 rpm (rotation par minute) pendant 10 min, auquel on élimine le surnageant. Ensuite, on suspend le précipité avec 180 µL de tampon ATL, puis on ajoute 20 µL de protéinase K avant d'incuber à 56°C durant 3 heures. Cette étape permet une lyse bactérienne. Il est à savoir que cette étape peut durer toute la nuit sans abimer l'ADN bactérien.

Une fois la lyse terminée, on rajoute 200 µL de tampon AL, et on incube pendant 10 min à 70°C, puis on rajoute 200 µL d'éthanol. Une fois l'éthanol rajouté, on introduit le tout délicatement dans une colonne en faisant attention à ne pas toucher les bordures. La colonne doit être préalablement numérotée selon la souche étudiée, et le tout est centrifugé à 6000 rpm pendant 1min. Le lavage des colonnes à filtres se fait sur deux temps en utilisant deux tampons de lavages, centrifugés respectivement à 6000 rpm pendant 1 min et à 14000 rpm pendant 3 min.

la colonne est ensuite reprise avec 200 µL de tampon de conservation et centrifugée une dernière fois à 6000 rpm pendant 1 min. Les 200 µL contenant l'ADN sont ainsi répartis en 3 fois dans des tubes à 1.2 µL et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

\*Tous les tampons d'extraction, de lavages, et de conservations sont fournis avec kit.

#### **2.3.4.1.2. Réalisation des PCR (ERIC et IS-PCR)**

##### **2.3.4.1.2.1. Principe**

Ce sont des méthodes de synthèse qui permettent d'amplifier de manière cyclique une région spécifique de l'ADN bactérien. Elles se basent sur l'utilisation d'une paire d'amorces spécifiques pour chacune des deux méthodes en présence d'une enzyme d'amplification résistante à la chaleur (*Taq* polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase). Les séquences d'amorces utilisées se trouvent sur le tableau 9.

Amorces	Séquences (5' → 3')	Références
ERIC 1(R)	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Millemann et al. (1996)
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Millemann et al. (1996)
IS 1 (R)	AGGCGCATCTGAAAAACCTCGG	Millemann et al. (2000)
IS2	CGGAACCCCCCAGCCTAGCTGGG	Millemann et al. (2000)

**Tableau 8 : Séquences d'amorces utilisées pour les deux marqueurs moléculaires ERIC et IS-PCR**

#### **2.3.4.1.2.2. Conditions de réalisation**

L'étude des liens génotypiques entre les différents isolats appartenant aux serovars aviaires et humains a été réalisée en utilisant deux marqueurs moléculaires fondés sur la PCR. Il s'agit de l'IS-PCR (Insertion Séquence) et l'ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus). Le Mix comprenait des quantités nécessaires et précises du tampon 10X avec MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany), du (10mM) dNTP, et celles des amorces ERIC et IS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France). Pour chaque méthode, le calcul de volume pour chaque élément du Mix a été fait sur une feuille de calcul Excel, dont la formule tient compte du nombre de souches à traiter, mais également en prévoyant en plus les volumes supplémentaires pour les tubes témoins (positif et négatif). L'amplification se fait avec 5U de l'enzyme *Taq* DNA polymérase (Faststart taq, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). Le Mix est ensuite réparti sous hotte à raison de 22,5µL dans chaque tube PCR correspondant à l'échantillon traité, auquel on rajoute 2.5µL d'extrait d'ADN de l'échantillon traité en question. Les séquences des amorces utilisées pour les deux méthodes sont détaillées dans le tableau N°9.

#### **2.3.4.1.2.3. Conditions d'amplification**

Concernant l'IS-PCR, les conditions d'amplification comprennent un premier cycle avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivi de 45 cycles avec 94°C pendant 1 min pour la dénaturation, 55°C pendant 1 min pour l'hybridation, et 72°C pendant 4 min pour l'élongation. ET enfin, une élongation finale à 72°C pendant 20 min (Millemann et al., 2000).

Pour l'ERIC-PCR, le programme optimum d'amplification comprend un premier cycle à 94°C pendant 3 min pour la dénaturation, suivi de 35 autres cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 51°C pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 4 min. Et enfin une élongation finale à 72°C pendant 20 min (Millemann et al., 2000). Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur PERKIN ELMER 9700 (Courtaboeuf, France).



#### **2.3.4.1.2.4. Migration électrophorétique et révélation**

Les produits de l'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (Sigma Aldriche, Saint Quentin, France) avec le tampon TBE1X (Tris Borate EDTA) (Roche Diagnostics). La migration était faite sous une tension de 120V, avec un ampérage de 200 mA, pendant une durée de 2 heures. La détermination des poids des fragments d'ADN obtenus était réalisée en utilisant le marqueur VIII (Roche dignostics) a poids moléculaires standards. La révélation a été faite dans un bain de bromure d'éthidium à une concentration de 1µg/ mL sous agitation pendant 30 min, suivie d'une lecture sur plaque UV avec un analyseur d'image Bio-Rad à l'aide de l'appareil Gel Doq Eq (Bio-Rad, France).

#### **2.3.4.2. Electrophorèse en champ pulsé (*Pulsed Field Electrophoresis*)**

L'électrophorèse en champ pulsé de nos souches humaines et aviaires a été réalisée dans l'unité CEB de l'ANSES. Le protocole utilisé par l'unité est adapté à celui décrit par Peters et al (2003) et standardisé selon la méthode décrite par Ribot et al. (2006). Le principe de la technique de PFGE est basé sur l'analyse de l'ADN total en utilisant une enzyme de macro restriction. Cette technique comporte trois importantes étapes :

##### **2.3.4.2.1. Extraction d'ADN**

D'abord chaque clone bactérien des souches étudiées de *Salmonella* a été purifié par une mise en culture sur une boîte de gélose Drigalski (Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France), et incubé à 37°C pendant 24 h. Une colonie est ensuite repiquée sur gélose TSAYE (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England) et incubée à 37°C pendant 24 h. A partir des colonies de chaque boîte TSAYE correspondant à une souche, une culture bactérienne était émulsionnée stérilement dans 2 mL de CSB (Cell Suspension Buffer). A l'aide d'un spectrophotomètre, la densité optique de la suspension bactérienne était ajustée à 630 nm entre 1.6 et 1.8. Une fois ajustée, 400 µL de cette suspension ont été transférés dans un tube eppendorf avec 20 µL de protéinase K.

La protéinase K permet ainsi la lyse bactérienne. Afin de protéger l'ADN total de toute dégradation physique ou enzymatique, la suspension bactérienne est reprise avec du gel d'agarose et verser dans des moules pour inserts (formation des plugs).

Les plugs étaient ensuite incubés durant 2 heures sous agitation dans une solution de lyse contenant de la protéinase K, et du détergent SDS à 20% (Sodium Dodecyl Sulfate). La lyse bactérienne dure au minimum 2 heures mais elle peut être réalisée sur une nuit sans que l'ADN soit abimé. Les plugs sont enfin rincés 2 fois à l'eau et 3 fois au TE (Tris-Ethylène diamine tétra-acétique acide) puis stockés à 4°C jusqu'à utilisation.

##### **2.3.4.2.2. Digestion enzymatique**

Le choix de l'enzyme est crucial pour cette étape. Il permet de couper le chromosome bactérien entre 10 et 20 fragments de différentes tailles, qui seront par la suite séparés par électrophorèse en champ pulsé. Chez les salmonelles, l'enzyme *XbaI* est majoritairement utilisée en PFGE, notamment pour cette étude. Ainsi, les plugs ont été plongés dans des tubes contenant la solution enzymatique, et placés au bain sec à température d'action de l'enzyme,

à savoir 37°C pendant 4 heures pour l'enzyme *XbaI* (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany).

#### **2.3.4.2.3. Séparation électrophorétique et révélation**

Une fois la digestion terminée, les plugs sont insérés dans un gel d'agarose SeaKem à 1% dans un tampon TBE 0.5X. La séparation électrophorétique se fait en utilisant le CHEF-DRIII (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). L'électrophorèse dure entre 19-20 heures selon le nombre de souches analysées en maintenant une température de migration à 14°C grâce à un dispositif de refroidissement. Les conditions de migration comprennent un temps pour chaque pulsation de 2 secondes jusqu'à 64 seconde réglé à 6V/cm pour un angle de 120 °. *Salmonella* Braenderup H9812 (CDC, Atlanta, USA) dont la taille des fragments est connue, est utilisée comme marqueur moléculaire de référence. La révélation du gel se fait dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium) (40 µL/400 µL d'eau) pendant 30 minutes sous agitation, suivie d'une lecture sous UV avec un analyseur d'image Bio-Rad à l'aide de l'appareil Gel Doq Eq. Le gel est photographié et enregistré à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). En fonction de la qualité de l'image suite à cette première visualisation du gel, une décoloration de 15 à 30 minutes est effectuée dans un bain d'eau ultra pure sous agitation.

#### **2.3.4.2.4. Lecture du gel et interprétation des résultats**

L'analyse de l'ensemble des souches a été effectuée à l'aide du logiciel BioNumerics (Bio-Rad, Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique). Ce logiciel permet la saisie de l'image et la normalisation des distances de migration en fonction de *S. Braenderup H9812* utilisée comme marqueur de taille de façon à tenir compte des variations dues aux aléas de la migration. L'image est ainsi archivée et utilisée ultérieurement pour la comparaison des différents profils.

L'interprétation des profils ou des fragments obtenus se base sur les distances de migration ou sur le calcul des poids moléculaires de chacun des fragments. Un numéro de profil est attribué suite à une entrée dans la base de données de l'unité CEB. Le numéro de profil est défini selon la nomenclature européenne par un code de 6 lettres associé à un numéro de 4 chiffres (Peters et al., 2003). La première lettre correspond au genre *Salmonella*, suivi de 3 lettres correspondant au serotype, et enfin les 2 dernières lettres correspondant au code de l'enzyme utilisée.

L'interprétation des résultats se fait par le calcul de l'indice de similitude de Dice avec 1% de tolérance d'erreur. L'indice de Dice analyse les profils deux à deux et qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils. Ce coefficient est calculé automatiquement avec le logiciel. Après une comparaison deux à deux de tous les profils, une matrice de similitude est alors obtenue permettant de construire un dendrogramme, celui ci est obtenu par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages).

## 2.3.5. Mécanismes de résistances des souches humaines aux antibiotiques

### 2.3.5.1. Détection des gènes contenant une $\beta$ -lactamase

La recherche des gènes de résistances aux bêta-lactamines des souches humaines a été effectuée par 3 PCR Multiplex. Les protocoles utilisés par l'unité CEB de l'ANSES ont été adoptés à partir d'études précédemment publiées. Les 10 gènes *bla* testés étaient TEM, CTX-M, SHV, DHA, CMY, VEB, PER, ACT, ACC, LCR. Les séquences des amorces utilisées ainsi que les tailles des fragments sont détaillées dans le tableau N°10.

La première Multiplex nous permettait de détecter la présence des gènes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> et *bla*<sub>PER</sub> parmi les différents isolats de *Salmonella* résistantes aux céphalosporines et la seconde permettait de rechercher les gènes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, et *bla*<sub>DHA</sub>. Enfin la dernière Multiplex nous permettait de vérifier la présence des gènes *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, et *bla*<sub>LCR</sub>. Le Mix de chaque PCR Multiplex comprenait des volumes définis de tampon 10X avec 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 2U de la *Taq* DNA polymérase (Faststart *taq*, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany), et les 6 paires d'amorces à différentes concentrations. Une fois le Mix distribué dans chaque tube PCR à raison de 48  $\mu$ L par souche, 2  $\mu$ L d'ADN de chaque souche traitée était additionné pour un volume final de 50  $\mu$ L dans chaque tube d'échantillon. Les conditions d'amplifications sont optimisées en fonction des températures optimales d'action des séquences d'amorces utilisées dans chaque une des 3 PCR. La réalisation de ces dernières a été effectuée dans un thermocycleur PERKIN ELMER 9700 (Courtaboeuf, France).

### 2.3.5.2. Détection du gène *armA* contenant une méthylase

Une PCR classique a été réalisée pour rechercher le gène *armA* parmi les 22 souches des cas humains présentant des niveaux élevés de résistance aux 3 aminosides testés, en l'occurrence la gentamicine, la kanamycine et la streptomycine. Les amorces utilisées ainsi que le protocole PCR appliquée par l'unité CEB sont ceux décrits par Gonzalez-Zorn *et al.* (2005).

### 2.3.5.3. Révélation et lecture des PCR (3 Multiplex et 1 Simplex)

Les 10  $\mu$ L de produits d'amplifications des 4 PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en tampon 1X (Tris Borate EDTA). La révélation des gènes a été réalisée dans un bain de bromure d'ethidium (1 $\mu$ g/ mL) sous agitation pendant 30 min, suivie de la lecture sur plaque UV en utilisant le système Gel Doc Eq et le logiciel One quantity one (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). Le marqueur VI (Roche diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) dont le poids moléculaire des fragments connus a été utilisé pour identifier les différents gènes présents dans les différents isolats de *Salmonella* résistantes aux bêta lactamines et le marqueur à 1Kb était utilisé pour l'identification du gène *armA*.

Amorces	Séquences (5' → 3')	Taille (pb)	Références
TEM (OT3)	CGT GTC GCC CTT ATT CCC	840	Arlet et al. (1995)
TEM (OT4)	CCA ATG CTT AAT CAG TGA GG		
CTX-M (MA1)	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	544	Lartigue et al. (2007)
CTX-M (MA2)	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG		
CMY (CIT A)	ATG CAG GAG CAG GCT ATT C	689	Mulvey et al. (2005)
CMY (CIT B)	TGG AGC GTT TTC TTC TCC TGA AC		
PER1-F	GGC CTG ACG ATC TGG AAC CT	643	MedVetNetWP9
PER1-R	GGC CGT CCA TCA GGC AAC		
SHV (OS5)	TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC	797	Arlet et al. (1997)
SHV (OS6)	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG		
DHA-F	CGG TGG TGG ACA GCA CCA	394	Protocole interne de CEB
DHA-R	GAC GGC TGC CAC TGC TG		
VEBext-upbis	GCC AGA ATA GGA GTA GCA AT	915	Protocole interne de CEB*
VEBext-Low	CGG TTT GGG CTA TGG GCA G		
ACT1-F	CSG TTA CSC CGC TGA TGA A	941	Protocole interne de CEB
ACT1-R	AAA KGC CAC GTA GCT GCC A		
ACC1-F	AGC CTC AGC AGC CGG TTA C	818	Nadjar et al. (2000)
ACC1-R	GAA GCC GTT AGT TGA TCC GG		
LCR1-F	GCA CCC TTC TGG CCT TTG	677	Protocole interne de CEB
LCR1-R	GGC AAA CAG CCA AAC ATC G		
ARMA-F	GGT GCG AAA ACA GTC GTA GT	1155	Gonzalez-Zorn et al. (2005)
ARMA-R	TCC TCA AAA TAT CCT CTA TGT		

\* : Unité Caractérisation et Epidémiologie des Bactéries (CEB). Le choix des amorces a été fait par l'équipe de l'unité CEB avec la contribution de G. Arlet.

**Tableau 9 : Liste des 10 paires d'amorces utilisées pour les 3 PCR Multiplex et la paire d'amorces utilisée pour la PCR simplex.**

### 2.3.6. Séquençage du gène CTX-M

Parmi les 50 souches hospitalières de *Salmonella* porteuses d'une  $\beta$ -lactamase type CTX-M, 26 souches ont été sélectionnées pour le séquençage du gène. La représentativité des souches choisies était faite selon, les différents sérotypes (Enteritidis, Typhimurium, les variants monophasiques et immobiles), leurs profils génotypiques (PFGE, ERIC et IS-PCR) et phénotypiques (antibiorésistance). Le séquençage a été réalisé au laboratoire de l'unité U 914 de l'INSERM « Emergence des résistances aux antibiotiques », service de bactériologie-virologie de l'hôpital Bicêtre de Paris. La technique préconisée a été réalisée selon la méthode de Sanger modifiée comprenant plusieurs étapes.

D'abord, une purification des fragments d'ADN amplifiés par PCR des 26 souches choisies de *Salmonella* contenant le gène CTX-M. Cette dernière a été réalisée avec le kit Qiagen de purification (Qia quick PCR Purification Kit (250), Qiagen GmbH-Hilden) en suivant les instructions du fabricant.

La purification était ensuite suivie par la préparation du Mix de séquençage avec l'enzyme Big TYE (Applied Biosystems, Foster City, Calif, USA), en rajoutant 2µL de produit purifié de chaque isolat.

Les conditions d'amplification comprenaient 25 cycles avec une phase de dénaturation à 96°C pendant 3 secondes, une phase d'hybridation à 55°C pendant 15 secondes et enfin une étape d'élongation à 60°C pendant 3 min. L'élongation finale était à 72°C pendant 7 minutes. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Calif, USA).

Une fois l'amplification terminée, les produits de séquençage ont été purifiés sur gel en utilisant le Kit Qiagen, et selon les recommandations décrites par le fournisseur (Kit sur gel de séquençage, Qiagen GmbH-Hilden).

Enfin, les produits purifiés ont été séquencés à l'aide du séquenceur ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, Calif). Les séquences de nucléotides ont été analysées avec le logiciel Lasergene (Dnaster, Madison, Wis). Le programme BLASTN du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a été utilisé pour déterminer le groupe d'enzyme CTX-M.

#### **2.4. Analyse statistique des indicateurs de risque**

A partir du questionnaire des visites d'élevages, nos données ont été traitées avec le logiciel Epi-Info® (version gratuite 2.5.3, CDC, Atlanta, USA). Vu le nombre réduit de bâtiments d'élevages de poules pondeuses dans les deux régions étudiées, l'analyse statistique s'est limitée au test de Fisher exact. L'association entre chaque indicateur de risque et le statut salmonellique de ces élevages de poules pondeuses a été évaluée en calculant le risque relatif avec un intervalle de confiance à 95%. Les tests ont été considérés significatifs si  $p < 0.05$ .

### **3. Résultats**

#### **3.1. L'infection des élevages de poules pondeuses par les salmonelles**

##### **3.1.1. Prévalence de contamination**

La présence de salmonelle a été dépistée dans 8 élevages parmi les 18 enquêtés, avec uniquement 19 prélèvements positifs parmi les 2754 analysés. Ce résultat correspond à un taux d'isolement faible de 0.68%. Le nombre de prélèvements contaminés par *Salmonella* variait selon la source du prélèvement. Ainsi, sur les 1610 prélèvements de matières fécales analysées, 13 contenaient des salmonelles (0.80%), et 4 prélèvements étaient positifs parmi les 322 prélèvements de poussières des cages (1.24%). Pour les 250 prélèvements d'eau réalisés, uniquement 2 étaient positifs (0.80%) (Tableau 12).

La contamination salmonellique s'est avérée plus élevée en fin de bande, entre 70-86 semaines d'âge des pondeuses (7/17) comparativement au début de ponte, entre 22-31 semaines (3/15) et au milieu de la bande, entre 47-60 semaines d'âge des pondeuses (1/14) (Tableau 11).

En outre, parmi les 3 élevages testés positifs en début de bande, *Salmonella* a été isolée entre 74-82 semaines dans les deux précédentes bandes de poules pondeuses élevées dans les

mêmes bâtiments d'élevages. Toutefois, aucune analyse statistique sur l'association de la prévalence de contamination par *Salmonella* et les 3 classes d'âge des poulettes n'a pu être réalisée en raison du nombre relativement faible des élevages échantillonnés dans les deux régions.

Age des pondeuses lors des visites (semaines)	Fréquence d'isolement de <i>Salmonella</i>			
	Nb. Elevages visités	Nb. Elevages positifs	Nb. Prélèv analysés	Nb. Prélèv positifs
<b>22-31</b>	15 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	899	5
<b>47-60</b>	14	1	838	3
<b>70-86</b>	17 <sup>a</sup>	7	1017	11
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>8</b>	<b>2754</b>	<b>19</b>

a : Quatre bâtiments ont été échantillonnés en fin d'élevage (74- 82 semaines) lors de la première campagne et en début de ponte, entre 22-31 semaines lors de la seconde campagne de pondeuses, élevées dans les mêmes bâtiments.

b : Persistance de deux *Salmonella* sérovars en début de ponte lors de la seconde campagne d'élevage de pondeuses.

**Tableau 10 : Fréquence d'isolement de *Salmonella* dans les élevages de poules pondeuses dans les deux régions d'étude en fonction des 3 âges des pondeuses lors des visites, et la proportion des prélèvements analysés.**

### 3.1.2. Les sérotypes identifiés

Dix neuf isolements de salmonelles sérotypables ont été obtenus parmi lesquels 9 sérotypes différents ont pu être identifiés. Un sérovar a été identifié dans 5 bâtiments d'élevages et les 3 autres élevages positifs présentaient simultanément deux sérotypes différents. Les 5 serovars fréquemment retrouvés étaient *S. Enteritidis* (n=4), *S. Kentucky* (n=3), *S. Hadar* (n=3), *S. Virchow* (n=2), *S. Heidelberg* (n=2), et *S. Manhattan* (n=2) (Tableau 13). Par ailleurs, on a identifié 7 sérotypes parmi les 1610 prélèvements de fientes, 2 sérotypes parmi les 322 prélèvements de poussières des cages, et enfin 2 autres sérotypes dans les 250 prélèvements d'eau (tableau 13).

*Salmonella* Enteritidis et *S. Virchow* ont été isolés dans deux bandes successives de poules pondeuses qui logeaient dans les mêmes bâtiments d'élevages : isolées des prélèvements de fientes lors de la première bande (n=2) et des prélèvements de poussières de cages dans la seconde bande (n=4).

Source*	Bâtiments d'élevages contaminés (8/18)		
	No. Prélèvements analysés	No. Prélèvements positifs	Sérovars identifiés
Fientes	1610	13 (0.80%)	<i>S. Kentucky</i> (n=3) <i>S. Hadar</i> (n=3) <i>S. Manhattan</i> (n=2) <i>S. Heidelberg</i> (n=2) <i>S. Enteritidis</i> (n=1) <i>S. Virchow</i> (n=1) <i>S. Abany</i> (n=1)
Poussières cages	322	4 (1.24%)	<i>S. Enteritidis</i> (n=3) <i>S. Virchow</i> (n=1)
Eau	250	2 (0.80%)	<i>S. Typhimurium</i> (n=1) <i>S. Dublin</i> (n=1)

\* Sur les 250 prélèvements d'aliment et les 322 prélèvements de surfaces analysés : aucun ne contenait de salmonelle.

**Tableau 11 : Différents sérovars de *Salmonella* identifiés des élevages de poules pondeuses dans les deux régions d'Annaba et Eltarf, selon les différentes sources de prélèvements.**

### 3.1.3. Résistance aux antibiotiques des souches isolées

Parmi les 19 isolats de *Salmonella*, 13 isolats montraient une résistance à au moins un antibiotique. Douze souches étaient résistantes à l'acide nalidixique, et 6 isolats étaient résistants à au moins 3 classes d'antibiotiques. Les 3 souches de *S. Kentucky* et 2 souches de *S. Hadar* étaient résistantes à l'ampicilline, tétracycline, et à la streptomycine. Ces 5 isolats étaient également résistants à la céfalotine. Par ailleurs, les 3 souches de *S. Kentucky* étaient hautement résistantes aux fluoroquinolones testés (ofloxacine, enrofloxacin, et ciprofloxacine) (MIC cip  $\geq$  8 mg/L) (Tableau 13). Enfin, la souche de *S. Typhimurium* était résistante seulement à l'ampicilline. Les souches de *S. Virchow*, *S. Manhattan*, et *S. Dublin* restaient sensibles à tous les antibiotiques testés (Tableau 13).

<b>Bâtiments d'élevages contaminés (8/18)</b>		
<b>Source</b>	<b>Serovars identifiés</b>	<b>Profil d'antibiorésistance</b>
Fientes	<i>S. Kentucky</i> (n=3)	3 [AMP-CF-STR-SXT-GEN-TET-NAL-OFX-ENR] <b>MIC<sub>cip</sub> ≥ 8 mg/L</b>
	<i>S. Hadar</i> (n=3)	2 [AMP-CF-STR-TET-NAL] 1 [STR-TET-NAL]
	<i>S. Manhattan</i> (n=2)	Sensible
	<i>S. Heidelberg</i> (n=2)	[NAL]
	<i>S. Enteritidis</i> (n=1)	[NAL]
	<i>S. Albany</i> (n=1)	[NAL]
	<i>S. Virchow</i> (n=1)	Sensible
Poussières cages	<i>S. Enteritidis</i> (n=3)	2 [NAL] Sensible
	<i>S. Virchow</i> (n=1)	Sensible
Eau	<i>S. Typhimurium</i> (n=1)	[AMP]
	<i>S. Dublin</i> (n=1)	Sensible

AMP : ampicilline, TET : tetracycline, STR : streptomycine, CF : cefalotine, NAL : acide nalidixique, GEN : gentamicine, SXT : cotrimoxazole, OFX : ofloxacine, ENR : enrofloxacine.

**Tableau 12 : Profils de résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* selon les différentes sources de prélèvements et les sérovars identifiés.**

### **3.1.4. Indicateurs de risque associés au statut salmonellique**

#### **3.1.4.1. Typologie des élevages**

L'équipement des bâtiments d'élevages enquêtés de poules pondeuse se limitait au strict minimum (batteries conventionnelles de type « californienne », équipées d'un système d'abreuvement et de mangeoires d'alimentation) avec un système de ventilation et d'isolation statique pour la majorité des bâtiments basé sur la présence de fenêtres, de taille et de nombre variable, et quelques extracteurs d'air. Seulement 3 bâtiments étaient munis d'un système de refroidissement. De la même manière, nous constatons l'absence d'humidificateurs et de régulateurs de lumière chez la majorité des élevages, ce qui se traduit par les problèmes de maîtrise de l'ambiance, notamment en saison chaude. La provenance de l'eau d'abreuvement était pour la totalité des élevages les sources et les puits. La plupart des éleveurs faisaient appel au vétérinaire uniquement en cas de maladie ou de mortalité élevé.



### 3.1.4.2. Analyse statistique du questionnaire d'enquête

Le dépouillement du questionnaire a permis d'identifier six indicateurs de risques avec un risque relatif supérieur ou égal à 2, ils apparaissent pertinents et tendent à être potentiellement associés à la contamination des élevages par *Salmonella*. Cependant, aucun indicateur ne s'est révélé significativement ( $p < 0.05$ ) associé à la contamination, cela pourrait être dû au faible nombre de bâtiments d'élevages enquêtés (Tableau 14).

Le contamination des élevages par *Salmonella* était plus fréquente (i) dans les élevages qui ne possédaient pas de clôture à l'entrée de l'exploitation (RR= 3.5 ; CI 95%= 0.5,25 ;  $p= 0.1$ ), (ii) ceux qui n'utilisaient pas un détergent avant la mise en place du lot de pondeuses (RR= 2.7 ; CI 95%= 0.4,16.9 ;  $p=0.2$ ), (iii) dans les élevages où la fréquence de ramassage des cadavres dans les exploitations datait d'au moins d'une semaine (RR= 2.6 ; CI 95%= 1.0,6.5 ;  $p=0.08$ ). Egalement la contamination était plus élevée dans les bâtiments (iv) qui possédaient un mauvais système de ventilation ( RR= 2.6 ; CI 95%= 1.0,6.5 ;  $p=0.08$ ), (v) dans les élevages ou nous avons observé la présence de rats morts ou aperçu à l'intérieur du bâtiment lors des visites d'échantillonnage (RR= 2.6 ; CI 95%= 0.8,7.6 ;  $p=0.08$ ), (vi) et enfin dans les bâtiment où les cages selon les employés, ont été seulement dépoussiérés avant la mise en place d'un nouveau lot de pondeuses ( RR=2 ; CI 95%= 0.7,5.3 ;  $p=0.2$ ) (Tableau 14).

Variables	Les 18 bâtiments (BT) enquêtés				
	Nb. BT	S+ <sup>a</sup>	p <sup>f</sup>	RR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>
<b>* Présence de clôture</b>					
Non	12	7 (58.3%)	0.1	3.5	0.5-25
Oui	6	1 (16.7%)		1	
<b>* Utilisation d'un désinfectant lors du nettoyage avant la mise en place</b>					
Non	13	7 (53.8%)	0.2	2.7	0.4-16.9
Oui	5	1 (20%)		1	
<b>* Fréquence de ramassage des cadavres</b>					
D'au moins d'une semaine	5	4 (80%)	0.08	2.6	1.0-6.5
1 fois par jour	13	4 (30.8%)		1	
<b>* Type de ventilation</b>					
Faible <sup>d</sup>	5	4 (80%)	0.08	2.6	1.0-6.5
Moyenne- bonne <sup>e</sup>	13	4 (30.8%)		1	
<b>* Rats observés à l'intérieur de l'exploitation lors des visites</b>					
Oui	7	5 (71.4%)	0.08	2.6	0.8-7.6
Non	11	3 (27.3%)		1	
<b>* Simple dépoussiérage des cages avant la mise en place</b>					
Oui	6	4 (66.7%)	0.2	2	0.7-5.3
Non	12	4 (33.3%)		1	

a : Nombre de bâtiments contaminés par *Salmonella*

b : Risque relatif

c : Intervalle de confiance

d : Ventilation statique avec un nombre de fenêtres insuffisants

e : Ventilation dynamique ou statique avec un nombre suffisant de fenêtres

f : Test de Fisher

g : Effet protecteur pris comme référence

**Tableau 13 : Indicateurs de risques associés à la contamination des élevages de poules pondeuses par *Salmonella*.**

## **3.2. Potentielle contribution des salmonelles aviaires aux cas de salmonelloses humaines**

### **3.2.1. Les souches humaines collectées**

#### **3.2.1.1. Données cliniques et épidémiologiques**

Durant les deux années d'étude, 67 souches de *Salmonella* ont été isolées de cas humains dans les hôpitaux des deux régions étudiées. *Salmonella* a été isolée dans les 61 des cas, de prélèvements coproculture, 3 cas de prélèvements d'hémoculture, 1 isolat d'urines, 1 isolat de pus, et 1 isolat du liquide céphalo-rachidien. Pour 88% des cas, les souches provenaient du service pédiatrique comprenant la réanimation pédiatrique ainsi que le service néonatalogie. Les patients étaient des enfants dont l'âge était compris entre 8 jours et 36 mois. Le reste des souches étaient isolés chez des adultes âgés entre 15 et 55 ans, souffrant de symptômes diarrhéiques. Les isolats provenaient des services infectieux, hématologie et cas ambulatoires. Il est à noter qu'on a essayé de distinguer les cas communautaires des cas nosocomiaux en se basant sur la notion d'hospitalisation ou non des malades. Concernant le service pédiatrique, et selon les registres du service, il s'agit pour un bon nombre de cas d'épisodes épidémiques avérés, persistant survenus en néonatalogie sous forme de cas de gastroentérites, méningites, bronchiolite, et septicémies. Une bonne partie des enfants concernés par ces épidémies sont des enfants nés sous X, provenant des pouponnières. L'antibiothérapie reçue selon les dossiers du service pédiatrique était des combinaisons de classes d'antibiotiques, Ampicillin-Amikacine ; Gentamicine-Ampicilline-Colistine ; Gentamicine-Tétracycline-Amoxicilline ; Bactrim-Ampicilline ; Gentamicine-Thiamphénicol. Quelques enfants ont reçu du céfotaxime comme antibiothérapie. Il est également à signaler que ces infections ont causé le décès de 11 nourrissons parmi eux, et dont l'âge était compris entre 8 jours et 30 semaines.

Selon les données d'archives du service bactériologique du CHU d'Annaba pour les dernières années, la fréquence d'isolement annuelle des salmonelles non typhiques est variable d'une année à l'autre, allant de 17 souches en 2006 jusqu'à des pics observés comme le cas en 2004 avec 77 souches. Sur une période de 7ans allant de 2002 à 2007, nous observons une moyenne d'isolement de 34 isolats de salmonelles par année. Malheureusement, peu de données épidémiologiques sur l'origine des souches et les sources de contamination des différents isolats qui sont enregistrées dans les différents services concernés.

#### **3.2.1.2. Sérotypes identifiés**

Seulement 9 différents sérotypes ont été identifiés parmi les 67 humaines recueillies durant les deux années d'étude. *S. Typhimurium* était le sérotype le plus fréquemment isolé (n= 50), suivi de *S. Enteritidis* (n=8), les variants monophasiques et immobiles ( *S. 4,12:-:-* (2), *S.4,12:-:1,2* (n=2), *S. 4, 5,12:ï:-* (n=1)), *S. Manhattan* (n=1), *S. Virchow* (n=1), *S. Dublin* (n=1), et *S. Derby* (n=1) (Tableau 15).

### 3.2.1.3. Résistance aux antibiotiques

Les 67 souches humaines ont montré au total seulement 13 profils d'antibiorésistance. Sur ces 67 souches, 47 ont montré un niveau très élevé de résistance aux antibiotiques avec 7 profils qui ne différaient que par seulement 1, 2, voire 3 antibiotiques testés (Tableau 15). Les 47 souches étaient résistantes à l'amoxicilline, ticarcilline, pipéracilline, et notamment les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> générations (céfotaxime, ceftazidime, céfépime, ceftriaxone). Néanmoins, elles restaient sensibles au pipéracilline/tazobactame, et l'imipénème. Elles montraient également des niveaux élevés de résistance aux sulfamides, triméthoprimine et la tétracycline, et 22 souches parmi elles montraient des hauts niveaux de résistances aux aminosides testés (streptomycine, gentamicine, et kanamycine). Les profils SXT-STR-SSS, AMP-CHL-STR-SSS-TET, et AMP-CHL-STR-SSS-TET-CF ont été observés chez respectivement 1 et 9 isolats. Seulement 2 souches ont montré un profil de résistance à l'acide nalidixique (Tableau 15). Le profil phénotypique bêta lactamases à spectre élargi (synergie entre l'acide clavulanique et cefotaxime, ceftazidime) a été observé chez 50 souches humaines testées en milieu gélosé de Mueller-Hinton en présence de cloxacilline. Parmi les 67 isolats humains testés, seulement 6 souches restaient sensibles aux 16 antibiotiques testés. Cependant, la totalité des souches étaient sensibles à l'imipénème, la colistine et les fluoroquinolones (ofloxacin, enrofloxacin, et ciprofloxacin) (tableau 15).

Sérotype	Nombre d'isolats	Profils d'antibiorésistance
<b>S. Typhimurium (n=50)</b>	11 <sup>a</sup>	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET
	15 <sup>c</sup>	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN CHL SSS TMP TET
	7	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET
	2	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN SSS TMP TET
	3 <sup>a</sup>	AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN SSS TMP TET
	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP
	9	AMP CHL STR SSS CF TET
	1	AMP CHL STR SSS TET
	1	STR SSS SXT
<b>S. Enteritidis (n=8)</b>	4 <sup>b</sup>	AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO KAN GEN SSS TMP TET
	1	NAL
	3	Sensible
<b>S. 4, 12:-:1,2 (n=2)</b>	1 <sup>a</sup>	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR

	1	KAN GEN CHL SSS TMP TET AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET
<b>S. 4,12:-:- (n=2)</b>	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET
	1	AMP CF CHL STR SSSS TET
<b>S. 4, 5,12:-i:- (n=1)</b>	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET
<b>S. Virchow (n=1)</b>	1	NAL
<b>S. Dublin (n=1)</b>	1	Sensible
<b>S. Manhattan (n=1)</b>	1	Sensible
<b>S. Derby (n=1)</b>	1	Sensible

AMP, ampicilline ; AMC, amoxicilline/acide clavulanique ; CF, céfalotine ; FOX, céfoxitine, CTX, céfotaxime ; CAZ, céftazidime, FEP, céfépime, CRO, céftriaxone, STR, streptomycine ; KAN, kanamycine ; GEN, gentamicine ; CHL, chloramphénicol ; SSS, sulfamides ; TMP, triméthoprim ; TET, tétracycline ; NAL, acide nalidixique ; SXT, cotrimoxazole/ a : (13) souches de *S. Typhimurium*, et (1) du variant monophasique présentaient une haute résistance aux 3 aminosides testés (absence de zone d'inhibition). b : les (4) souches de *S. Enteritidis* présentaient une haute résistance aux 2 aminosides testés (gentamicine + kanamycine), mais restaient sensibles à la streptomycine. c : (4) souches de *S. Typhimurium* présentaient une haute résistance à la streptomycine et la gentamicine (absence de zone d'inhibition), mais qui restaient sensibles à la kanamycine.

**Tableau 14 : Profils de résistances aux antibiotiques des souches humaines de *Salmonella* spp. collectées lors des deux années d'étude.**

### 3.2.2. Analyse et comparaison génotypique des isolats selon l'origine et le sérotype

#### 3.2.2.1. Sérotypes communs identifiés

Durant nos deux années d'étude, 9 sérotypes ont été identifiés parmi les 19 isolats des élevages de poules pondeuses, et les 67 souches humaines gracieusement fournies par les laboratoires de microbiologie. Cinq sérotypes isolés des poules pondeuses ont été retrouvés chez les cas humains ; *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Dublin*, *S. Manhattan*, et *S. Typhimurium*. Le sérotype *Typhimurium* était le dominant chez les souches humaines avec 50 souches mais uniquement 1 seule souche a été isolée d'un prélèvement d'eau dans un seul élevage. Il est de même pour le sérotype *Enteritidis*, identifié chez 8 patients alors qu'il n'a été isolé que dans un unique bâtiment de poules pondeuses. Cependant persistant dans 2 bandes successives. D'un autre coté, 4 sérotypes ; *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Albany*, et *S. Kentucky* isolés chez les poules pondeuses n'ont pas été identifiés chez les cas humains. Par ailleurs, Les variants monophasiques et immobiles et *Salmonella* *Derby* ont été isolés chez les humains et pas dans nos élevages.

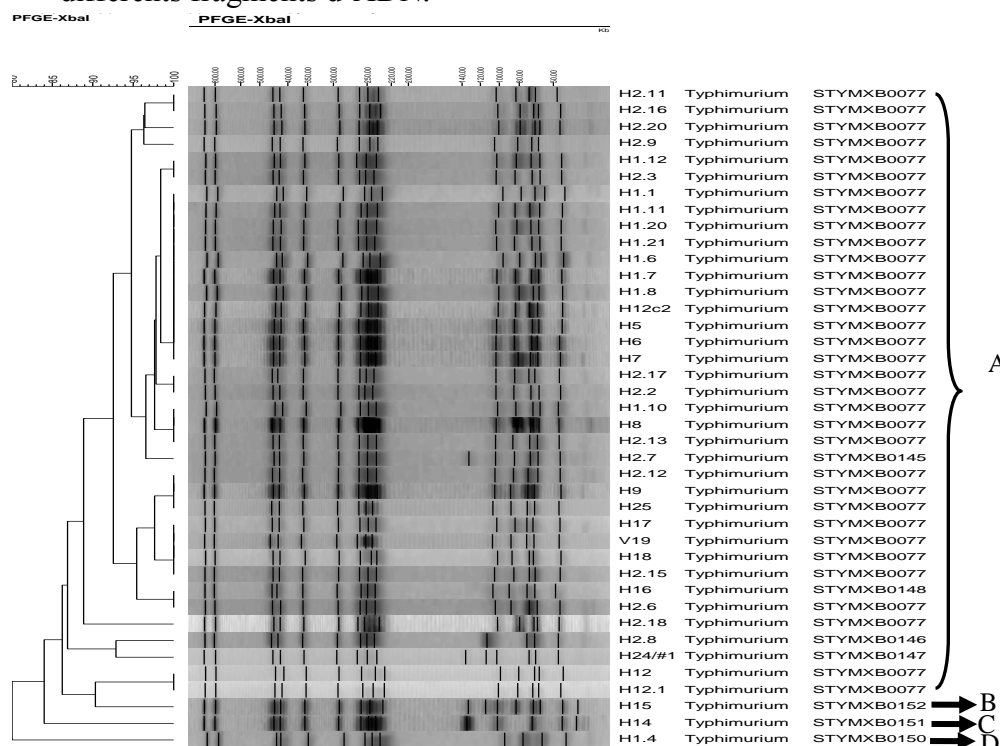
#### 3.2.2.2. Analyse PFGE et PCR des isolats

##### 3.2.2.2.1. Analyse PFGE

L'analyse comparative en champ pulsé des 65 souches de *Salmonella* humaines et aviaires étudiées parmi les 86 souches isolées, et appartenant aux 7 sérotypes dont 5 sérovars communs a généré 23 profils différents.

- (i) ***S. Typhimurium***. Parmi les 50 isolats humains et l'unique souche aviaire de *S. Typhimurium*, 38 ont été analysés par la PFGE. Les 37 souches humaines ont

été choisies selon les données épidémiologiques des isolats et leurs profils d'antibiorésistances. L'analyse PFGE des 38 souches digérées par l'enzyme *Xba*I a identifié seulement 8 différents profils constitués de 13 à 17 fragments d'ADN, et répartis sur 4 groupes ou clusters (A-D). Cependant, le degré d'homogénéité et de similarité entre les 4 clusters est assez élevé ( $\geq 80\%$ ). Les liens génétiques des différents profils PFGE sont représentés par le dendrogramme ci dessous (Figure 9). La plupart des souches appartiennent au cluster A (35/38 isolats) avec 5 profils ayant un pourcentage de similarité  $\geq 89\%$  (XB0077, XB0145, XB0146, XB0147, XB0148). Le profil XB0077 est le profil dominant avec 31 souches d'origine humaine et l'unique souche aviaire isolée. Le profil dominant d'antibiorésistance pour les souches humaines dans ce groupe A est le profil multi-résistant aux antibiotiques (AMR) avec 21 isolats. Les 3 autres clusters (B-D) sont composés chacun d'une unique souche humaine avec notamment 3 profils différents (XB0152, XB0151, XB0150). Cependant, les 3 profils ne diffèrent que par uniquement 3 différents fragments d'ADN.



**Figure 9.** Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *Xba*I des 38 souches de *S. Typhimurium* humaines et aviaires isolées lors des deux années d'étude.

- (ii) **Variants monophasiques et immobiles du sérovar *Typhimurium* « *Typhimurium-like* ».** L'analyse PFGE des variants monophasiques *S.4, 12:-:1,2*, *S. 4, 5,12:-i:-*, et immobile *S. 4,12:-:-* humains recueillies, a identifié un seul profil STM0077 avec une similarité génétique de 80% (Figure 10). Sur le dendrogramme global, ces 5 souches dites « *Typhimurium-like* » ont montré une similarité génétique de 90% voire 100% avec certaines souches de *S. Typhimurium* appartenant au profil XB0077.

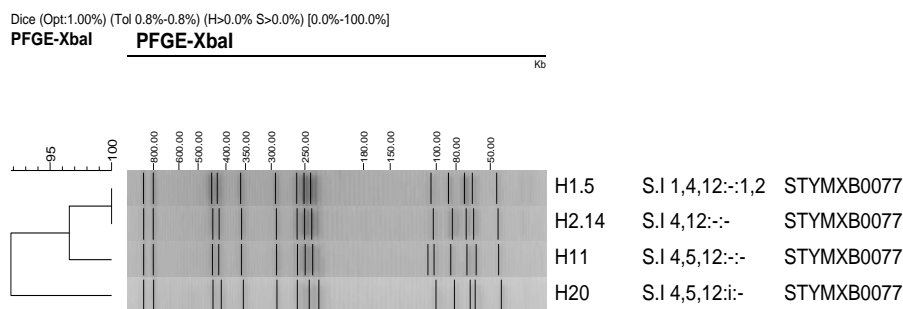


Figure 10. Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *XbaI* des 5 souches humaines des variants monophasiques et immobiles recueillies lors des deux années d'étude.

(iii) **S. Enteritidis.** La macro restriction avec l'enzyme *XbaI* des 11 souches testées parmi les 12 souches de *S. Enteritidis* a identifié 6 différents profils appartenant à 3 distincts clusters (A-C) (Figure 11). Le cluster A comprenait 8 souches avec 4 profils différents, et dont le pourcentage de similarité génétique est  $\geq 92\%$ . Le profil XB0001 est majoritaire avec 2 souches aviaires et 3 souches humaines dont l'indice de Dice montrait une similarité génétique de 100%. Le cluster B comprenait 2 souches humaines isolées. La similarité génétique entre les deux clusters A et B est de 84%. Enfin, le Cluster C comprenait une seule souche humaine isolée, et dont le pourcentage de similarité avec les deux autres clusters était de 58% (Figure 11). Au sein de la base de l'unité CEB, Les profils SENTXB0046 et SENTXB0047, et SENTXB0048 de *S. Enteritidis* sont nouveaux.

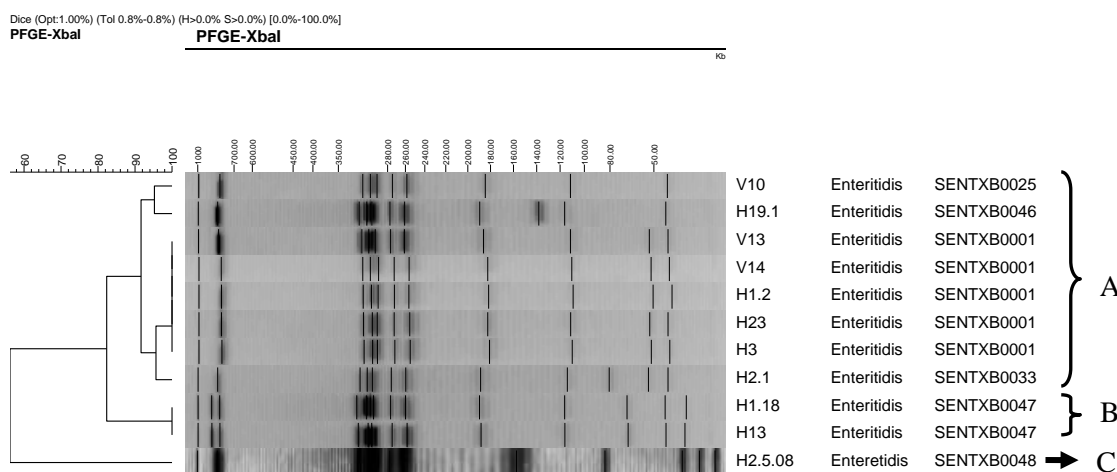


Figure 11. Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *XbaI* montrant les 3 clusters des 11 souches de *S. Enteritidis* humaines et aviaires isolées lors des deux années d'étude.

- (iv) **S. Manhattan.** Les 2 souches humaine et aviaire ont montré deux profils différents ayant 82% de similarité génétique (Figure 12). D'autre part, ces deux profils ont déjà été observés au sein de la base de l'unité CEB.

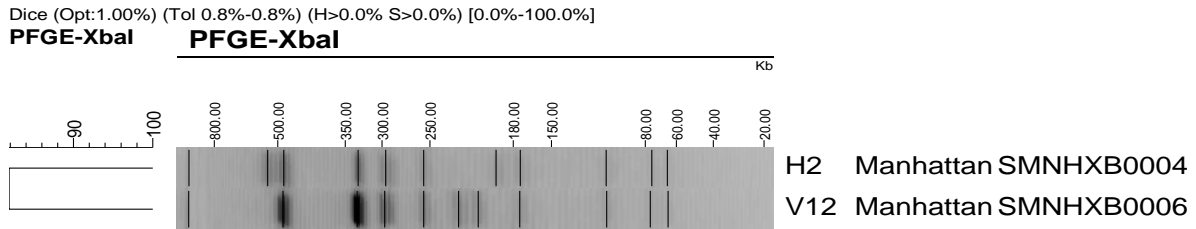


Figure 12. Les deux profils PFGE des 2 souches humaine et aviaire de *S. Manhattan* obtenus par l'enzyme *XbaI*

- (v) **S. Hadar.** Les 3 souches aviaires isolées du même bâtiment ont montré 2 profils PFGE différents (XB0003 et XB0019) avec 78% de similarité génétique mais uniquement avec 2 fragments de moins pour le profil XB0019 (Figure 13). Par ailleurs, ces deux profils ont été comparés aux différents profils appartenant à plus de 150 souches de *S. Hadar* stockées dans la base de données de l'unité CEB de l'ANSES. Le profil XB0003 est largement majoritaire.

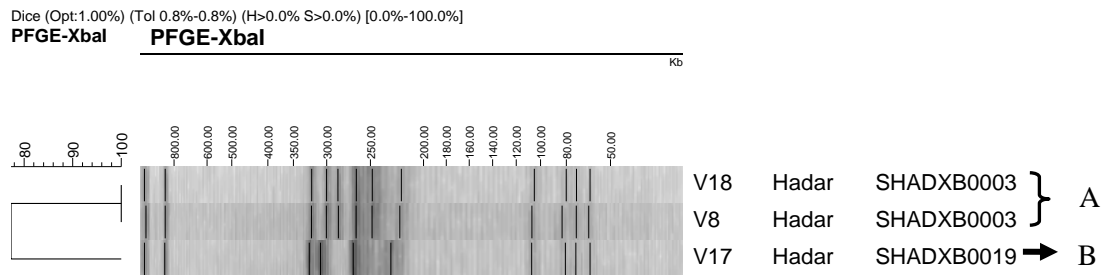
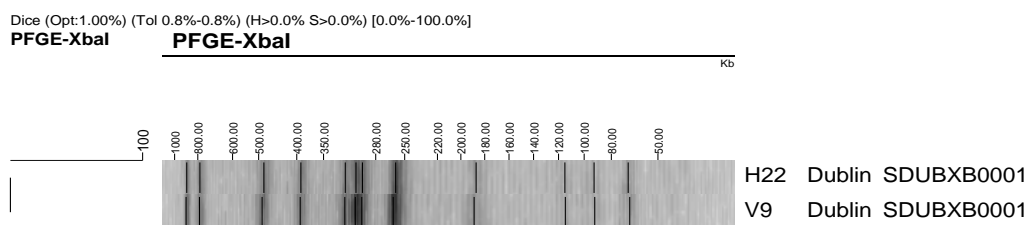


Figure 13. Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *XbaI* des 3 souches aviaires de *S. Hadar*.

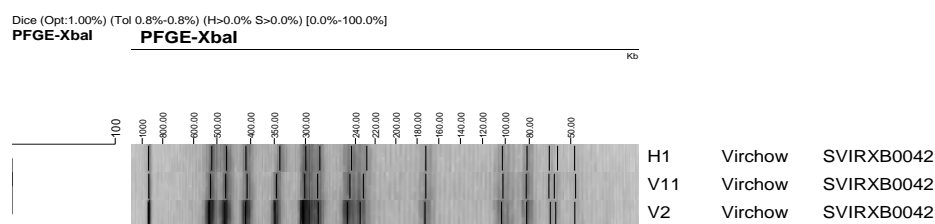
- (vi) **S. Dublin.** La digestion enzymatique avec l'enzyme *XbaI* de l'ADN chromosomal des 2 souches humaine et aviaire a présenté 1 seul et même profil avec 100% de similarité (Figure 14). Il est de même pour les 3 souches de *S. Virchow*. En effet, les 2 souches aviaires de *S. Virchow* isolées séparément sur deux bandes successives de poules pondeuses logées dans le même bâtiment d'élevage, et l'unique souche humaine identifiée ont présenté



un seul profil VIRXB0042 avec 100% de similarité génétique (Figure 14). Comparés aux différents profils présents dans la base de données de l'unité CEB, le profil SDUBXB0001 de *S. Dublin* a déjà été observé dans la base, contrairement au profil SVIRXB0042 de *S. Virchow* qui n'a jamais été observé dans la base de l'unité CEB de l'ANSES.

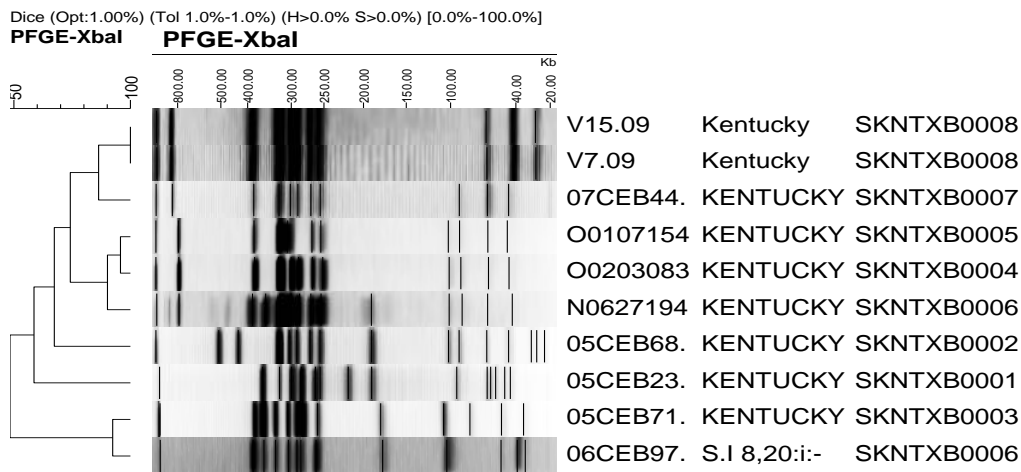


**Figure 14.** Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *XbaI* des 2 souches humaine et aviaire de *S. Dublin* isolées lors des deux années d'étude.



**Figure 15.** Dendrogramme issu de l'analyse PFGE avec l'enzyme *XbaI* des 2 souches aviaires et la souche humaine de *S. Virchow* isolées lors des deux années d'étude.

- (vii) ***S. Kentucky*.** Les 3 souches de *S. Kentucky* isolées ont présenté un profil identique XB0008 à 100% de similarité génétique. Au sein de la base de l'unité CEB, ce profil comparé à celui de la souche 07CEB44 isolée de volaille en provenance d'Ethiopie a montré une similarité génétique de 90% (Figure 16). Notons que ces 4 souches de *S. Kentucky* présentaient le même profil de résistance aux fluoroquinolones.



**Figure 16. Dendrogramme de l'analyse PFGE par l'enzyme XbaI des 2 souches aviaires de *S. Kentucky* isolées dans 3 différents bâtiments d'élevages comparées aux souches de *S. Kentucky* stockées dans la banque de données de l'unité CEB de l'ANSES.**

### 3.2.2.2. Analyse ERIC et IS-PCR

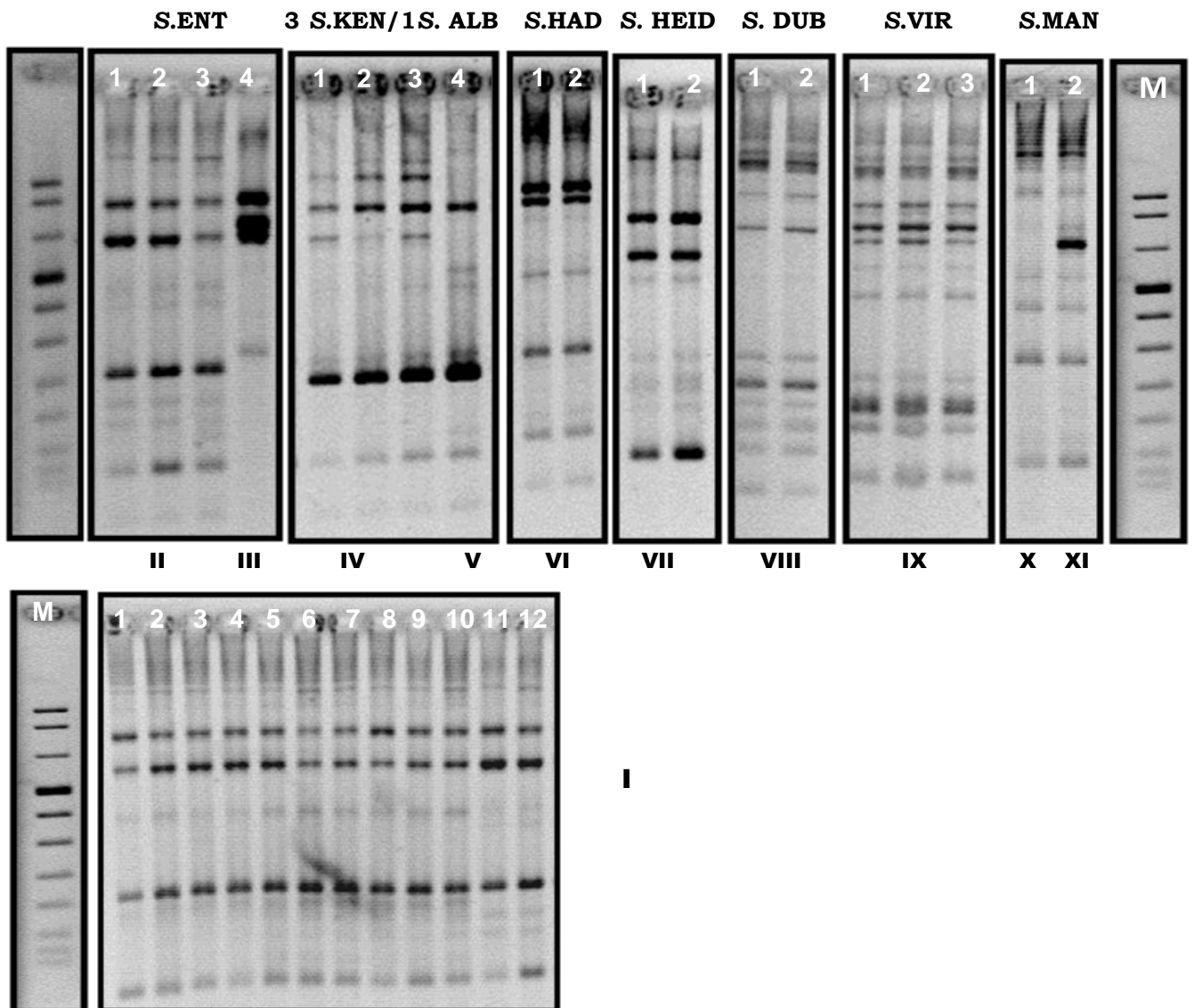
Les 67 souches humaines recueillies et les 19 souches aviaires ont été également caractérisées par deux marqueurs fondés sur la PCR ; ERIC et IS. Pour chaque souche, l'expérience a été répétée au minimum 2 fois, avec en plus une dernière PCR de confirmation. Nous avons à la fin choisi d'illustrer le résultat des différents profils par le traitement des photos obtenus à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad, France). L'évaluation des tailles des bandes sur le gel d'agarose a été réalisée par la co-migration des fragments d'ADN avec le marqueur VIII dont les bandes sont comprises entre 19 et 1114 paires de bases (pb). Les 12 profils obtenus en ERIC-PCR ont été numérotés de I à XI (Figure 17) et les 13 profils observés en IS-PCR ont été représentés par des lettres, de A à L (Figure 18).

Les 50 souches humaines de *S. Typhimurium*, l'unique souche aviaire, et les 5 variants monophasiques et immobiles ont présenté un seul profil ERIC (I) (Figure 17), et un seul profil (A) avec la méthode IS-PCR (Figure 18).

Les 12 souches humaines et aviaires de *S. Enteritidis* ont montré 2 profils ERIC-PCR (II et III), et 3 profils en IS-PCR (B-D).

Les deux souches humaine et aviaire du sérotype Manhattan ont également présenté deux profils différents en ERIC-PCR (X et XI), et en IS-PCR (K et L). Par ailleurs, un seul profil en IS-PCR et un seul profil en ERIC-PCR a été identifié au sein de chacun des sérotypes suivants : *S. Hadar*, *S. Dublin*, *S. Kentucky*, *S. Heidelberg*, et *S. Virchow* (Figure 17 et 18).

- Les profils ERIC-PCR



**Figure 17. Les profils ERIC-PCR des différents sérovars des souches aviaires et humaines identifiées lors des deux années d'étude. Marqueur moléculaire VIII (19-1114 pb).**

**S. ENT** : Profils II et III des souches humaines et aviaires de *S. Enteritidis*

**S. TYM** : Profil I des souches de *S. Typhimurium* humaines et aviaire + les 5 souches des variants monophasiques et immobiles.

**S. KENT** : Profil IV des 3 souches aviaires de *S. Kentucky*.

**S. ALB** : profil V de la souche aviaire *S. Albany*

**S. HAD** : profil VI des 3 souches aviaires de *S. Hadar*

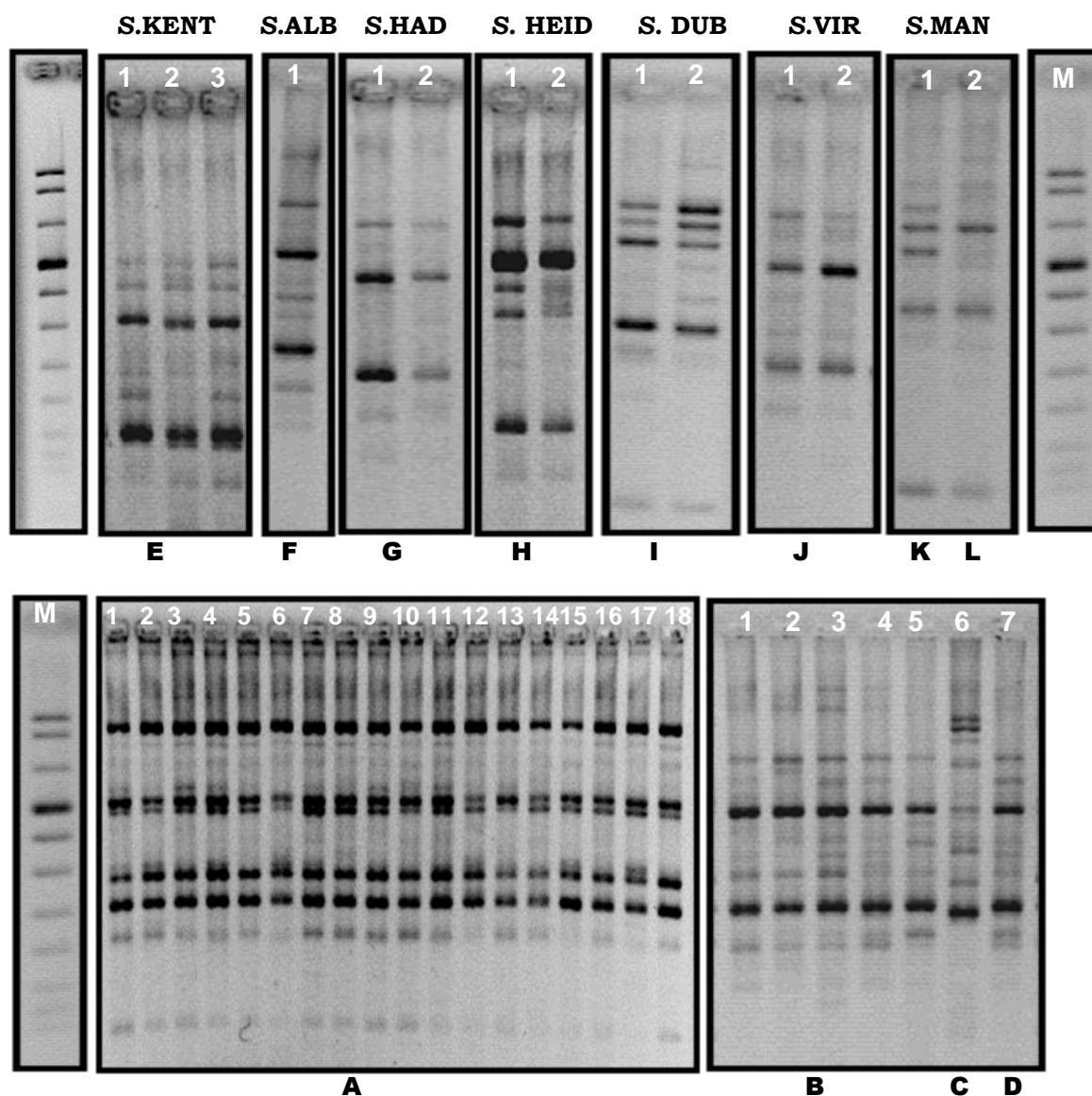
**S. HEI** : profil VII des 2 souches aviaires de *S. Heidelberg*

**S. DUB** : profil VIII des 2 souches aviaire et humaine de *S. Dublin*

**S. VIR** : profil IX des 2 souches aviaires et la souche humaine de *S. Virchow*

**S. MAN** : profils X et XI des 2 souches aviaire et humaine de *S. Manhattan*

- Les profils IS-PCR



**Figure 18. Les profils IS-PCR des différents sérovars des souches aviaires et humaines identifiées lors durant les deux années d'étude. Marqueur moléculaire (19-1114pb).**

**S. TYM** : Profil A des souches de *S. Typhimurium* humaines, la souche aviaire, et les 5 souches des variants monophasiques et immobiles.

**S. ENT** : Profils B, C et D des souches humaines et aviaires de *S. Enteritidis*

**S. KENT** : Profil E des 3 souches aviaires de *S. Kentucky*.

**S. ALB** : Profil F de la souche aviaire *S. Albany*

**S. HAD** : Profil G des 3 souches aviaires de *S. Hadar*

**S. HEI** : Profil H des 2 souches aviaires de *S. Heidelberg*

**S. DUB** : Profil I des 2 souches aviaire et humaine de *S. Dublin*

**S. VIR** : Profil J des 2 souches aviaires et la souche humaine de *S. Virchow*

**S. MAN** : Profils K et L des 2 souches aviaire et humaine de *S. Manhattan*.

### 3.3. Etude de l'émergence de l'antibiorésistance parmi les souches humaines

#### 3.3.1. Gènes de résistances aux bêta-lactamines

Les 58 souches de *Salmonella* résistantes aux bêta-lactamines, notamment les céphalosporines ont été analysées par 3 PCR Multiplex pour la recherche des 10 gènes *bla* (tableau 16). Le groupe d'enzyme CTX-M était le plus dominant chez les 50 souches productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi. Parmi elles, 35 portaient également une pénicillinase type TEM. Par ailleurs, une céphalosporinase type CMY était identifiée également dans 50 souches de *Salmonella* dont 6 ne portaient pas une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi. Seulement 1 seule souche de *Salmonella* était productrice de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi de type SHV (Tableau 16).

Sérotype	Nombre d'isolats	Profils d'antibiorésistance	Gènes $\beta$ -lactamases détectés
<b>S. Typhimurium (n=49)</b>	11	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	13	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	02		<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	05	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	01		<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	01		<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
	02	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	03	AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
	01	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	06	AMP CHL STP SSS TET CF	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> <sup>a</sup>
	01		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	02		<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>

<b>S. Enteritidis (n=4)</b>	4	AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO KAN GEN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
<b>S. 4,12:-:1,2 (n=2)</b>	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
<b>S. 4,12:-:- (n=2)</b>	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>
	1	AMP CHL STP SSS TET CF	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> <sup>a</sup>
<b>S. 4, 5,12:-i:- (n=1)</b>	1	AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>

**Tableau 15 :** Les gènes de  $\beta$ -lactamases identifiés parmi les 58 souches humaines de *Salmonella* de différents sérovars résistantes aux bêta-lactamines.

### 3.3.2. Gène *armA* de résistance aux aminosides

Le gène *armA* a été recherché parmi les 22 souches de *Salmonella* qui conféraient des niveaux variables et élevés de résistance aux 3 aminosides testés à savoir la kanamycine, la streptomycine, et la gentamicine. ArmA a été ainsi détecté chez 14 souches de *Salmonella* conférant un haut niveau de résistance aux 3 aminosides testés (absence de zone d'inhibition). Il a été également retrouvé chez 4 autres souches qui présentaient un haut niveau de résistance à la gentamicine et la kanamycine, mais qui restaient sensibles à la streptomycine (diamètre d'inhibition  $\geq 23$  mm). Cependant, *armA* n'a été détecté chez aucune des 4 souches résistantes à la gentamicine et la streptomycine (absence de zone d'inhibition) mais sensibles à la kanamycine (diamètre d'inhibition  $\geq 20$ mm).

Sérotype	Profils d'antibiorésistance	Gènes $\beta$ -lactamases	<i>armA</i>
<i>S. Typhimurium</i> (n=12) <sup>a</sup>	AMP AMC CEF FOX CTX CAZ FEP STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	<b>Positif</b>
<i>S. Typhimurium</i> (n=1) <sup>a</sup>	AMP CEF FOX CTX CAZ FEP SSS TMP STR KAN GEN	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<b>Positif</b>
<i>S. Typhimurium</i> (n=4) <sup>b</sup>	AMP AMC CEF FOX CTX CAZ FEP STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	<b>Négatif</b>
<i>S. Enteritidis</i> (n=4) <sup>c</sup>	AMP CEF FOX CTX CAZ FEP KAN GEN SSS TMP	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<b>Positif</b>
<i>S. I 4, 12:-:1,2</i> (n=1) <sup>a</sup>	AMP AMC CEF FOX CTX CAZ FEP STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	<b>Positif</b>

AMP : ampicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, CEF : céfalotine, FOX : céfoxitine, CTX : cefotaxime, CAZ: ceftazidime, FEP : céfépime, STR : streptomycine, KAN : kanamycine, GEN : gentamicine, CHL : chloramphenicol, SSS : sulfamides, TMP : triméthoprim, TET : tétracycline.

a : les 13 souches de *S. Typhimurium* et la souche du variant monophasique du *S. Typhimurium* étaient résistantes aux 3 aminosides testés (streptomycine, kanamycine, et la gentamicine).

b : les 4 souches du sérovar *Typhimurium* étaient résistantes aux aminosides (streptomycine, et gentamicine), mais qui restaient sensibles à la kanamycine.

c : les 4 souches de *S. Enteritidis* étaient résistantes à la gentamicine et la kanamycine, mais qui restaient sensibles à la streptomycine.

**Tableau 16: Les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des 18 souches de *Salmonella enterica armA*-positives isolées dans le service de bactériologie du CHU Dorban d'Annaba.**

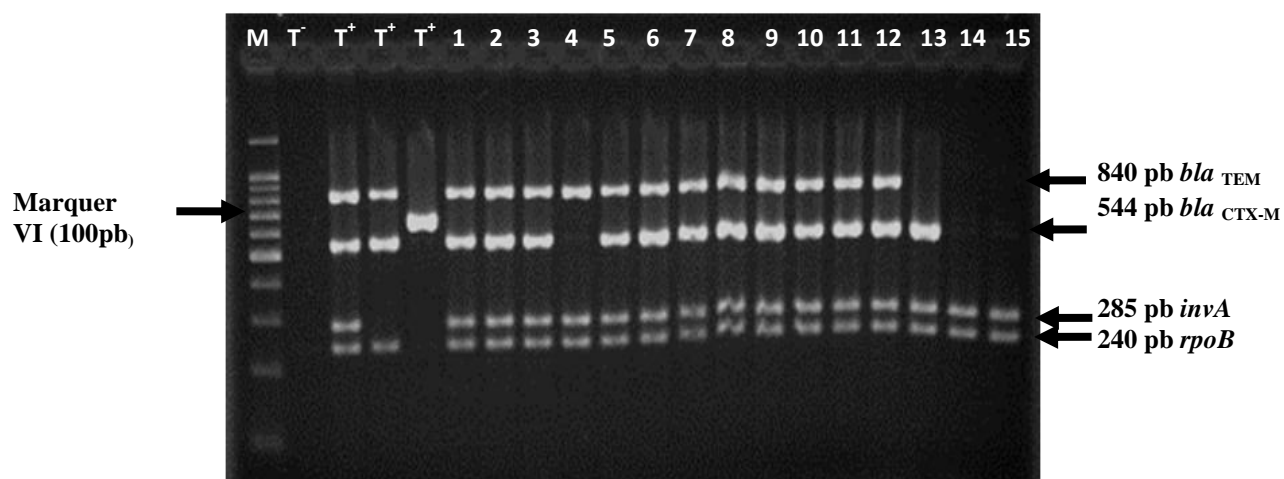


Figure 19. Gènes  $\beta$ -lactamases identifiés par PCR-Multiplex parmi les 58 souches humaines résistantes aux  $\beta$ -lactamines.

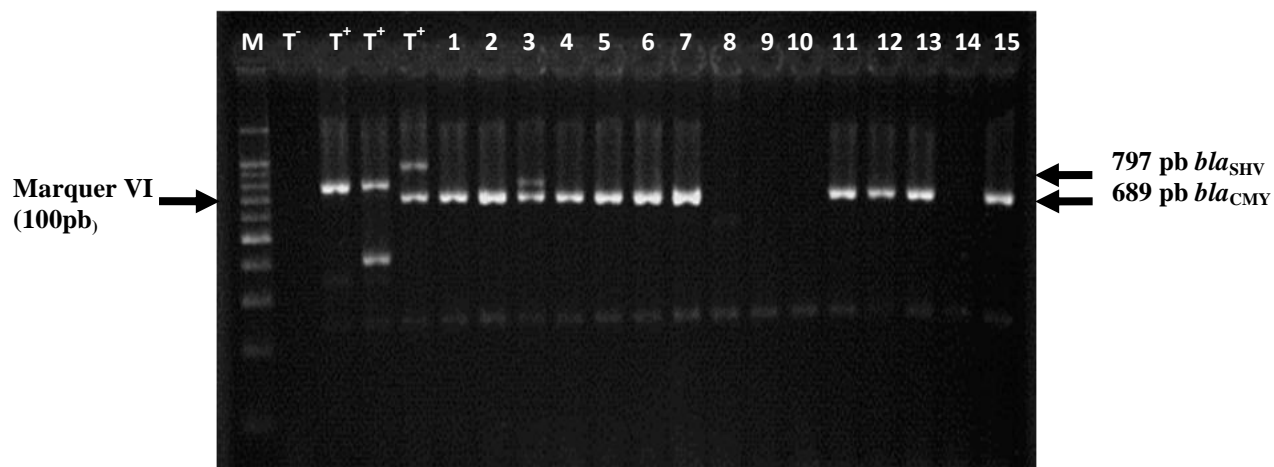


Figure 20. Gène type CMY identifié par PCR-Multiplex parmi les 50 souches humaines résistantes aux  $\beta$ -lactamines et productrices de céphalosporinases.

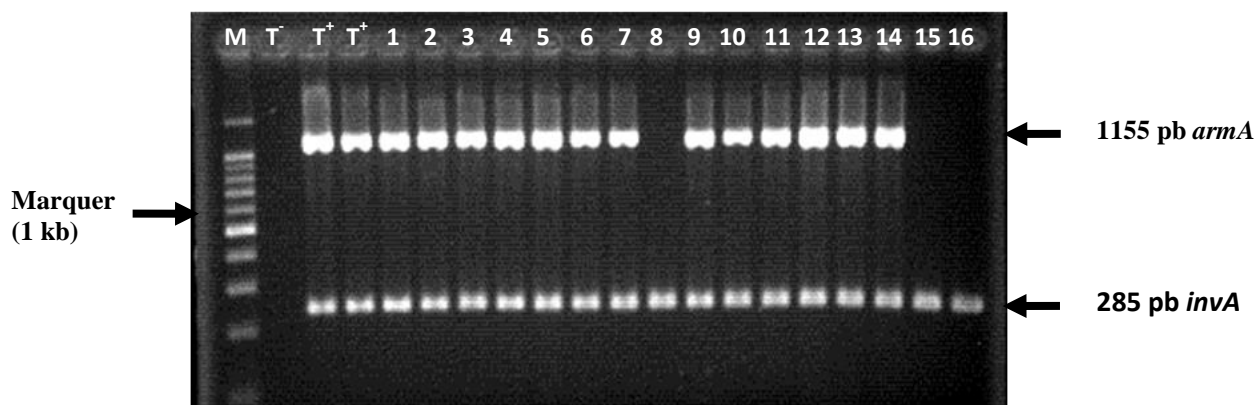


Figure 21. Gène *armA* identifié par PCR parmi les 18 souches humaines résistantes aux aminosides testés.



### 3.3.3. Séquençage du groupe d'enzyme CTX-M

Parmi les 26 souches humaines de *Salmonella* choisies, et contenant une bêta lactamase type CTX-M, 24 souches portaient le groupe d'enzyme type CTX-M-15, et uniquement 2 souches contenaient le groupe CTX-M-1.

Profils d'antibiorésistances des souches possédant le gène <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Nombre d'isolats séquencés	Groupe d'enzyme CTX-M identifié
<b>S. Typhimurium (n=42)</b>		
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET (n=11)	03	CTX-M-15
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN CHL SSS TMP TET (n= 15)	05	CTX-M-15
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET (n=7)	2	CTX-M-15
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN SSS TMP TET (n=2)	2	CTX-M-15
AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN SSS TMP TET (n=3)	3	CTX-M-15
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP (n=1)	1	CTX-M-15
AMP CHL STP SSS TET CF (n=3)	3	2 CTX-M-1 1 CTX-M-15
<b>S. Enteritidis (n=4)</b>		
AMP CF FOX CTX CAZ FEP CRO KAN GEN SSS TMP TET	4	CTX-M-15
<b>S. I 4, 12:-:1,2 (n=2)</b>		
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET	1	CTX-M-15
<b>S.I 4,12:-:- (n=1)</b>		
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR KAN GEN CHL SSS TMP TET	1	CTX-M-15
<b>S. I4, 5,12:-i:- (n=1)</b>		
AMP AMC CF FOX CTX CAZ FEP CRO STR GEN SSS TMP TET	1	CTX-M-15

Tableau 17 : Le séquençage du gène CTX-M des 26 souches choisies parmi les 50 souches humaines de *Salmonella* contenant une β- lactamase type CTX-M.

## 4. Discussion

### 4.1. L'infection des élevages de poules pondeuses par *Salmonella*

#### 4.1.1. Prévalence de contamination

A notre connaissance, cette enquête transversale donne une première description représentative de la situation des élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation situés dans les régions Algériennes d'Annaba et El Tarf vis-à-vis de *Salmonella* spp. Une sélection aléatoire n'a pas été jugée nécessaire pour cette étude, puisque 18 des 22 élevages de pondeuses en activité durant cette période, ont été échantillonnés et que les 4 autres (non prélevés) sont de la même typologie. D'un point de vue épidémiologique, notre étude est quasi-exhaustive dans ces deux régions de l'extrême nord est Algérien. Notre étude a permis d'estimer la prévalence de la contamination des élevages de poules pondeuses tout au long de la période d'élevage par *Salmonella* spp. à 8 troupeaux positifs parmi les 18 échantillonnés. Chaque lot d'élevage a été dépisté positif dans l'un des 7 échantillons collectés. A l'échelle nationale, très peu de données expérimentales sont disponibles sur la prévalence de contamination des exploitations avicoles par *Salmonella*. Le bilan annuel du laboratoire régional d'El Tarf (LVR) montre un niveau très bas de souches de *Salmonella* isolées, seulement 24 souches isolées en 2009 tous élevages confondus (issus du rapport 2009 du réseau de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques, 2010). Il faut savoir, qu'en dehors des prélèvements obligatoires effectués dans le but d'acquiescer un certificat sanitaire et qui concernent des sujets vivants soumis à une antibiothérapie préalable (cas de la volaille) ou des prélèvements de surface (écouvillonnages des surfaces des bâtiments d'élevage après désinfection), les laboratoires vétérinaires sont de moins en moins sollicités à cause des mesures sanitaires entreprises sur le terrain suite aux déclarations systématiques (rapport 2009 du réseau de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques, 2010). Toutefois, les rares enquêtes terrain montrent une prévalence assez élevée. L'étude menée par Elgroud et al., (2009) durant deux années successives dans la région de Constantine, sur 30 élevages parmi les 63 élevages de poulets de chair fonctionnels, a mis en évidence une fréquence de contamination de 11 élevages parmi les 30 élevages échantillonnés. Plus récemment une enquête conduite par Ayachi et al. (2010), dans 5 exploitations de poules pondeuses dans la région de Batna (la région plus importante en termes de capacité de poules pondeuses) a permis de mettre en évidence 4 exploitations sur les 5 échantillonnés contaminés avec 3 sérotypes différents (Typhimurium, Gallinarum-Pullorum, et *Salmonella* Wien). Bien que l'étude d'Elgroud et al.(2009), celle de Ayachi et al. (2010), et notre présente enquête ne soient strictement pas comparables en termes de type d'élevages, zone géographique, et également la méthodologie d'échantillonnage, il est quand même important de souligner que les résultats de ces enquêtes respectives sont en accord en termes de fréquence de troupeaux contaminés par *Salmonella*, mettant ainsi l'accent sur un niveau de contamination relativement élevé par *Salmonella* dans les exploitations avicoles privées en Algérie.

A l'échelle Européenne, l'étude conduite par l'EFSA, dans plusieurs pays de l'union européenne (European Food Safety Authority), entre octobre 2004 et septembre 2005 dans les élevages de poules pondeuses en fin de bande a mis en évidence une prévalence de

contamination par *Salmonella* qui avoisine 30.8% (EFSA, 2007). Cette prévalence de contamination diffère entre les états membres avec une large variabilité allant de 0% dans les pays du Nord tel que le Luxembourg et la Suède (Van Hooreberek et al., 2010) ; 17,9% en France (Huneau-Salaün et al., 2009) ; 31.08% en Belgique (Namata et al., 2008) jusqu'à atteindre un taux de prévalence élevé de contamination (79%) dans les pays du Sud tel que le Portugal (EFSSA, 2007 ; Hald, 2008). La récente baisse du niveau de contamination par les salmonelles dans les élevages de poudeuses observée dans certains pays européens tels que la France et le Danemark est probablement due aux performances des programmes de contrôle de *Salmonella*, qui sont basés sur l'application stricte des mesures d'hygiène et de biosécurité (Grimont et al., 1999 ; Van de Giessen et al., 2006).

Notre prévalence estimée dans les élevages de poudeuses de ces deux régions voisines doit être interprétée avec prudence en raison d'une part, du nombre relativement faible des élevages échantillonnés, et d'autre part, du fait que notre étude n'a pas été menée à un niveau national et par conséquent, la comparaison de notre estimation de la prévalence des élevages infectés avec celles obtenues dans les pays européens serait abusive. Néanmoins, il convient de souligner que notre étude est quasi-exhaustive dans ces deux régions voisines; en tenant compte des similarités d'élevages de poudeuses à l'échelle nationale, cela nous conforte et nous permet de croire que notre estimation pourrait approcher la situation réelle des élevages Algériens de poudeuses vis-à-vis de *Salmonella*. Par ailleurs, il est important de noter que le nombre élevé de prélèvements ainsi que le protocole d'échantillonnage, qui est inspiré du programme européen vis-à-vis du statut salmonellique dans les élevages de poules poudeuses, pourrait contribuer à la précision et à l'exactitude de nos résultats. Nos résultats montrent également que la fréquence de contamination des élevages de poudeuses est plus élevée en fin de bande, entre 70-86 semaines d'âge des poudeuses (7/17), comparée au début de ponte, après la mise en place des poulettes, entre 22-31 semaines d'âge (3/15), et au milieu d'élevage, entre 47-60 semaines d'âge des poudeuses (1/14). Il est bien connu que la probabilité de détection de *Salmonella* dans un troupeau augmente avec l'âge des poudeuses (Namata et al., 2008). Francart et al. (1993) ont montré que la contamination des poules par les salmonelles, quel que soit le mode d'élevage, évolue en fonction de l'âge, et qu'une augmentation du taux de contamination peut être observée en fin de ponte (au-delà de 50 semaines d'âge). Cette fréquence de contamination en fin de ponte pourrait être attribuée au stress physiologique que subissent les poulettes et qui est dû au système de logement des poudeuses dans des cages, tout particulièrement pendant le cycle de ponte. Plusieurs auteurs ont rapporté que certains facteurs de stress tels que ; les températures élevées au sein des poulaillers, le cycle de production d'œufs, la mue, le transport peuvent causer l'excrétion de *Salmonella* (Van de Giessen et al., 2006 ; Humphrey, 2006 ; Golden et al., 2008).

Dans notre travail, et en se basant sur l'état observationnel des bâtiments, cette présence de contamination par *Salmonella* en fin de bande pourrait être attribuée également au relâchement des employés dans les pratiques de biosécurité en fin d'élevages, juste avant la réforme des poulettes. En outre, dans notre étude, parmi les 3 élevages dépistés positifs pour *Salmonella* en début de bande, 2 ont été déjà identifiés positifs en fin de bande, entre 70-82 semaines d'âge des poudeuses lors des 2 précédents lots de poules élevées dans les mêmes bâtiments d'élevages. Cela pourrait indiquer la persistance de certains sérovars entre deux

bandes successives. Il est bien connu que les prélèvements de poussières peuvent nous renseigner sur l'état de contamination des précédentes bandes d'élevages (Arnalod et al., 2009). Le résultat de cette étude corrobore clairement cette conclusion.

D'un autre côté, la proportion de prélèvements positifs dans notre étude est très faible. En effet, seulement 19 isollements positifs sur un total de 2754 analysés (0.68%). Ce résultat est en accord avec l'étude menée récemment en France par Huneau-Salaün (2009) sur 519 élevages de poudeuses et qui avaient déjà mis en évidence une faible fréquence d'isolement positifs de *Salmonella* dans les prélèvements environnementaux. En effet, dans un tiers des 93 troupeaux contaminés, seulement un échantillon s'est révélé positif parmi les 7 échantillons de matières fécales analysés pour chaque troupeau. Malgré le temps de transport relativement court et le nombre important d'échantillons analysés dans notre étude (2754), la fréquence d'isolement de *Salmonella* dans les prélèvements environnementaux restait très faible. Ce résultat est en désaccord avec certaines études qui ont montré que la méthode d'échantillonnage intensif dans les élevages de poudeuses était considérée comme une méthode efficace pour la détection de *Salmonella* dans les troupeaux avec un faible niveau de contamination (Aho, 1992 ; Musgrove et al., 2005 ; Carrique-Mas et al., 2009). Le faible taux d'isolement dans notre étude (7 pools de prélèvements environnementaux) pourrait être expliqué par le faible degré d'excrétion de *Salmonella* au moment de l'échantillonnage et/ ou l'excrétion intermittente de *Salmonella* par les oiseaux infectés (Van Immerseel et al., 2004). Elle pourrait être également due à une compétitivité entre différents germes saprophytes qui inhiberait ainsi la multiplication des germes pathogènes et ce par modification du milieu car ces derniers sont plus exigeants que les germes saprophytes (Valanconny et al., 2001). Ce résultat d'isolement peu fréquent pourrait aussi conclure, que le protocole d'échantillonnage utilisé dans notre étude (limité aux pools de prélèvements environnementaux) n'est pas assez sensible et efficace dans les troupeaux d'élevages où la bactérie est faiblement excrétée, ou excrétée par un petit nombre d'animaux infectés. La sensibilité et le pouvoir de détection de *Salmonella* dans les élevages de poudeuses, est un élément crucial parce que les prélèvements sont réalisés à partir de l'environnement des animaux et non à partir des oiseaux eux-mêmes, procurant ainsi une image indirecte de l'excrétion des salmonelles par les poules dans leur environnement. L'analyse bactériologique des prélèvements, nous laisse supposer qu'une partie des poudeuses pourrait porter l'agent pathogène sans excrétion et effusion de l'agent, conduisant ainsi à une sous-estimation de la fréquence réelle de *Salmonella* dans les élevages étudiés.

Ces hypothèses sont en accord avec l'étude menée par Ayachi (2010), puisque de son côté, il a pu isoler 4 souches appartenant à 3 sérotypes différents dans seulement 24 échantillons caecaux, oviductes et oviductes (taux d'isolement de 1.6%). Ces résultats confortent les données apportées par Van Hoorebeke et al. (2009), qui indiquent que l'examen post-mortem des poudeuses (prélèvements caecaux et/ou ovaire/ oviducte) est le protocole le plus précis afin de déterminer l'état réel d'infection des élevages de poudeuses avec un bas niveau de contamination par *Salmonella*.

#### 4.1.2. Sérotypes identifiés et leurs profils de résistance aux antibiotiques

La distribution des sérotypes de *Salmonella* dans la présente étude est particulièrement hétérogène. En effet, 9 sérovars ont été identifiés parmi les 19 isolats de *Salmonella*. *Salmonella* Enteritidis était le sérotype prédominant en termes de nombre (n=4), cependant il n'a été isolé que dans un seul bâtiment d'élevage de poules pondeuses. Pour *S. Typhimurium*, 1 seule souche a été identifiée au cours de notre étude. A l'échelle nationale, les sérovars *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* sont les plus fréquemment isolés de prélèvements de volailles (Anonyme, 2009 ; Ayachi, 2010). Dans une étude menée entre 1998 et 2002 à l'Institut Pasteur d'Alger, sur 51 826 prélèvements de la filière volaille y compris les poules pondeuses, 112 des souches (48%) appartenaient au sérotype *S. Enteritidis* (Aboun et al., 2003). En 2006, 26 foyers confirmés de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* ont été signalés dans les élevages de volailles situés dans les régions nord du pays comprenant les poules pondeuses (Anonyme, 2006c). En 2008, Il ya eu 25 foyers confirmés de salmonelloses aviaires impliquant le serovar Enteritidis (Anonyme, 2009). Dans un rapport de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), il a été rapporté que *S. Enteritidis* est le sérotype le plus fréquemment isolé en 2008 (58% de tous les cas confirmés), suivi de *S. Typhimurium* (21.9%) (EFSA, 2010). Toutefois, il est à préciser que ce nombre de cas de *S. Enteritidis* tend à diminuer dans de nombreux pays de l'union européenne en faveur de *S. Typhimurium* (EFSA, 2010).

Dans notre étude, *S. Kentucky* a été retrouvée dans 3 élevages différents de poules pondeuses. D'un autre coté, 2 souches de *S. Manhattan* ont été retrouvées dans un autre élevage de poules pondeuses. Ces 2 serotypes ne sont pas fréquents en Algérie. Ils pourraient provenir de l'environnement, poussins importés ou des autres espèces animales, indiquant ainsi la grande diversité des réservoirs potentiels de contamination par les souches non typhoïdique de *Salmonella* telles ; aliments, eau, accès facile des autres espèces animales, contact humain et autres.

Dans notre projet d'étude, une seule souche de *S. Dublin* a été isolée dans un échantillon d'eau. Ce sérotype est très souvent associé à l'élevage bovin, et rarement rencontré chez la volaille. Sa présence dans l'élevage de poules pondeuses peut être la conséquence de la présence d'autres animaux dans l'exploitation (bovins, ovins, rongeurs, chats, etc) et leur libre accès aux élevages, ou bien il pourrait être dû à une transmission humaine directe par le staff de la ferme. Durant la même période d'isolement, *Salmonella* Dublin a été retrouvée sur des œufs de l'écloserie du complexe de reproduction aviaire-chair de la commune de Boumahra Ahmed, dans la Wilaya de Guelma, située à 60Km d'Annaba (Source Journal ELwatan du 27.04.2009). Les dégâts de cette contamination ont été évalués à 302 000 œufs détruits. Selon la source citée, le facteur humain du à des mains souillées manipulant les œufs reste l'hypothèse la plus cohérente. Dans notre étude, l'isolement de 2 souches de *Salmonella* dans les prélèvements d'eau (0.80%), et qui sont des plus sévères dans les cas de salmonelloses (*S. Typhimurium*, et *S. Dublin*), pourrait témoigner d'une contamination fécale récente de l'eau d'abreuvement des poules pondeuses, transmise par un vecteur humain. Il se pourrait qu'elle soit accidentellement transmise lors des lavages des réservoirs et bacs d'eaux. Il faut savoir également, que dans notre étude, les chiffonnettes de prélèvements environnementaux prélevées des bacs d'eaux, ont été comptées comme prélèvements d'eau dans le laboratoire

lors de l'identification bactériologique positive de *Salmonella*. Cela est dû à leur grande absorption d'eau au moment des prélèvements par frottements des parois des bacs.

Dans notre étude, le nombre d'isolats de salmonelles résistants à au moins 3 molécules d'antibiotiques est relativement faible (n= 6) et pourrait indiquer que l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages de poules reste modérée. Selon les déclarations des agriculteurs via les questionnaires, aucun des 18 troupeaux n'a été traité avec des antimicrobiens tout au long des bandes d'élevages. Le taux limité d'utilisation des antimicrobiens dans nos élevages de poules n'est pas surprenant, et corrobore les résultats déjà observés dans beaucoup d'autres études (Schwaiger et al., 2008 ; 2010 ; Kojima et al., 2009). Ces travaux ont rapporté que le niveau de résistance aux antimicrobiens dans les élevages de poules poules est relativement faible comparé aux élevages de poulet de chair, élevages de porcs, et ceux des bovins (Bywater et al., 2004 ; De Jong et al., 2009 ; Persoons et al., 2009).

Dans notre étude, sept isolats de salmonelles ont été trouvés résistants à la tétracycline et à la streptomycine. La résistance à ces molécules, qui sont d'anciennes molécules largement utilisées en première intention est communément observée chez les isolats de salmonelles. Cette résistance a été rapportée dans plusieurs travaux concernant la volaille et les produits avicoles (Manie et al., 1998 ; Nayak et al., 2004 ; Elgroud et al., 2009). La résistance des souches de salmonelles à l'acide nalidixique a concerné dans notre étude douze isolats appartenant à cinq différents sérotypes. Ceci est probablement lié à l'utilisation permissive des quinolones dans les élevages aviaires (Usera et al., 2002). Cependant, la résistance aux fluoroquinolones n'a été retrouvée que chez les 3 isolats de *S. Kentucky* avec une CMI  $\geq 8$  mg/L. La présence d'isolats résistants aux fluoroquinolones est par contre assez inquiétante, car ces molécules sont utilisées pour le traitement des cas humains sévères de salmonelloses. A notre connaissance, il s'agit du premier isolement du sérovar *Kentucky* résistant à la ciprofloxacine en Algérie. Malheureusement, aucune enquête n'a été menée pour identifier la source de cette contamination par le sérovar *Kentucky*.

Récemment, des études ont rapporté l'émergence du sérotype *Kentucky* résistant aux fluoroquinolones à travers plusieurs pays tels que la France (Weil et al., 2006), Belgique (Collard et al., 2007), Ethiopie (Aragaw et al., 2007; Molla et al., 2006), Maroc (Bouchrif et al., 2008) et Slovénie (Majtán et al., 2006). Notre isolement de *S. Kentucky* résistante à la ciprofloxacine coïncidait avec d'identiques isollements de ce sérovar à l'Institut Pasteur de Paris, et à la même période, et avec le même profil de résistance. Selon Le Hello et al. (2010), cet isolement humain en France était lié à des voyageurs en provenance d'Afrique. L'enquête épidémiologique de l'institut Pasteur a montré l'isolement de ce clone de *S. Kentucky* résistant à la ciprofloxacine chez la volaille dans trois pays d'Afrique (Ethiopie, Maroc, et le Togo) (Le Hello et al., 2011), suggérant ainsi la volaille comme vecteur important de la dissémination de ce clone. Selon Le Hello et al. (2011), la source possible de la contamination des volailles pourrait être les aliments en provenance des fermes d'aquaculture situées dans les pays Nord-Est ou Est d'Afrique, et qui utilisaient de manière intensive des agents antimicrobiens. En effet, ce clone résistant à la ciprofloxacine du sérovar *Kentucky* a pu se propager chez la volaille qui se nourrissait de farine de poissons en provenance de ces fermes aquacoles. En dernier, cinq isolats de *Salmonella* appartenant aux sérovares Hadar (n=2) et

Kentucky (n=3) ont montré une résistance à la céfalotine (C1G). Heureusement, aucune résistance aux céphalosporines de troisième génération (3CG) n'a été identifiée dans notre étude, à la différence des souches humaines de *Salmonella* isolées chez des patients habitants les deux régions et qui ont montré une forte prévalence de résistance aux C3G. Ces résistances sont probablement dues à la pression de sélection causée par l'usage de ces molécules dans les hôpitaux (Naas et al., 2005).

#### 4.1.3. Les indicateurs de risque

L'étude des questionnaires et le suivi des 18 élevages de poules pondeuses a permis de recenser un certain nombre de facteurs dont la présence est préjudiciable par rapport au risque salmonellique. Parmi les nombreux indicateurs sélectionnés, 6 apparaissent pertinents avec un risque relatif supérieur ou égal à 2. Cependant, aucun indicateur n'a été retrouvés statistiquement significatif. Néanmoins, nous ne pouvons pas écarter un manque de puissance statistique qui est due à notre nombre restreint d'élevages.

L'absence de clôture ferme à l'entrée des fermes d'élevages de poules pondeuses semble influencer le risque de contamination salmonellique des troupeaux de pondeuses dans notre étude (RR=3.57). La présence de clôture apparaît comme un facteur protecteur. Elle permet de limiter l'accessibilité des bâtiments aux animaux domestiques et sauvages (chiens, chats, ovins, bovins et autres), mais également aux visiteurs. Il a été en effet prouvé que les animaux ainsi que les humains peuvent jouer directement ou indirectement un rôle de vecteur de transmission horizontale des salmonelles (Hald et al., 2000 ; Cardinale et al., 2004; Heyndrickx et al., 2002 ; Hunneau-Salaün et al., 2007).

L'absence d'une désinfection totale avant la mise en place des poulettes semble être un indicateur de risque de la contamination des troupeaux par *Salmonella* spp (RR = 2,7). Effectivement, les 7 des 13 élevages qui n'ont pas eu recours à une étape finale de désinfection totale avant la mise en place des poulettes se sont révélés positifs alors que seulement 1 seul bâtiment a été retrouvé positif parmi les 5 élevages qui avaient utilisé un désinfectant (53,8% vs 20%). Ce résultat pourrait souligner les mauvaises procédures de nettoyage et de désinfections des bâtiments, qui favoriseraient les risques de contaminations salmonelliques. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Lahellec et al. (1986) et ceux de Baggesen et al. (1992) qui ont démontré que le nettoyage et la désinfection inefficace pourrait être le principal facteur de risque de contamination par *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair. Il a été prouvé que l'utilisation de détergent et désinfectant appropriés font partie intégrante des bonnes pratiques d'hygiène classiquement décrites dans les protocoles de décontamination des bâtiments d'élevages (Skov et al., 1999 ; Rose et al., 1999 ; Cardinale et al., 2004).

La mauvaise gestion des cadavres est sortie comme étant un indicateur de risque potentiellement associé à la contamination des troupeaux par *Salmonella* spp (RR=2.6). En effet, le maintien des cadavres à l'intérieur du bâtiment mais essentiellement dans l'exploitation augmenterait l'exposition du troupeau aux salmonelles. Cette présence prolongée de cadavres dans les exploitations est probablement un indicateur du niveau médiocre de l'hygiène globale de l'élevage. Parfois cette présence au sein de l'exploitation

est demandée par le propriétaire afin de contrôler le nombre de mortalités et vérifier les dire des employés. Malheureusement, cette présence pourrait contribuer significativement à la présence massive d'insectes, mouches, coléoptères et parasites à l'intérieur du bâtiment et qui pourraient agir ainsi comme vecteur de plusieurs maladies et agents pathogènes. Dans notre étude, quatre élevages sur les 5 ayant laissé les cadavres à l'intérieur de l'exploitation quelques jours (selon le questionnaire d'enquête et observations personnelles sur l'état des cadavres), et où nous avons observé la présence des mouches à l'intérieur des bâtiments lors de nos visites de prélèvements se sont révélés positifs pour *Salmonella* (Tableau 15). Cette observation souligne l'importance des mesures de bonnes pratiques de biosécurité afin de protéger les animaux contre toute infection due à un agent pathogène et sa propagation dans l'exploitation (Hoover et al., 1997 ; Craven et al., 2000 ; Liljebjelke et al., 2005).

Le système de ventilation des poudeuses apparait aussi comme un indicateur de risque de contamination salmonellique des troupeaux dans notre étude. Il pourrait être indirectement une preuve d'un lien potentiel entre la forte température à l'intérieur du bâtiment en raison d'une mauvaise ventilation, et la présence de *Salmonella*. Parmi les 5 élevages avec un système statique de ventilation, et qui semblaient manquer de renouvellement d'air avec une forte température à l'intérieur du bâtiment ( $\geq 30^{\circ}\text{C}$ ), 4 se sont révélés contaminés. Ces résultats sont en contradiction avec les études de Sunagawa et al. (1997) puis Matsumoto et al. (2001), et celle de Namata et al. (2008), qui ont montré une fréquence de contamination plus faible des élevages ayant une ventilation naturelle par fenêtres (au sol ou en cages) par rapport à ceux ayant une ventilation dynamique. Dans notre cas, les températures élevées à l'intérieur du bâtiment qui sont dues à notre climat chaud tout particulièrement pendant les périodes d'été auraient peut être causé l'agitation et le stress des poulettes, ainsi conduire à l'excrétion et l'effusion de *Salmonella*. Beaucoup d'études avaient démontré précédemment que le stress a un effet immunosuppresseur sur les poules poudeuses, et par conséquent favoriserait négativement l'excrétion de *Salmonella* (El-Lethey et al., 2003 ; Humphrey, 2006). Par ailleurs, la température élevée à l'intérieur des bâtiments d'élevages notamment en périodes de fortes chaleurs offre des conditions de chaleur et d'humidité qui sont fort favorables aux salmonelles (Pieskus et al., 2006).

La présence de rongeurs observés mort ou vivants à l'intérieur des bâtiments lors de nos visites paraît également influencer le risque de contamination des troupeaux par *Salmonella* spp (RR=2.6). Il a été rapporté que l'élevage en cage est un environnement plus attrayant pour les rongeurs car les poulettes sont logées dans des cages, ainsi ne peuvent gêner leur circulation (Carrique-Mas et al., 2009b). La présence de rongeurs dans les bâtiments reflète les mauvaises mesures de biosécurité dans les élevages. Beaucoup d'enquêtes réalisées dans des élevages de poulets de chair et poudeuses ont identifié les rongeurs comme source potentielle de contamination des élevages par *Salmonella* (Henzler et Opitz, 1992; Henzler et al, 1994b). Malheureusement, le nombre de poulaillers étudiés dans notre étude est relativement faible pour confirmer cette tendance. Rose et al. (2000) ont montré que le risque de persistance de salmonelles dans les unités d'élevages de poulets de chair après le nettoyage et la désinfection du bâtiment est deux plus élevé en présence de rongeurs.



Dans notre étude, le nettoyage à sec des cages apparaît comme un indicateur de risque de contamination des élevages par *Salmonella* (RR=2) (Tableau 15). Il est bien connu que les batteries de cages ne sont pas démontables, et par conséquent extrêmement difficiles à nettoyer et à désinfecter en raison de l'accès relativement restreint à l'intérieur des cages (Davies et Breslin, 2003a ; Carrique-Mas et al., 2009), ce qui pourrait expliquer la plus forte prévalence de *Salmonella* dans ces élevages par rapport aux systèmes alternatifs. Dans une étude menée en 1992 en France sur 574 élevages de poules, Francart et al. (1992) avaient déjà mis en évidence une fréquence de contamination des troupeaux par *Salmonella* spp plus élevée dans les élevages en cages comparée aux élevages au sol. En Belgique, Namata et al. (2006) ont montré un risque de positivité plus élevé des échantillons prélevés dans les élevages en cages par rapport à ceux des élevages au sol et ceux en plein-air. Dans notre étude, l'identification de souches identiques dans les prélèvements de poussières de cages lors des deux secondes campagnes élevées dans les mêmes bâtiments d'élevages est probablement l'illustration de cette difficulté à nettoyer efficacement les cages. L'étude de Garber et al. (2003) rapporte que le nettoyage désinfectant efficace des cages, du plafond et des murs comparé à un simple dépoussiérage apparaît comme protecteur contre la contamination des poules par *Salmonella* Enteritidis.

## **4.2. Potentielle contribution des salmonelles aviaires aux cas de salmonelloses humaines et les différents clones circulants**

### **4.2.1. Analyse globale des PCR et de la PFGE**

Dans notre étude, la technique d'amplification génique ERIC-PCR s'est montrée assez efficace pour une première classification clonale notamment pour certaines souches telles que *S. Enteritidis*, et *S. Manhattan*. En fait, c'est une technique sensible qui présente l'avantage d'être simple, rapide et moins coûteuse comparée à d'autres techniques génotypiques. Kumao et al. (2002) ont rapporté que la technique ERIC-PCR pourrait être intéressante pour le typage intrasérotypique des souches de salmonelles et la recommande, comme étant une méthode de première ligne pour la détection des épidémies. L'IS-PCR semble plus discriminante que l'ERIC-PCR. Ce résultat a déjà été rapporté par Millemann et al. (1998), qui ont démontré que l'IS-PCR pourrait constituer un marqueur supplémentaire pour les études épidémiologiques des infections à *Salmonella*.

La PFGE apparaît par contre bien plus discriminante pour l'ensemble de nos isolats, en concordance avec les différents profils phénotypiques d'antibiorésistances. Le pulstypage est un outil de référence, très efficace, et largement recommandé pour différencier les souches de *Salmonella* (Threlfall et al., 1994) grâce à son pouvoir discriminant lors des investigations épidémiologiques (Tenover et al., 1995 ; Liebana et al., 2001 ; Lailler et al., 2002 ; Liebana et al., 2002).

#### 4.2.2. Analyse et comparaison des profils génotypiques des souches isolées selon le sérotype et l'origine de l'isolement

- (i) ***S. Typhimurium* et les variants monophasiques et immobiles « Typhimurium like »** : La PFGE appliquée à un échantillon représentatif de 37 souches humaines de *S. Typhimurium*, l'unique souche aviaire, mais aussi les 5 variants monophasiques et immobiles du serovar Typhimurium a généré 8 profils différents répartis en 4 clusters (A-D), présentant cependant un degré de similarité  $\geq 80\%$ . (Figure 9 et 10). La PFGE semble peu discriminante pour nos souches humaines, en accord avec les profils d'antibiorésistance trouvés, et qui sont très proches, ne différant que par 1, 2, voire seulement 3 antibiotiques testés chez les souches humaines. Il est évident que notre résultat démontre le caractère clonal, et persistant des souches de ce sérotype notamment chez les souches humaines. Ceci semble également être confirmé par les analyses ERIC et IS-PCR des souches de *S. Typhimurium* isolées des cas humains, la souche aviaire, mais aussi les 5 variants « Typhimurium-like ». Tous ces isolats n'ont présenté qu'un seul profil en ERIC (I), comme en IS (A).

Ce caractère clonal de nos souches de *S. Typhimurium* est appuyé par le pouvoir de discrimination de la PFGE pour le typage de *S. Typhimurium*, déjà rapporté dans différents travaux (Baggesen et Aarestrup, 1998 ; Kariuki et al., 1999 ; Malorny et al., 2001). Les études menées par Martinez-Urtaza et al. (2004) et plus récemment Kerouanton et al. (2007) avaient démontré la diversité et l'hétérogénéité de ce sérotype. En effet, Kerouanton et al. (2007) ont identifié 46 profils différents parmi un panel de 135 souches testées ( $D=0.85$ ). Concernant nos souches, il est à savoir que la plupart des souches proviennent d'un milieu hospitalier et cela explique la forte homogénéité des souches. Par ailleurs, les 34 isolats qui sont d'origine humaine et l'unique souche aviaire, présentent un pourcentage de similarité génétique de 90% (Cluster A). Il est fort probable que ça soit des souches du même clone, circulant dans cette partie de l'Algérie. Cependant, le profil d'antibiorésistance des souches humaines est par contre totalement différent du profil d'antibiorésistance de la souche aviaire, et cela pourrait être dû à la pression de sélection associée aux traitements antibiotiques dans le milieu hospitalier. Dans notre étude, Les souches humaines de *S. Typhimurium* appartenant au profil STMXB007 ont montré un très haut niveau de résistance aux antibiotiques, 27 souches parmi les 38 souches étaient résistants à plus de 20 antibiotiques testés incluant les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération. Ces souches correspondent probablement au lysotype DT104, qui posent d'énormes soucis de santé publique à travers le monde (Cloeckaert et al., 2001). Récemment, dans plusieurs études, le profil STMXB007 a été associé au lysotype DT104 de *Salmonella Typhimurium* en France (Weill et al., 2006), mais également au lysotype U302. Ce même profil STMXB007 a été également observé chez des souches de *Salmonella Typhimurium* DT104 dans 7 pays Européens (Gatto et al., 2006). Notre enquête épidémiologique a permis de constater que ce

clone multi-résistant du sérotype Typhimurium avait causé des épisodes épidémiques assez sévères dans le service pédiatrique d'Annaba, provoquant des échecs thérapeutiques qui se sont malheureusement soldés par 11 décès de jeunes nourrissons. Malheureusement, aucune source commune sur l'origine de cette contamination n'a été identifiée. Plusieurs études ont démontré la persistance clonale de certaines souches dans une région précise, notamment dans un service hospitalier et pendant de longues périodes (Virgin et al., 2002 ; Mammina et al., 2003 ; Naas et al., 2011). Dans notre étude, la persistance de ce clone chez les cas humains nous conforte dans l'hypothèse que la contamination et la présence de ce clone dans l'élevage de poules pourrait provenir d'un contact humain, qui est également considéré comme un réservoir potentiel de contamination. En effet, Kariuki et al (2006) ont démontré le portage humain des *Salmonella* spp comme forte possibilité de source de contamination et de diffusion dans les élevages en Afrique sub-saharienne.

Les 3 autres isolats humains de *S. Typhimurium* ont présenté 3 profils différents (STMXB0150, STMXB0151 et STMXB0152) appartenant à 3 clusters dont le pourcentage de similarité reste très élevé, respectivement de 84% et 80%. Cela pourrait nous laisser supposer soit, que les souches provenaient d'autres sources, et de ce fait démontrer la diversité des réservoirs de contamination des souches de *S. Typhimurium* (Humphrey, 2000), soit, que c'est le même clone circulant, et qu'il a juste un peu évolué dans l'environnement où il se trouve.

D'autre part, nous avons comparé nos profils PFGE de *S. Typhimurium* souche par souche, à plus de 400 souches de *S. Typhimurium* stockées dans la base de données de l'unité CEB, afin d'avoir une idée sur les différents profils, de leurs origines, et leurs propagations supposées à travers la France et certains pays voisins. Le profil STMXB0077 est le profil majoritaire dans la base de données, déjà rencontré et isolé de sources variées (homme, volailles...). Cependant, les 6 profils STMXB0146, STMXB0147, STMXB0148, STMXB0150, STMXB0151, et STMXB0152 sont nouveaux, et n'ont jamais été observés dans la base de données de l'unité CEB.

Cela montre le large éventail des clones appartenant au sérotype Typhimurium.

- (ii) **S. Enteritidis** : Dans cette étude, les 12 souches humaines et aviaires de *S. Enteritidis* étudiées ont présenté 6 profils différents (SENTXB0001, SENTXB0025, SENTXB0033, SENTXB0046, SENTXB0047, et SENTXB0048) de PFGE réparties en 3 clusters bien distincts (A-C), 2 profils (II et III) en ERIC-PCR, et 3 profils (A, B, et C) en IS-PCR. La technique PFGE semble discriminante pour ce sérotype contrairement à d'autres études, qui ont rapporté le caractère clonal, et les limites de la diversité génotypique des souches de ce sérotype (Pang et al., 2007). En effet, précédemment, Thang et al. (1995), avaient trouvé que 29 souches de *S. Enteritidis* parmi les 32 isolées de cas d'infections sporadiques mais surtout sans aucun lien épidémiologique, présentaient un seul et

même profil PFGE, et cela en utilisant 3 enzymes de restriction différents. Plus récemment, Pang et al. (2005) rapportaient également que sur les 124 souches de *S. Enteritidis* isolées en Taiwan à différentes périodes, 84 entre elles présentaient un seul profil X3S3N3, avec un total de seulement 21 profils différents.

Dans notre étude, le cluster A avec 8 isolats comprenait 4 profils PFGE différents avec un pourcentage de similarité génétique de 90%, et dont le profil SENTXB0001 était majoritaire. Ce profil XB0001 a été retrouvé aussi bien parmi des souches humaines que celles isolées d'élevage de poules pondeuses. Nous pouvons dire après comparaison, qu'il est probable que ce soient des souches du même clone circulant dans ce même territoire, et cela nous laisse même supposer que la source de contamination humaine pourrait être aviaire. Cette hypothèse est confortée par le fait que les souches aviaires et humaines avaient le même profil multi-sensible d'antibiorésistance.

En effet, Guard-Petter. (2001) rapportent que les plus grands réservoirs de *S. Enteritidis* responsables des infections humaines sont les œufs de consommation et les viandes de volailles. Par ailleurs, et dans ce même cluster A, il y avait 2 autres profils PFGE différents (XB0033, et XB0046) appartenant à 2 souches humaines. Ces profils étaient en accord avec les profils phénotypiques multi-résistants, et un profil différent IS (profil C) pour le profil PFGE XB0046. Ceci dit, ces résultats n'excluent pas l'hypothèse de clonalité puisque il est bien connu que les bactéries ont la capacité d'acquérir des gènes de résistance de manière naturelle ou sous pression de sélection de traitements antibiotiques, notamment en milieu hospitalier (Cloekaert et al., 2001). D'un autre côté, dans notre travail, 3 souches humaines ont présenté 2 profils différents (SENTXB0047 et SENTXB0048), appartenant à 2 clusters bien distincts (B et C), et dont le pourcentage de similarité est de 57%. Ce résultat s'accorde avec les profils d'antibiorésistance trouvés, et ceux d'ERIC et IS-PCR, avec respectivement 2 profils différents. Malheureusement, le peu nombre de souches ne nous permet pas de tirer des conclusions sur les sources alimentaires d'infections.

**(iii) S. Manhattan :** Les deux souches aviaire et humaine présentaient 2 profils PFGE différents (SMNHXB0004, et SMNHXB0006), avec un pourcentage de similarité de 80%. Les méthodes ERIC et IS-PCR semblent également très discriminantes pour ces deux isolats, avec 2 profils ERIC (X et XI), et 2 profils IS (J et K). Les 3 méthodes séparent clairement les souches selon leurs origines, laissant supposer l'appartenance à deux lignées clonales bien distincts, et à priori deux origines différentes. Le pouvoir discriminant de ces 3 méthodes pour ces 2 souches appartenant à ce sérovar écarte la possibilité de liens épidémiologiques possible entre elles et démontre encore une fois la diversité des sources de contamination et d'infections par les différents serotypes de *Salmonella*. spp.

**(iv) S. Virchow :** Les 2 souches aviaires isolées du même bâtiment pendant deux bandes successives, et celle d'origine humaine ont présenté les mêmes profils PFGE (SVIRXB0042), ERIC (IX), IS (J). Cependant, les profils de résistance aux antibiotiques sont différents selon l'origine. Ce dernier pourrait être expliqué par

l'acquisition de la souche humaine des gènes de résistance déjà prouvée dans beaucoup de travaux (Cloekaert et al., 2001). Ce profil identique entre 2 bandes successives de pondeuses prouve la persistance de ce clone. La persistance d'un clone dans le bâtiment d'élevage peut être expliquée d'une part, par la présence d'un réservoir pour la maintenance et la dissémination de la contamination, notamment les rongeurs, et d'autre part liée à la décontamination inadéquate du bâtiment d'élevage entre les deux bandes successives. Plusieurs auteurs ont rapporté que certains serovars pourraient persister dans un élevage jusqu'à 24 mois (Skov et al., 1999). Sur la base de nos résultats obtenus concernant la présence de ce même clone chez l'humain, l'hypothèse de dissémination des souches de ce clone XB0042 aux consommateurs peut être supposée. Malheureusement, elle ne pourra pas être renforcée par le faible nombre de souches comparées, ainsi que le faible pouvoir discriminant de ce sérotype (Kerouanton et al., 2007).

- (v) **S. Dublin** : Les 2 souches humaine et aviaire isolées et identifiées présentent le même profil SDUBXB0001, le même profil ERIC (VIII), IS (I), et le même profil de résistance aux antibiotiques. Il est probable que ce soient des souches du même clone, circulant dans cette région du territoire Algérien et contaminant différents secteurs.

La similarité génétique de ce sérotype entre les deux isolats d'origine aviaire et humaine doit être interprétée avec précaution, car d'une part, nous n'avons eu que deux souches pour cette comparaison, et de ce fait, il serait hâtif d'en tirer des conclusions sur l'éventuel lien épidémiologique. D'autre part, ce sérovar n'est pas du tout commun chez la volaille, d'autant plus que son isolement est à partir de prélèvements d'eau. Cela pourrait juste suggérer une contamination de l'environnement et particulièrement des autres espèces animales qui ont libre accès à l'élevage (Bovins, ovins, et rats), ou même une contamination humaine déjà évoqué dans la première partie de cette thèse.

- (vi) **S. Hadar** : Les 3 souches aviaires de *S. Hadar* isolées du même bâtiment ont présenté 2 profils PFGE bien distincts (SHADXB0003 et SHADXB0019) avec un pourcentage de similarité de 79%, et qui sont en harmonie avec les 2 profils différents d'antibiorésistance. Cependant, l'ERIC et IS-PCR semblent ne pas être discriminantes pour ce sérotype avec 1 même profil en ERIC (VI) et comme pour l'IS-PCR (G). La technique PFGE semble être discriminante pour ce sérovar, en accord avec de précédentes études (Weide-Botjes et al., 1998b ; Valdezate et al., 2000), cependant en désaccord avec l'étude d'Elgroud et al. (2009) qui a démontré les limites en termes de discrimination de cette technique pour ce sérotype. Kerouanton et al. (2007) avaient calculé son pouvoir discriminant avec ID à 0.7, et démontré ainsi son caractère clonal parmi les différentes sources (humaine, alimentaire, et écosystème). Notre résultat semble démontrer l'appartenance des 3 souches à deux lignées clonales distinctes, confortant l'hypothèse d'une seconde contamination du bâtiment. Cette hypothèse pourrait être appuyée par les conditions d'hygiène déplorable du bâtiment constatées lors

des deux visites du bâtiment. Egalement, la présence d'un autre sérovar ainsi que le taux élevé de mortalité qui avait obligé l'éleveur à la réforme de ses pondeuses à 64 semaines. Par ailleurs, la comparaison de nos profils avec ceux de la banque de données de l'unité CEB de l'ANSES, notamment avec les 24 souches de ce sérovar recueillies par Elgroud et al. (2009), lors d'une enquête similaire dans la région de Constantine a démontré le caractère clonal du profil XB0003 dans ces régions de l'Algérie.

- (vii) **S. Kentucky** : Nos 3 souches isolées ont présenté le même profil PFGE SKENXB0008, le même profil ERIC (VI), le même profil IS (E), et le même profil d'antibiorésistance CIP<sup>R</sup> (MIC<sub>50</sub> ≥ 8 mg/L). Ce sont 3 souches isolées à la même période, dans 3 bâtiments différents. Il est probable que ce soient des souches du même clone, circulant au même moment dans un territoire donné, d'autant plus que ce serotype est rarement isolé en territoire Algérien (Aboun et al., 2003 ; Bouzitouna-Bentchouala, 2006). Il pourrait avoir été importé légalement ou illégalement de pays d'Afrique avec les aliments ou les poussins d'un jour. En effet, entre 2005-2009, ce clone de *S. Kentucky* CIP<sup>R</sup> a été identifié en filière volaille, dinde, et environnement, d'isolats en provenance de certains pays d'Afrique; 20 souches ont été isolées de la viande de dinde et d'eau au Maroc entre 2007-2008, 2 isolés en France de produits importés d'Afrique du nord et 2 isolats de volaille (1 d'Ethiopie et 1 du Togo en 2009) (Simon le Hello et al., 2010). Cette fréquence d'isolement pourrait suggérer que les élevages aviaires sont le réservoir de dissémination de ce clone dans différents pays (Simon le Hello et al., 2010), hypothèse d'autant plus plausible que la volaille constitue une importante source de protéines dans ces pays d'Afrique, particulièrement dans les pays musulmans, avec l'intensification du développement de cette filière (Speedy, 2003 ; FAO, 2009). Durant nos 2 années d'étude, et selon notre connaissance aucun isolement humain n'a été identifié. Cependant, la présence de cas humains pendant cette période n'est pas à exclure. Il convient de mentionner que de nombreux cas humains de salmonelloses non typhoïdiques peuvent ne pas être identifiés car les malades n'estiment pas la nécessité de consulter un médecin pour un syndrome diarrhéique. Voetsch et al. (2004), avaient estimé que pour chaque cas confirmé de *Salmonella* au laboratoire, il y a 38 cas qui seront systématiquement oubliés par absence de surveillance ou non identification au laboratoire.

Par ailleurs, en France, parmi les 111 cas humains infectés par *Salmonella* Kentucky CIP<sup>R</sup> entre 2006-2009, 9 cas ont été isolés chez des patients en provenance d'Algérie (Simon le Hello et al., 2010). Cela nous conforte dans l'hypothèse de la présence de ce clone sur le territoire national. D'un autre côté, notre hypothèse d'un lien clonal avec ces souches d'Afrique est renforcée par le fait que nos souches *S. Kentucky* CIP<sup>R</sup> comparées dans la base de données de l'ANSES avec celles en provenance d'Ethiopie présentent un pourcentage de similarité génétique de 89%. Ces liens génétiques peuvent donc suggérer fortement des liens épidémiologiques entre les différentes souches de ce clone.

### 4.3. Etude de l'émergence de la résistance aux antibiotiques parmi les souches humaines isolées de *Salmonella*

#### 4.3.1. Emergence des souches humaines de *Salmonella* productrice de $\beta$ -lactamases à spectre élargi type CTX-M

Le genre *Salmonella* appartient au groupe d'Entérobactéries qui sont dépourvues de bêtalactamases, et de ce fait, elles sont naturellement sensibles à toutes les bêta-lactamines. En général, 90% des souches de *Salmonella* sont de phénotype sauvage tout en présentant une grande disparité selon les sérotypes. Cependant, on observe ces dernières années une grande acquisition de résistance aux antibiotiques chez les souches de *Salmonella*. Cette acquisition est due à plusieurs plasmides, leur conférant ainsi des multi résistances. Dans notre étude, 50 souches (74.6%) parmi les 67 souches recueillies étaient productrices de bêta lactamases à spectre élargi (BLSE). Les gènes *bla* CTX-M, *bla* TEM, et *bla* SHV ont été identifiés chez respectivement 50, 35, et 1 de nos souches de *Salmonella*. La prédominance des BLSE type CTX-M dans nos souches pourrait être le résultat de la dissémination de ce clone dans les différents services et CHU de la région. La circulation des patients entre différentes unités d'un même hôpital mais aussi entre hôpitaux, sur une échelle régionale voire nationale, peut contribuer à la diffusion de ce profil de résistance. D'un autre côté, la distribution de ces BLSE en fonction des services place la néonatalogie en tête de tous ces services hospitaliers. En Algérie, peu de travaux bien documentés sur les BLSE, particulièrement pour les salmonelles sont publiés. Cependant, le réseau national (AARN) a rapporté pour l'année 2005 un taux de BLSE chez les salmonelles de 59.7%. Par ailleurs, et chez les Entérobactéries, les quelques données rapportées montrent en général un niveau élevé, allant de 20 à 45% (Ramdani-Bougoussa et al., 2001 ; Amazian et al., 2006). En 2006, les données du réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques sur des souches de ; *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Enterobacter sp*, *S. marcescens*, *Salmonella* spp collectées à partir de 18 hôpitaux, ont montré que la prévalence globale était de 22% avec respectivement ; 40,9%, 10%, 21,8%, 34,6%, 41% et 4,8% ([www.ands.dz / aam / index.htm](http://www.ands.dz/aam/index.htm)) de souches porteuses d'une bêta-lactamase à spectre élargi. Dans le monde, le groupe d'enzymes CTX-M a émergé dans les années 1980, peu après l'introduction du céfotaxime dans les pratiques cliniques. Depuis lors, une large diffusion des souches bactériennes porteuses de ces enzymes a eu lieu, et a conduit à plusieurs épidémies dans les hôpitaux mais aussi dans les cas communautaires (Arlet et al., 2006). Durant les dernières années, le taux de souches de *S. enterica* productrice de BLSE a augmenté considérablement à travers le monde (Miriagou et al., 2004 ; Weill et al., 2004 ; Moubareck et al., 2005), notamment dans les pays d'Afrique du nord (AitMhand et al., 2001 ; Bouallège-Godet et al., 2005). Dans la présente étude, le taux de prévalence de BLSE dans nos hôpitaux (74.6%) est plus élevé que celui rapporté à l'échelle nationale chez les Entérobactéries (25.7%) (Amazian et al., 2006), mais aussi plus élevé que celui enregistré chez *Salmonella* spp. par le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (4.8%).

Il est également plus élevé que ceux déjà rapportés chez *Salmonella* spp. en Taiwan (1.5%) (Li et al., 2005 ; Su et al., 2005), aux Etats Unis (1.9%) (Dunne et al., 2002), en Amérique

latine (2.4%) (Winokur et al., 2001), et en Europe (0.8%) (Winokur et al., 2001). Cependant, ce chiffre (74.6%) est majoré, compte tenu du contexte épidémiologique du service pédiatrique de la wilaya d'Annaba. La variation géographique de la prévalence des BLSE peut être expliquée par plusieurs éléments : nous citerons en premier, la variabilité des facteurs épidémiologiques. Deuxièmement, la politique d'utilisation des antibiotiques aussi bien hospitalière que communautaire, et enfin les mesures d'hygiène hospitalière entre les différentes institutions. D'un autre côté, la tendance évolutive des souches productrices des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu dans les pays industrialisés est vers la régression. Cela est attribué à l'instauration des programmes de lutte contre les infections nosocomiales et les campagnes de promotion d'un usage prudent des antibiotiques. Effectivement, en Europe, le taux est passé de 23% en 1997 à 13% en 2002 (Turner, 2005). En revanche, dans notre pays, comme dans la plupart des pays en voie de développement, la fréquence des souches BLSE tend à augmenter. Dans notre étude, une seule souche de *Salmonella* était porteuse, en plus du gène *bla*<sub>CTX-M</sub>, du gène BLSE type *bla*<sub>SHV</sub>. La première souche bactérienne productrice de bêta lactamase type SHV-2 isolée dans les pays du Maghreb était *Salmonella* Wien. Cette souche a été isolée en Tunisie en 1988, plus précisément à l'hôpital de Sfax ; et elle était responsable d'une épidémie de gastroentérite dans le service de néonatalogie (Hammami al., 2001). Par ailleurs, si la co-présence de gènes BLSE n'est pas une nouvelle découverte, mais reste cependant assez rare.

Dans le rapport britannique de la première description de *bla*<sub>CTX-M-13</sub> et *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, ces gènes ont été identifiés de pair avec les gènes *bla*<sub>SHV-12</sub> ou *bla*<sub>SHV-11</sub>, dans 5 souches parmi les 12 souches de *E. coli*, *K. pneumoniae* et *E. cloacae*, BLSE type CTX-M (Munday et al., 2004).

Le séquençage appliqué à un échantillon représentatif de 26 souches productrices d'enzyme type CTX-M nous a permis d'identifier le groupe CTX-M-15 chez 24 souches de *Salmonella*, et le groupe CTX-M-1 chez seulement 2 isolats. Actuellement la famille BLSE type CTX-M comprend au moins 40 enzymes divisées en 6 groupes (Bonnet, 2004), et jusqu'à récemment seuls CTX-M-1, CTX-M-2, et CTX-M-9 ont été décrits chez *Salmonella* spp. (Mariagou et al., 2004). Cependant, ces dernières années, plusieurs foyers sporadiques de *Salmonella* productrices de BLSE impliquant CTX-M-15 ont été signalés dans plusieurs pays du monde (Batchelor et al., 2005 ; Moubareck et al., 2005 ; Morris et al., 2006 ; Kim et al., 2007), qu'il soient dus à des souches hospitalières ou communautaires (Bonnet, 2004 ; Canton et Coque, 2006 ; Lavollay et al., 2006 ; Livermore et Woodford, 2006). Le groupe CTX-M-15 a été déjà rapporté chez *S. Typhimurium* (Moubarek et al., 2005), Corvallis (Archambault et al., 2006), et Kentucky (Weill et al., 2004). En Algérie, Touati et al. (2008) ont également identifié le groupe CTX-M-15 chez des souches de *Salmonella* Kedougou isolées à l'hôpital de Béjaia située aussi dans la région Est d'Algérie. Il a été également identifié chez d'autres souches d'Entérobactéries dans différentes régions du Centre et de l'Est Algérien (Messai et al., 2006 ; Ramdani-Bouguessa et al., 2006 ; Touati et al., 2008 ; Iabadene et al., 2008).



Par le passé, les souches productrices de bêta lactamases type CTX-M-15 étaient presque exclusivement les souches d'*Escherichia coli* et *Klebsiella* spp. Au Royaume-Uni et dans d'autres pays européens, elles étaient l'une des préoccupations majeures pour de nombreux microbiologistes cliniques et d'experts en maladies infectieuses (Livermore & Hawkey, 2005) ; elles sont associées à la résistance à plusieurs antibiotiques utilisés en cliniques, ainsi qu'à la propagation rapide de cette résistance.

#### **4.3.2. Emergence des souches de *Salmonella* productrices d'une méthylase type ArmA**

Parmi les souches humaines de *Salmonella*, le gène *armA* a été détecté dans 14 souches hautement résistantes aux 3 aminosides testés (kanamycine, streptomycine, et gentamicine), et dans 4 souches avec un haut niveau de résistance à la kanamycine et la gentamicine, mais sensibles à la streptomycine. Ce résultat est en accord avec l'étude de Liou et al. (2006), qui rapporte que les gènes codant les méthylases confèrent aux souches bactériennes de hauts niveaux de résistance à la plupart des aminoglycosides utilisés en clinique humaine, excepté la streptomycine. Depuis la première découverte du gène *armA* chez *Klebsiella pneumoniae*, isolée chez un patient français en 2000 (Galimand et al., 2003), la diffusion de ce gène dans plusieurs espèces d'Entérobactéries a été rapportée dans plusieurs pays européens (Galimand et al., 2005), mais particulièrement dans les pays du sud-est de l'Asie (Yan et al., 2004 ; Yamane et al., 2005 ; Lee et al., 2006). Ce gène a été également détecté dans une souche porcine d'*Escherichia coli* (Gonzalez-Zorn et al., 2005), et plus récemment, en février 2009 dans une souche de *Salmonella* isolée de la viande de volaille (Granier et al., 2011). Cette découverte dans des isolats d'origine animale pose la problématique d'une origine animale de la dissémination de ces méthylases et impose ainsi une plus ample surveillance vétérinaire (Gonzalez-Zorn et al., 2005).

Dans notre étude, 11 souches ont été prélevées d'échantillons de coproculture provenant de 11 nourrissons âgés entre 8 jours et 30 semaines, admis dans le service de néonatalogie de la clinique pédiatrique de la wilaya d'Annaba, et dont ces infections ont causé le décès de 10 des 11 nourrissons. D'un autre côté, le gène *armA* a été également détecté chez 2 enfants âgés entre 12 et 24 mois, hospitalisés dans le service pédiatrique de la même clinique, et chez 4 adultes âgés entre 15-50 ans dont 2 cas ambulatoires. Enfin, une dernière souche de *Salmonella armA*-positive a été isolée chez un patient dont les données épidémiologiques n'étaient malheureusement pas disponibles. Par ailleurs, nos 18 souches de *Salmonella armA*-positive isolées ont été trouvées coproductrices d'une BLSE de type CTX-M-15, 13 parmi elles étaient également productrice d'une pénicillinase TEM, ainsi qu'une céphalosporinase type CMY. A notre connaissance, c'est le premier rapport documenté sur un épisode épidémique dans les hôpitaux d'Annaba impliquant directement une sous-espèce de *Salmonella enterica*, co-productrice d'une enzyme type méthylase 16S rRNA et d'une bêta lactamase type CTX-M-15.

La présence, ainsi que la co-localisation du gène *armA* avec une BLSE type CTX-M dans des souches cliniques d'Entérobactéries isolées dans des hôpitaux Algériens a déjà été rapportée dans 2 précédentes études. En effet, l'étude de Bogearts et al. (2007) a montré que parmi les 18 souches cliniques d'*E.coli armA*-positives identifiées chez des patients hospitalisés à

l'hôpital ERASME en Belgique, 4 d'entre elles étaient isolées chez des citoyens Algériens avec des pathologies médicales sévères. Avant d'être transférés en Belgique, ces 4 patients Algériens avaient séjourné dans plusieurs hôpitaux Algériens. En outre, Naas et al. (2009) ont détecté le gène *armA* dans une souche de *Salmonella* Senftenberg, qui a été isolée en 1998 chez un nouveau né hospitalisé dans le service de néonatalogie du centre hospitalo-universitaire de Constantine. Ce gène *armA* a été retrouvé sur le même plasmide conjugatif de 90kb appartenant au groupe d'incompatibilité IncL/M hébergeant également les gènes *bla* CTX-M-3, et *bla* TEM-1 (Naas et al., 2009). Plus récemment, entre septembre 2008 et janvier 2009, et dans ce même service de néonatalogie de Constantine, l'équipe de Naas et al, avait identifié, le gène *armA* dans un autre sérovar de *Salmonella*, *Salmonella* Infantis porteur aussi des gènes *bla* CTX-M-15 et *bla* TEM-1. Ce sérovar avait provoqué un foyer épidémique dans le service de néonatalogie chez 138 patients. Il est à préciser que 12 ans plus tard, ce même plasmide est encore présent dans ce service de néonatalogie, et le CTX-M-3 a évolué en CTX-M-15, conférant ainsi une plus haute résistance à la céftazidime (Naas et al., 2011). Nous pouvons dire que le gène *armA* est bien présent dans nos hôpitaux, ce qui témoigne d'une dissémination régionale voire nationale d'un plasmide portant plusieurs gènes de résistance. Plusieurs études ont montré que souvent les gènes de méthylases sont liés à d'autres gènes de résistances tels que *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, et *bla*<sub>OXA</sub> (Doi et al., 2004 ; Galimand et al., 2003 ; 2008 ; Kim et al., 2008 ; Yan et al., 2004 ; Doi et al., 2008). Galimand et al. (2005) ont montré que le gène *armA* se situe au sein d'un transposon composite *Tn1548*. Ce transposon se trouve sur un plasmide conjugatif piP1204 appartenant au groupe d'incompatibilité IncL/M codant ainsi une bêta-lactamase à spectre élargi de type CTX-M-3 et une pénicillinase TEM-1 (Galimand et al., 2005 ; Bogaerts et al., 2007).

D'un autre coté, les liens de clonalité de nos souches de *Salmonella armA*-positives ont été évalués par le typage moléculaire. L'analyse par PFGE des 13 souches *armA* appartenant au sérotype Typhimurium, et la souche du variant monophasique (*S.* 4, 12 :- :1,2) a révélé uniquement 2 profils étroitement liés avec un pourcentage de similarité génétique de 80%. Ceci pourrait suggérer que ces souches appartiennent à la même lignée clonale et que la diffusion dans l'hôpital d'Annaba est épidémique. Par contre, l'analyse électrophorétique des 4 souches *armA*-positive appartenant au sérotype Enteritidis a identifié 3 profils bien distincts. Ce résultat indique que le gène *armA* s'est propagé par un transfert horizontal dans la région d'Annaba. Malheureusement aucune donnée épidémiologique sur les antécédents pathologiques des 18 patients, sources d'acquisition de l'infection n'étaient disponibles sur les registres des services concernés.

## 5. Conclusions générales

Le but général de ce projet de thèse était d'étudier la fréquence de contamination des élevages de poules pondeuses par *Salmonella* dans deux régions voisines d'Annaba et Eltarf, et d'évaluer l'éventuelle contribution des souches aviaires aux cas de salmonelloses humaines par le typage moléculaire.

De manière globale, cette étude nous a fourni les premières données expérimentales sur l'épidémiologie de l'infection des élevages de poules pondeuses par *Salmonella* spp dans ces deux régions et amélioré nos connaissances sur les sérovars prédominants dans les élevages de poules pondeuses dans ces 2 wilayas, mais également donné quelques informations sur les indicateurs de risque qui pourront éventuellement être potentiellement liés à la contamination aux salmonelles. A notre connaissance, c'est une des seules études rapportées à ce jour sur une comparaison phénotypique et génotypique entre les souches aviaires et humaines isolées dans des régions algériennes, pouvant ainsi laisser supposer des liens épidémiologiques entre des isolats d'élevages de pondeuses et leur éventuel impact sur la santé humaine.

Les résultats de cette étude ont montré que huit élevages ont été testés positifs parmi les 18 élevages échantillonnés, et que l'âge des pondeuses affecte cette fréquence de contamination par *Salmonella*. Ce travail nous a montré aussi que, malgré l'étendue de notre protocole d'échantillonnage (3 pools de fientes, 2 pools de prélèvements de poussières et surfaces, 2 pools de prélèvements d'aliments et eau), la proportion d'échantillons positifs est restée très faible (19/2754). De ce fait, les résultats fournis par cette étude peuvent contribuer à établir des bases quantifiées pour définir les schémas de prélèvements optimums combinant une bonne sensibilité de détection de *Salmonella* et un coût maîtrisé.

Il a ensuite été montré l'hétérogénéité des sérovars identifiés durant cette enquête, à savoir 9 sérovars parmi seulement 19 isolats de *Salmonella*, et une faible proportion d'isolats résistants aux antibiotiques. Cette dernière pourrait suggérer un usage modéré d'antibiotiques dans les élevages de pondeuses dans ces deux régions. Cette étude a rapporté également à notre connaissance le premier isolement de *S. Kentucky* résistante à la ciprofloxacine (CMI  $\geq$  8mg/L) dans les élevages de pondeuses en Algérie. Cet isolement coïncidait avec l'émergence de ce clone résistante à la ciprofloxacine dans d'autres pays d'Afrique, notamment ceux de l'Afrique du nord. Cependant, le nombre réduit des isolats qui est probablement dû à la limitation de la zone étudiée ne nous permet pas d'évaluer le potentiel d'introduction de ce clone de *S. Kentucky* résistante à la ciprofloxacine à l'échelle nationale.

Six indicateurs de risque ont été identifiés. La plupart d'eux ont déjà été rapportés comme étant des facteurs de risques potentiellement liés à la contamination des élevages de pondeuses par *Salmonella*. Ces facteurs sont justifiés par les bonnes pratiques d'élevages, et de la décontamination des bâtiments.

A l'avenir, ces premiers résultats peuvent être utilisés comme base pour des études épidémiologiques nationales visant à déterminer tous les facteurs de risques pouvant être en cause de la contamination des élevages de pondeuses par *Salmonella* spp. Par ailleurs, une

réflexion globale devrait être menée avec les éleveurs afin de les sensibiliser et d'envisager des améliorations des pratiques de biosécurité dans les élevages aviaires.

Le typage moléculaire des souches de *Salmonella* spp isolées des élevages de poules, et celles recueillies de cas humains a été un point clé de notre travail, afin de démontrer des liens génétiques entre les différentes souches au sein de certains sérovars. Les méthodes choisies ont été ; IS-PCR, ERIC-PCR, et la PFGE. Le caractère clonal du séovar *S. Typhimurium* démontré autour d'un nombre important d'isolats laisse suggérer un caractère épidémique de ce clone dans notre région tout particulièrement en milieu hospitalier, et laisse envisager une large diffusion. La clonalité de certains serovars (*Enteritidis*, *Virchow*, *Dublin*) nous laisse supposer d'éventuelles hypothèses de diffusion de certaines souches de *Salmonella* entre les élevages et les consommateurs, mais aussi des hypothèses de persistance d'autres serovars au sein de certains bâtiments d'élevages. Cependant, le faible nombre de souches comparées ne nous permet pas d'étayer des liens épidémiologiques sur les sources de contamination entre les 2 origines des isolats. Par ailleurs, l'introduction à l'échelle régionale du clone *S. Kentucky* CIP<sup>R</sup>, nous laisse envisager une large introduction de ce même clone à une échelle nationale. Egalement, l'hétérogénéité d'autres serotypes (*Manhattan*, *Enteritidis*, *Hadar*) nous suggère d'autres sources de contamination, et les éventuelles doubles contaminations au sein d'un même élevage. A l'avenir, il serait intéressant de réaliser une étude épidémiologique à l'échelle nationale impliquant la majorité des régions du pays, et sur une banque de souches assez importante en humaine et en aviaire qui permettrait ainsi d'estimer l'importance de certains clones aviaires isolés et leur impact dans des infections humaines à *Salmonella*.

L'émergence du groupe bêta-lactamase type CTX-M-15, mais aussi la méthylase type *ArmA* parmi nos souches humaines de *Salmonella*, mais aussi sa présence démontrée dans d'autres régions du pays est une préoccupation de santé publique en Algérie. Cela pourrait indiquer la dissémination de ces groupes à travers le pays, et qui pourrait devenir endémique. Cette propagation clonale peut être due à des transferts génétiques mobiles, bien qu'aucune expérience d'analyse plasmidiques n'a été réalisée pour nos isolats. A l'échelle mondiale, les suppositions de transferts plasmidiques ont été largement rapportées dans la littérature. La diffusion épidémique des souches de *Salmonella* productrices de bêta-lactamases, mais également de méthylases type *armA* est encore mal contrôlée dans nos hôpitaux. Leurs taux élevés de présence sont le reflet de la transmission croisée entre les bactéries et de l'absence d'une politique de bon usage d'antibiotiques, que ce soit dans les services hospitaliers, ou dans les cas communautaires. A l'avenir la mise en œuvre d'une politique stricte de contrôle dans les hôpitaux Algériens ainsi que des enquêtes de sensibilisation auprès de la communauté est de rigueur afin d'éviter la diffusion de ces souches multi résistantes. En effet, une part non négligeable de la consommation des antibiotiques se fait en dehors du milieu hospitalier.

En Espagne, il a été rapporté en 1997 qu'il ya eu une consommation de 275 tonnes d'agents antimicrobiens par les patients en ambulatoire. Par ailleurs, il est à préciser que parmi les causes de l'émergence et la dissémination des éléments de résistance chez les Entérobactéries en milieu communautaire, est l'utilisation excessive d'antibiotiques joue un rôle non

seulement en médecine humaine mais aussi en médecine animale et en agriculture notamment comme facteurs de croissance.

## 6. Références bibliographiques

1. Aarestrup, F. M. (1998b). Association between decreased susceptibility to a new antibiotic for treatment of human disease, evernimycin (sch 27899), and resistance to an antibiotic used for growth promotion in animals, avilamycin. *Microb Drug Resist* 4(2): 137-141.
2. Aarestrup, F., H. Wegener, and P. Collignon. 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 6:733-750.
3. Aarts, H.J., Van Lith, L.A., and Keijer, J. 1998. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett Appl. Microbiol*, 26: 131-135.
4. Aboun, A. A., Benmouffok, R., Bougueddour, A., Taril, M., Rezkallah, & Selatnia, L. (2003). Les salmonelloses aviaries diagnostiquées à l'Institut Pasteur d'Algérie de 1988 à 2002: serotypes rencontrés, leurs antibiorésistances et les aspects réglementaires. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie, 2000/2003*. ED. ANDS. Alger, Algeria, 64, 93–114.
5. Aho, M. (1992). Problems of *Salmonella* sampling. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 225–235.
6. AitMhand, R., Soukri, A., Moustauoi, N., Amarouch, H., ElMdaghri, N., Sirot, D., Benbachir, M. 2002. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J. Antimicrob. Chemother*, 49: 169-172.
7. Aktas, Z., Day, M., Kayacan, C.B., Diren, S., Threlfall, E.J., 2007. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30: 541–545.
8. Allos, B. M., Moore, M.R. et al. 2004. "Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: the FoodNet perspective." *Clin Infect Dis*, 38 Suppl 3: S115-20.
9. Anderson, E.S. (1968). Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *Br Med J* 3 (614): 333-9.
10. Andrews-Polymenis, H. L., Santiviago, C. A., & McClelland, M. (2009). Novel genetic tools for studying food-borne *Salmonella*. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 149–157.
11. Angulo, F. J., K. R. Johnson, et al. (2000). "Origins and consequences of antimicrobial resistant nontyphoidal *Salmonella*: Implications for the use of fluoroquinolones in food animals." *Microbial Drug Resistance* 6(1): 77-83.
12. Anon. 1990. God produktionsparksis for fremstilling af fjerakraefoder. Danish poultry council, reportno. FR20-90.

13. Anonymous, 2003a. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of *salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. Official Journal of European Union 2003 L325: 1-15.
14. Anonymous, 2003b. Council Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC. Official Journal of the European Union L 325: 31-40.
15. Anonymous, 2005b. Regulation (EC) No 1003/2005 of 30 June 2005 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 as regards a Community target for the reduction of the prevalence of certain salmonella serotypes in breeding flocks of *Gallus gallus* and amending Regulation (EC) No 2160/2003. Official Journal of the European Union L170: 12-17
16. Anonymous, 2005c. Regulation (EC) No 1091/2005 of 12 July 2005 implementing Regulation 1168/2003 of the European Parliament and of the Council as regards requirements for the use of specific control methods in the framework of the national programs for the control of salmonella. Official Journal of the European Union L 182: 3-4.
17. Anonymous (2005). "Reported foodborne illness and gastroenteritis in Australia: annual report of the OzfoodNet network, 2004." Communicable diseases intelligence **29**(2): 165-192.
18. Anonymous (2006). Bulletin Sanitaire Vétérinaire année 2006 (pp. 6). Algérie: Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural.
19. Anonymous (2009). Bulletin Sanitaire Vétérinaire année 2009 (pp. 2). Algérie: Direction des Services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural.
20. Anonymous, 2009: The community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223.
21. Amavisit, P., Markham, P.F., Lightfoot, D., Whithear, K.G., Browning, G.F., 2001. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in an equine hospital. *Vet. Microbiol.* 80, 85–98.
23. Aragaw, K., Molla, B., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., & Poppe, C. (2007). The characterization of *Salmonella* serovars isolated from apparently healthy slaughtered pigs at Addis Ababa abattoir, Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 82, 252–261.
24. Arlet, G., Barrett, T.J., Butaye, P., Cloeckaert, A., Mulvey, M.R., White, D.G. 2006. *Salmonella* resistant to expanded-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect.* 8: 1945-1954.
25. Arnold M.E., Carrique-Mas J.J. and Davies R.H., 2009. Sensitivity of environmental sampling methods for detecting *Salmonella* Enteritidis in commercial laying flocks relative to the within-flock prevalence. *Epidemiol. Infect.* 138: 330-339.
26. Arsenault, J., A. Letellier, et al. (2007c). "Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada." *J Food Prot* 70(8): 1820-8.

27. Arshad, M. M., M. J. Wilkins, F. P. Downes, M. H. Rahbar, R. J. Erskine, M. L. Boulton, and A. M. Saeed. 2007. A registry-based study on the association between human salmonellosis and routinely collected parameters in Michigan, 1995-2001. *Foodborne Pathog Dis*, 4:16-25.
28. Ayachi, A., Alloui, N., Bennoune, O., & Kassah-Laouar, A. (2010). Survey of *Salmonella* serovars in broilers and laying breeding reproducers. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(2), 103–106.
29. Ayachi, A. 2010. Thèse de doctorat. Epidémiologie de *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis dans la filière avicole. Thèse soutenue publiquement devant le jury le 15.12.2010.
30. Baggesen, D. L., Olsen, J. E., & Bisgaard, M. 1992. Plasmid profiles and phages types of *Salmonella* Typhimurium isolated from successive flocks of chickens on three parent stock farms. *Avian Pathology*, 21, 569–579.
31. Baggesen, D. L., Wegener, H.C., Bager, F., Stege, H and Christensen, J. 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev Vet Med*, 26:201-213.
32. Baggesen, D.L., Wegener, H.C., Madsen, M. 1997b. Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 1,4, or 6 to phage type 7 with loss of lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol*, 35: 330-333.
33. Baggesen, D.L., Sandvang, D., Aarestrup, F.M. 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol*, 38:1581-1586.
34. Bailey, J.S., Cason, J.A. and Cox, N.A. 1998. Effect of *Salmonella* in young chicks on competitive exclusion treatment. *Poultry science*, 77:394-399.
35. Bailey, J.S., Fedorka-Cray, P.J., Stern, N.J., Craven, S.E., Cox, N.A., Cosby, D.E. 2002. Serotyping and ribotyping of *Salmonella* using restriction enzyme PvuII. *J. Food Prot*, 65: 1005–1007.
36. Barnes, D. M., and Bergeland, M.E. 1968. *Salmonella* Typhisuis infection in Minnesota swine. *JAVMA*, 152:554-564.
37. Barrett, T.J., Gerner-Smidt, P., Swaminathan, B. 2006. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog. Dis*. 3, 20–31.
38. Bäumlér, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron. 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 64:1862-1865.
39. Barrow, P.A. 1999. Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals, Iowa State University Press, Ames, USA, pp 171-183
40. Barrow, P.A. and Lovell, M.A. 1991. Experimental infection of egg laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type four. *Avian Pathol*, 20: 335-348.

41. Batchelor, M., K. Hopkins, E. Threlfall, F. Clifton-Hadley, A. Stallwood, R. Davies, and E. Liebana. 2005. bla CTX-M Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:1319-1322.
42. Ben-Ami, R., Schwaber, M.J., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Giladi, M., Chmelnitsky, I., Leavitt, A. and Y. Carmeli, Y. 2006. Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis*, 42: 925- 34.
43. Bennett, A., Greenwood, D., Tennant, C., Banks, J., Betts, R. 1998. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 437-441.
44. Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*, 153.
45. Berends, B. R., Urlings, H.A., Snijders, J.M. and Van Knapen, F. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol*, 30: 37-53.
46. Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D.A., Burt, S.A. and Snijders, J.M. 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int J Food Microbiol*, 44: 219-229.
47. Beuving, G. and Vonder, G.M.A. 1978. Effects of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen. Comp. Endocrinol*, 35: 153-159.
48. Bhan, M. K., Bahl, R. and Bhatnagar, S. 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*, 366: 749-762.
49. Bichler, L.A., Nagaraja, K.V. and Halvorson, D.A. 1996. *Salmonella* enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected White Leghorn chickens. *Am. J. Vet. Res*, 57: 489-495.
50. Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C. et al. 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 59: 459-64.
51. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:1-14.
52. Bouallegue-Godet, O., Ben Salem, Y., Fabre, L., Demartin, M., Grimont, P.A.D., Mzoughi, R., Weill, F.X. 2005. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. *J. Clin. Microbiol*, 43: 1037-1044.
53. Boonmar S, Bangtrakulnonth A., Pornrunangwong S., Terajima J., Watanabe H., Kaneko K.I., and Ogawa M. 1998. Epidemiological Analysis of *Salmonella* enteritidis Isolates from Humans and Broiler Chickens in Thailand by Phage Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis *J Clin Microbiol.*; 36(4): 971-974.
54. Bouchet, V., Huot, H., Goldstein, R., 2008. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin. Microbiol. Rev*, 21, 262-273.



51. Bouvet, P. 2001. Bulletin trimestriel du Centre de reference des *Salmonella* et *Shigella*: les points essentiels pour 2000, Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella*, Institut Pasteur, Paris, France.
55. Bouzitouna-Bentchouala, C. 2006. Rapport d'activité du service de microbiologie, Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine. Algérie (Résultats non publiés).
56. Brandl, M. T. 2006. "Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety." *Annu Rev Phytopathol*, 44: 367-92.
57. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B., 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38 2465R2467
58. Brisabois, A. 2001. "Intérêt et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella*." *Epidémiologie et santé animale*, 39: 31-42.
59. Brisabois, A., Danan. C., Fremy, S., Granier. S., Moury. F., Oudardt. C., Piquet. C., Pires-Gomes. C. 2006. Inventaire réseau *Salmonella*. Sérotypage et sensibilité aux antibiotiques. Maisons-Alfort : AFSSA, 113p.
60. Brown, E.W., Keys, C., 2006. Pulsed-field gel electrophoresis is a poor evolutionary indicator in *Salmonella* Abstract from the 2006 ASM General Meeting, Orlando, FL. available: <http://www.asm.org/memonly/abstracts/AbstractView.asp?AbstractID=107995>.
61. Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R., Harel, J., 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*, 72: 3780–3784.
62. Brun-Buisson, C. 2005. The risk for and approaches to control of nosocomial infections in ICUs: guideline from the SRLF/SFAR task force on nosocomial infections in ICUs. *Réanimation* 14:463-471.
63. Buchwald D. and Blaser M., 1984. A review of humane salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Rev. Infect. Dis*, 6: 345-346.
64. Busch, U., Nitschko, H., 1999. Methods for the differentiation of microorganisms. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 7221-2, 263–278.
65. Busse, M. 1995. Media for *Salmonella*. *Int. J. Food. Microbiol.* 26: 117-131.
66. Butt, A. A., K. E. Aldridge, et al. 2004. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections." *Lancet Infectious Diseases*, 4(4): 201-212.
67. Bygrave, A.C., Gallagher, J. 1989. Transmission of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Vet. Rec*, 124: 333.
68. Byrd J.A, Corrier D.E, DeLoach J.R, Nisbet D.J and Stanker L.H. 1998. Horizontal transmission of *Salmonella* Typhimurium in broiler chicks. *J. Applied Poultry Res*, 7:75-80.

- 69.** Bywater, R., H. Deluyker, E. Deroover, A. de Jong, H. Marion, M. McConville, T. Rowan, T. Shryock, D. Shuster, and V. Thomas. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother*, 54:744-754.
- 70.** Camart-Perié, A. 2006. *Salmonella*, Salmonelloses bovines: état des lieux, épidémiologie en France. Thèse de doctorat vétérinaire. Alfort : Faculté de médecine Créteil, 121p.
- 71.** Canton, R. and Coque, T.M. 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Microbiol*, 9: 466-75.
- 72.** Carattoli, A., Villa, L., Pezzella, C., Bordi, E., and Visca, P. 2001. Expanding drug resistance through integron acquisition by Inc plasmids of *Salmonella enterica* Typhimurium. *Emerg. Infect. Dis*, 7: 444-447.
- 73.** Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E. F., Cisse, M. & Salvat, G. 2004. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 63: 151–161.
- 74.** Carrique-Mas, J. J., Breslin, M., Snow, L., McLaren, I., Sayers, A., & Davies, R. H. 2009. Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137: 837–846.
- 75.** Carrique-Mas, J. J., Marin, C., Breslin, M., McLaren, I. & Davies, R. H. 2009. A comparison of the efficacy of cleaning and disinfection methods in eliminating *Salmonella* spp. from commercial egg laying houses. *Avian Pathology*, 38: 419–424.
- 76.** Carrique-Mas J.J., Marin C., Breslin M., McLaren I. and Davies R.H., 2009b. A comparison of the efficacy of cleaning and disinfection methods in eliminating *Salmonella* spp. from commercial egg laying houses. *Avian Pathol*. 38: 419- 424.
- 77.** Cattoir, V. 2004. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathol Biol*, 52: 607-616.
- 78.** Carattoli, A., Tosini, F, et al. 2002. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother*, 46 (5): 1269-72.
- 79.** Cebula, T.A., Jackson, S.A., Brown, E.W., Goswami, B., LeClerc, J.E. 2005. Chips and SNPs, bugs and thugs: a molecular sleuthing perspective. *J. Food Prot*, 68: 1271–1284.
- 80.** Center for Disease Control. 1999. Reptile-associated *Salmonellosis*: selected states, 1996-1998. *Morb. Mortal. Wkly Rep*, 48: 1009-1013.
- 81.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2003. – National Antimicrobial Resistance Monitoring System for enteric bacteria (NARMS): 2001 annual report. United States Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, 219 pp.
- 82.** Centre de Référence des Salmonelles Shigelles (CRSS) Rapport (2009) : Relevé des salmonelles et Shigelles isolées en France en 2009.

- 83.** Cezard, J. P., J. P. Chouraqui, et al. 2002. "[Drug treatment of acute infectious diarrhea in infants and children]." *Arch Pediatr*, 9(6): 620-8.
- 84.** Chadfield, M., Permin, A., Nansen, P. & Bisgaard, M. 2001. Investigation of the parasitic nematode *Ascaridia gali* (Shrank 1788) as a potential vector for *Salmonella enterica* dissemination in poultry. *Parasitology Research*, 87: 317–325.
- 85.** Chan, K., Baker, S., Kim, C.C., Detweiler, C.S., Dougan, G. and Falkow, S. 2003. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol*, 185:553-563.
- 86.** Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B., 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA RAPD analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 29 : 221–225.
- 87.** Chaslus-Danca, E., J.P. Lafont, et al. 2000. Spread of resistance from food animals to man : the French experience. *Acta Vet Scand Suppl*, 93: 53-60; discussion 60-1.
- 88.** Chen, Y., Zhang, W., Knabel, S.J. 2007. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol*, 45: 835–846.
- 89.** Chisholm, S.A., Crichton, P.B., Knight, H.I., Old, D.C., 1999. Molecular typing of *Salmonella* serotype Thompson strains isolated from human and animal sources. *Epidemiol. Infect*, 122: 33–39.
- 90.** Chopra, I., O'Neill, A. and Miller, K. 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updates*, 6: 137-145.
- 91.** Chowdry, N., Threlfall, E.J., Rowe, B., Stanley, J. 1993. Genotype analysis of faecal and blood isolates of *Salmonella dublin* from humans in England and Wales. *Epidemiol. Infect*, 110: 217–225.
- 92.** Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 93.** Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Nineteenth Informational Supplement. M100-S19. Wayne, PA. USA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- 94.** Cloeckaert, A. and Schwartz, S. 2001. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enteric typhimurium* DT104. *Vet Res*, 32 (3-4): 301-10.
- 95.** Collard, J. M., Bertrand, S., Dierick, K., Godard, C., Wildemauwe, C., Vermeersch, K., et al. (2007). Drastic decrease of *Salmonella Enteritidis* isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 1–11.
- 96.** Cohen, M.L & Tauxe, R.V. 1986. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: an epidemiologic perspective. *Science*, 234: 964-969.

- 97.** Coleman, M. E., Marks, H.M. et al. (2004). "Discerning strain effects in microbial dose response data." *J.Toxicol Environ Health*, 67(8-10): 667-85.
- 98.** Cox N.A., Bailey J.S., Mauldin J.M., Blankenship L.C. and Wilson J.L., 1991. Extent of *Salmonellae* contamination in breeder hatcheries. *Poult. Sci*, 70: 416-418.
- 99.** Craven, S. E., Stern, N. J., Line, E., Bailey, J. S., Cox, N. A., & Fedorka-Cray, P. 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chickens houses by sampling intestinal dropping. *Avian Diseases*, 44: 715–720.
- 100.** D'Aoust, J.-Y. (1991). "Pathogenicity of foodborne Salmonella." *International Journal of Food Microbiology* 12(1): 17-40.
- 101.** D'Aoust, J. 1994. "Salmonella and the international food trade." *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2): 11-31.
- 102.** Darwin K.H. and Miller V.L., 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev*, 12: 405-428.
- 103.** Davies, J. 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants 207:15-27.
- 104.** Davies, R.H., Hinton, M.H. 2000. *Salmonella* in animal feed. In: Wray, A. Wray, C. (Eds), *Salmonella* in domestic animals. CAB International: Oxford, 285-300.
- 105.** Davies R. and Breslin M., 2001. Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in laying flocks. *Vet. Rec*, 149: 699-704.
- 106.** Davies R., and Breslin M., 2003. Observations on *Salmonella* contamination of commercial laying farms before and after cleaning and disinfection. *Vet. Rec*, 152: 283-287.
- 107.** Davies, R.H., Breslin,M., 2003a. Investigation of *Salmonella* contamination and disinfection in farm egg-packing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 191–196.
- 108.** Davis, M. A., Hancock, D.D., Besser, T.E., and Call, D.R. 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol*, 41:1843-1849
- 109.** Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42:73-91.
- 110.** Dechet A.M., Scallan E., Gensheimer K., Hoekstra R., Gunderman-King J., Lockett J., Wrigley D., Chege W. and Sobel J., 2006. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium definitive type 104 infection linked to commercial ground beef, northeastern United States, 2003-2004. *Clin. Infect. Dis*, 42: 747-752
- 111.** De Jong, B., Andersson, Y. et al. (2005). "Effect of regulation and education on reptile associated salmonellosis." *Emerging Infectious Diseases*, 11(3): 398-403.

- 112.** De Jong A., Bywater R., Butty P., Deroover E., Godinho K., Klein U., Marion H., Simjee S., Smets K., Thomas V., Vallé M. and Wheadon A., 2009. A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 63: 733-744.
- 113.** Delmas G., Gallay, A., Espié, E., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F.X., De Valk, H., Vaillant, V. and Désenclos, J.C., 2006. Foodborne-diseases outbreaks in France between 1996 and 2005. *B. E. H.* 51/52: 418-422.
- 114.** Delmas, G., Gallay, A. et al. 2007. "Food borne infection and intoxication occurrence in France between 1996 and 2005." Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005 **48**(278): 74-78.
- 115.** Deplano, A., Struelens, M. et al. 2007. Marqueurs épidémiologiques. Précis de bactériologie Clinique. E. édition. Paris, Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P.: 1764.
- 116.** De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Messens, W., Uyttendaele, M., Debevere, J. and Herman, L., 2006. Influence of egg shell condensation on egg shell penetration and whole egg contamination with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *J. Food Prot.*, 69: 1539-1545.
- 117.** Desai, M., Tanna, A., Wall, R., Efstrotation, A., George, R. and Stanley, J. 2001. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an out-break of group A streptococcal invasive disease. *J. Clin.Microbiolo.*, 36: 3133-3137.
- 118.** De Smedt, J., Bolderdijk, R., Rappold, H., Lauten-Schlaeger, D. 1986. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment semisolid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food. Prot.* 49: 510-514.
- 119.** Desmidt, M., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. 1997. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet. Microbiol.*, 56: 99-109.
- 120.** Desmidt, M., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. 1998. Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis phage type four. *Poult. Sci.*, 77: 73-74.
- 121.** De Zutter, L., Daube, G. 1998. Improved isolation of *Salmonella* from meat using the diagnostic semisolid Salmonella agar Diasalm. In: International Society for Fat research-International Standard Organization-Association of Official Analytical Chemists (Eds) Foodborne pathogens: detection and typing. International symposium sponsored by International Society for Fat research-International Standard Organization-Association of Official Analytical Chemists, 20-4-1998, Den Hagen, the Netherlands.
- 122.** Dibb-Fuller, M. P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C. J. & Woodward, M. J. (1999). Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 145: 1023-1031.

- 123.** Dilasser, F., Grout, J., Tache, J., Fach, P. AFNOR. 1997. Evolution of a PCR based test for detecting *Salmonella* spp. in food samples: Probelia TM. In: Colin P., Le Groux, J.M., Clement, G., (Eds), Proceeding of *Salmonella* and *Salmonellosis* "97", Ploufragan (France), May 20-22 1997, 117-120.
- 124.** Doi, Y., Yokoyama, K., Yamane, K., Wachino, J., Shibata, N., Yagi, T., Shibayama, K., Kato, H., and Arakawa, Y. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48: 491-496.
- 125.** Doran, G., Morris, D., O'Hare, C., DeLappe, N., Bradshaw, B., Corbett- Feeney, G. and Cormican, M. 2005. Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*, 71:8236-8240.
- 126.** Dunne, E.F., Fey, P.D., Kludt, P., Reporter, R., Mostashari, F., Shillam, P., Wicklund, J., Miller, C., Holland, B., Stamey, K., Barrett, T.J., Rasheed, J.K., Tenover, F.C., Ribot, E.M. & Angulo, F.J. 2000. – Emergence of domestically acquired ceftriaxoneresistant *Salmonella* infections associated with *ampC* betalactamase. *J. Am. med. Assoc.*, 284 (24), 3151-3156.
- 127.** Ebel, E. and Schlosser, W., 2000. Estimating the annual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* enteritidis in the United States. *Int. J. Food Microbiol*, 61: 51-62.
- 128.** Egorova, S., Timinouni, M., Demartin, M., Granier, S., Whichard, J., Sangal, V., Fabre, L., Delauné, A., Pardos, M., and Millemann, Y. 2008. Ceftriaxone- Resistant *Salmonella* enterica Serotype Newport, France. *Emerg Infect Dis*, 14:954.
- 129.** El-Lethey, H., Huber-Eicher, B., and Jungi, T.W. 2003. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 95: 91-101
- 130.** Elgroud, R., Zerdouni, F., Benazzouz, M., Bouzitouna-Bentchouala, C., Granier, S. A., Frémy, S., et al. 2009. Characteristics of *Salmonella* contamination of broilers and slaughterhouses in the region of Constantine (Algeria). *Zoonoses and Public Health*, 10, 1863–2387.
- 131.** Enright, M.C., Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol*, 7, 482–487.
- 132.** Erbeck, D.H., McLaughlin, B.G. and Singh, S.N., 1993. Pullorum disease with unusual signs in two backyard chicken flocks. *Avian Dis*, 37: 895-897
- 133.** Eriksson, J., Lofstom, C., Aspan, A., Gunnarsson, A., Karlsson, I., Borch, E., De Jong, B. et Radstom, A. 2005. Comparison of genotyping methods by application to *S. Livingstone* strains associated with an outbreak of human salmonellosis. *Int. j. food microbial*, 104: 93-103.
- 134.** Esaki, H., Noda, K., Otsuki, N., Kojima, A., Asai, T., Tamura, Y., Takahashi, T. 2004. Rapid detection of quinolone-resistant *Salmonella* by real time SNP genotyping. *J. Microbiol. Methods*, 58, 131–134.

- 135.** Espie, E., H. De Valk, V. Vaillant, N. Quelquejeu, F. Lequerrec, and F. Weill. 2004. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype Newport infections linked to the consumption of imported horse meat in France. *Epidemiol Infect*, 133:373-376.
- 136.** European Centre for Disease prevention and Control, 2010. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. 2010. P 181.
- 137.** European Commission. 2004. Baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying flocks of *Gallus gallus* in the EU. Technical specifications, 16, Vol. SANCO/34/2004. Rev3.
- 138.** European Food Safety Authority, 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. EFSA J. 94, 58 pp.
- 139.** European Food Safety Authority, 2007. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. EFSA J. 97, 84 pp.
- 140.** European Food Safety Authority, 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. EFSA J. 130, 352 pp
- 141.** European Food Safety Authority, 2009. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. EFSA J. 7: 1372
- 142.** European Food Safety Authority, 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and foodborne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA J. 1496, 288 pp.
- 143.** Euzeby J.P.2005. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire [www.bacterio.cict.fr/bacdicto/systematique/nomensalmonelles.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdicto/systematique/nomensalmonelles.html) Evans M. R., Will L., and Ribeiro C.D. (1998) : *Salmonella* Enteritidis
- 144.** Fadl, A.A., Vankitarayanan, K.S. and Khan, M.I., 2002. Identification of *Salmonella* Enteritidis outer membrane proteins expressed during attachment to human intestinal epithelial cells. *J. Appl. Microbiol*, 92: 180-196.
- 145.** Fahlen, T. F., Mathur, N. & Jones, B. D. 2000. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 28: 25-35.
- 146.** Fakhr, M. K., Nolan, L.K., and Logue, C.M. 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol*, 43:2215- 2219.
- 147.** Falcao, J.P., Falcao, D.P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A.C., Brocchi, M., 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *J. Med. Microbio*, 55, 1539–1548.
- 148.** FAO/WHO. 2009. Food and Agricultural Organisation and World Health Organization

- 149.** Feberwee, A., De Vries, T.S., Hartman, E.G., De Wit, J.J., Eilbers, A.R. and De Jong, W.A. 2001. Vaccination against *Salmonella* enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella* gallinarum 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* tests. *Avian Dis*, 45: 83-91
- 150.** Feil, E.J., Enright, M.C., 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol*, 7, 308–313.
- 151.** Fernandez, J., Fica, A., Ebensperger, G., Calfullan, H., Prat, S., Fernandez, A., Alexandre, M., and Heitmann, I. 2003. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella* enterica serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. *J Clin Microbiol*, 41:1617-1622.
- 152.** Flint, J. A., Van Duynhoven, Y.T. et al. (2005). "Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: An international review." *Clinical Infectious Diseases*, 41(5): 698-704.
- 153.** Finlay, B.B. and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev*, 53: 210-230.
- 154.** Foley, S. L., White, D.G., McDermott, P.F., Walker, R.D., Rhodes, B., Fedorka-Cray, P.J., Simjee, S., and Zhao, S. 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol*, 44:3569-3577.
- 155.** Foley, S. L. and Lynne, A.M. 2008. "Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance." *Journal of animal science*, 86(14 Suppl).
- 156.** Foley, S. L., Lynne, A.M. et al. 2009. "Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens." *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4): 430-440.
- 157.** Foxman, B., L. Zhang, L. et al. 2005. "Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies." *Epidemiologic Perspectives and Innovations*, 2.
- 158.** Francart, S., Protais, J., L'hospitalier, R., Salvat, G., Clin, P. 1993. Quelques facteurs influençant la prévalence de *Salmonella* dans l'environnement de la filière ponte : enquête épidémiologique dans 841 bâtiments. In/ Société française de microbiologie, section de microbiologie alimentaire ; flash sur les microorganismes pathogènes dans les aliments. Paris, 28-29 avril 1993.
- 159.** Franciosa, G., Tartaro, S., Wedell-Neergaard, C., Aureli, P., 2001. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 1793–1799.
- 160.** Franklin, R.B., Taylor, D.R., Mills, A.L., 1999. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA RAPD. *J. Microbiol. Methods*, 35, 225–235.



- 161.** Frenzen, P. D., Riggs, T.L. et al. 1999. "Salmonella Cost Estimate Updated Using FoodNet Data." *Food.Review*, 22 (2): 10-15.
- 162.** Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M. A. et al. 2006. "Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002." *Emerging Infectious Diseases*, 12(3): 381-388.
- 163.** Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. 2003. Plasmidmediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S Rrna methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:2565- 71.
- 164.** Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., and Lambert, T. 2005. Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene Is Borne by Composite Transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 49 : 2949-2953.
- 165.** Ganière, J.-P. et al. 2005. Maladies réputées contagieuses et maladies à déclaration obligatoire des oiseaux, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Merial (Lyon), 2005, 26 p.
- 166.** Ganière, J.P. et al. 2008. Maladies reputes dangereuses et maladies à declaration obligatoire des oiseaux et oligomorphes. Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises. Lyon. MERIAL, 67p.
- 161.** Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J. and Van Immerseel, F., 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev*, 33: 718-738.
- 162.** Garber, L., Smeltzer, M., Cray, P., Ladely, S. and Ferris, K., 2003. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis in table egg layer house environments and in mice in US layer houses and associated risk factors. *Avian Dis*, 47: 134-142.
- 163.** Gast, R.K. and Holt, P.S., 1999. Experimental horizontal transmission *Salmonella* Enteritidis strains (phage types 4, 8 and 13a) in chicks. *Avian Dis*,. 43: 774-778.
- 164.** Gast, R.K. and Beard, C.W., 1990. Production of *Salmonella* enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected laying hens. *Avian Dis*, 34: 438-446.
- 165.** Gast, R. K., and Beard, C.W. 1990. Isolation of *Salmonella* enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis*, 34:991–993.
- 166.** Gast, R.K., Mitchell, B.W. and Holt, P.S. 2004. Detection of airborne *Salmonella* enteritidis in the environment of experimentally infected laying hens by an electrostatic sampling device. *Avian Dis*, 48: 148-154.
- 167.** Gatto, A.J., Peters, T.M., Green, J., and al. 2006. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol. Infect*, 134: 729-736.
- 168.** Gerner-Smidt, P., Scheutz, F., 2006. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog. Dis*, 3, 74–80.

- 169.** Gibert, I., Barbe, J., Casadesus, J., 1990. Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 2555–2560.
- 170.** Golden, N. J., Marks, H. M., Coleman, M. E., Schroeder, C. M., Bauer, N. E., Jr., & Schlosser, W. D. 2008. Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Veterinary Microbiology*, 131, 215–228.
- 171.** Gonzalez-Zorn, B., et al. 2005. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.*, 11:954–956.
- 172.** Gordon, D.M., 2001. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology*, 147, 1079–1085.
- 173.** Gouvernement du Canada. 2006. *Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA), 2006 Guelph (Ontario) : Agence de la santé publique du Canada*, Retrieved October 22, 2009, from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/pdf/cipars-picra-2006- fra.pdf>.
- 174.** Granier, S.A., Hidelgo, L., San Millan, A., Escudero, J.A., Gutierrez, B., Brisabois, A., and Gonzalez-Zorn, B. 2011. ArmA Methyltransferase in a Monophasic *Salmonella enterica* isolate from food. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 55(11): 5262.
- 175.** Gray, J. T., and Fedorka-Cray. P.J. 1996. Salmonellosis in swine : a review of significant areas affecting the carrier state. Presented at the the first international symposium on ecology of *Salmonella* in pork production. Ames, Iowa.
- 176.** Greig, J. D. and Ravel, A. 2009. "Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution." *International Journal of Food Microbiology*, 130(2): 77-87.
- 177.** Griffith, R. W., Schwartz, K.J. and Meyerholz, D.K. 2006. *Salmonella*, p. 739-754. In B.E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 9 th Edition. Blackwell Publishing, Ames.
- 178.** Grimont, F and Grimont, P.A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 137B: 165-175.
- 179.** Grimont, P.A.D., Bouvet, P., Grimont, F., Desenclos, J.C., 1999. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in France: epidemiology, prevention and control. In: Saeed, A.M. (Ed.), *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Humans and Animals: Epidemiology, Pathogenesis and Control. *Iowa State University Press, Ames*, pp. 43–50.
- 180.** Grimont, P.A.D., Grimont, F. and Bouvet, P., 2000. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: Wray A. and Wray C. (eds.) *Salmonella* in domestic animals. CAB International, Oxford, UK, pp 1-17
- 181.** Grimont, P. A. D., and Weill. F.X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- 182.** Guardabassi, L. and H. Kruse, H. 2008. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals, p. 1-12. *In* L. Guardabassi, L.B. Jensen, and H. Kruse (ed.), Guide to Antimicrobial Use in Animals. Blackwell Publishing, Ames.
- 183.** Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *App. Envir. Microbiol*, 3: 421-430.
- 184.** Gupta, A., Fontana, J et al. 2003. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosprins in the United States. *J Infect Dis*, 188(11): 1707-16.
- 185.** Guthrie, R. K. 1992. Taxonomy and grouping of the *Salmonella*, p. 23-40, *In Salmonella*. CRC Press Inc, Boca Raton.
- 186.** Haeghebaert, S., Sulem, P., Deroudille, L., Vanneroy-Adenot, E., Bagnis, O., Bouvet, P., Grimont, F., Brisabois, A., Le Querrec, F., Hervy, C., Espie, E., De Valk, H & Vaillant, V. 2003. Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Euro Surveill*, **8**, 151-156.
- 187.** Hald, T., Wingstrand, A., Swanenburg, M., Altroch, A., Limpitakis, N., Thorberg, B.M., 1998. Harvest epidemiology of *Salmonella* contamination in EU pig slaughterhouses. In: Bahnsen P. (Ed), Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, Washington DC (USA), August 5-7 1998. US Swine consortium: Urbana-Champaign, 1999, 273-276.
- 188.** Hald, B., Wedderkopp, A., Madsen, M., 2000. Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a crosssectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Pathol*, 29: 123–131.
- 189.** Hald, T., Vose, D. et al. 2004. "A Bayesian approach to quantify the contribution of animal food sources to human salmonellosis." *Risk Anal*, 24(1): 255-69.
- 190.** Hald, T., Lo Fo Wong, D.M.A. et al. 2007. "The attribution of human infections with antimicrobial resistant *Salmonella* bacteria in Denmark to sources of animal origin." *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3): 313-326.
- 191.** Hald, T. 2008. EU-wide baseline studies: achievement and difficulties faced. *Food Science and Technology*, 19: S40-S48.
- 192.** Hanes, D. Non typhoid *Salmonella*. In: Miliotis N., Bier J. (Eds) International Handbook of Foodborne Pathogens, Marcel Dekker: New York, 137-149.
- 193.** Harbottle, H., White, D.G. et al. 2006. "Comparison of multilocus sequence typing, pulsedfield gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates." *J Clin Microbiol*, 44(7): 2449-57.
- 194.** Heisig, P., Kratz, B et al. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb Drug Resist*, 1(3): 211-8.

- 195.** Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and K. Molbak. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg Infect Dis*, 8: 490-495.
- 196.** Helmuth, R. 2000. Antibiotic resistance in *Salmonella*, p. 89-106. In A, Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
- 197.** Hennessy, T. W., Cheng, L.H. et al. 2004. "Egg consumption is the principal risk factor for sporadic *Salmonella* serotype Heidelberg infections: A case-control study in foodnet sites." *Clinical Infectious Diseases*, 38(SUPPL. 3).
- 198.** Henry, D. P., Frost, A. J., Samuel, J. L., O'Boyle, D. A. and Thomson, R. H. 1983. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *J Appl Bacteriol*, 55: 89-95.
- 199.** Henzler, D.J. and Opitz, H.M. 1992. The role of mice in the epizootiology of *Salmonella* enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Diseases*, 36 (3): 625-631.
- 200.** Henzler, D.J., Ebel, E., Sanders, J., Kradel, D., and Mason, J. 1994. *Salmonella* enteritidis in eggs from commercial chicken flocks implicated in human outbreaks. *Avian Diseases*, 38 : 37-43.
- 201.** Heritage, J., M'Zali, F. H., Gascoyne-Binzi, D. and Hawkey. P. M. 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum béta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 44: 309-18.
- 202.** Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerdt, K., De Zutter, L., 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect*, 129: 253– 265.
- 203.** Hogue A., White P., Guard-Petter J., Schlosser W., Gast R., Ebel E., Farrar J., Gomez T., Madden J., Madison M., McNamara A.M., Morales R., Parham D., Sparling P., Sutherland W. and Swerdlow D., 1997. Epidemiology and control of egg-associated *Salmonella* Enteritidis in the United States of America. *Rev. Sci. Tech*, OIE 16: 542-553.
- 204.** Hohmann, E. L. 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis*, 32: 263- 269.
- 205.** Holt, P. S., Mitchell, B. W. and Gast, R. K. 1998: Airborne horizontal transmission of *Salmonella* enteritidis in molted laying chickens. *Avian Dis*, 42, 45–52.
- 206.** Hoover, N.J., Kenney, P.B., Amick, J.D., Hypes, W.A.1997. Preharvest sources of *Salmonella* colonization in turkey production. *Poult. Sci*, 76: 1232–1238.
- 207.** Hope, B.K., Baker, A.R., Edel, E.D., Hogue, A.T., Schlosser, W.D., Whiting, R., McDowell, R.M. and Morales, R.A. 2002. An overview of the *Salmonella* Enteritidis risk assessment for shell eggs and egg products. *Risk Analysis*, 22: 203-218.
- 208.** Hoszowski, A., Wasyl, D. 2001. Typing of *Salmonella* enterica subsp. Enterica serovar Mbandaka isolates. *Vet. Microbiol*, 80: 139–148.
- 209.** Hu, L., Kopecko, D. 2003. Typhoid *Salmonella* . In: Miliotis N., Bier J (Eds), International Handbock of Foodborne Pathogens. Marcel Dekkers: New York, 151-165.

- 210.** Hudson, C.R., Quist, C., Lee, M.D., Keyes, K., Dodson, S.V., Morales, C., White, D.G., Maurer, J.J., 2000. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1860–1865.
- 211.** Hughes, C.S., Gaskell, R.M., Jones, R.C., Bradbury, J.M. and Jordan, F.T.W. 1989. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Res. Vet. Sci.*, 46: 274-276
- 212.** Humbert, F. 1992. Salmonelles et filière avicole : Aspect épidémiologique et incidences sur la santé publique. *Le point Vétérinaire*, 24 (145) : 207-214.
- 213.** Humbert, F. 1994. Les alternatives de traitement et de prévention des salmonellas. *L'aviculteur* **556**: 49-50.
- 214.** Humbert, F. 1998. Les Salmonelloses. dans *Manuel de Bactériologie Alimentaire*, ed. Polytechnica. Paris.
- 215.** Humphrey, T.J., Baskerville, A., Mawer, S., Rowe, B. and Hopper, S. 1989. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiol. Infect.*, 103: 415-423
- 216.** Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawer, A., Henley, A. and Rowe, B. 1991. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidem. Infect.*, 106: 489-496.
- 217.** Humphrey, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. *Int J Food Microbiol.* 1994 Jan, **21**(1-2), 31-40
- 218.** Humphrey, T. 2000. Public-health aspects of *Salmonella* infection, p. 245- 263. In A. Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
- 219.** Humphrey, T., 2006. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. *Br. Poult. Sci.*, 47: 379-391
- 220.** Hunneau-Salaün, A., Denis, M., Balaine, L., Salvat, G. 2007. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*, 80: 34-48.
- 221.** Hunneau-Salaün, A., Chemaly, M., Le Bouquin, S., Lalande, F., Petetin, I., Rouxel, S., Michel, V., Fravallo, P. and Rose, N., 2009. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period. *Prev. Vet. Med.*, 89: 51-58.
- 222.** Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2465–study (Landeras and Mendoza, 1998) support the 2466.
- 223.** Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van Duyne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., Ribot, E., 2005. Establishment of a universal size standard strain

- for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J. Clin. Microbiol*, 43: 1045–1050.
- 224.** Hyytia-Trees, E., Smole, S.C., Fields, P.A., Swaminathan, B., Ribot, E.M., 2006. Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 STEC O157. *Foodborne Pathog. Dis*, 3: 118–131.
- 225.** ICMSF.1996. (International commission on microbiological specifications for foods). *Salmonellae*. Microorganisms in foods.5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie academic & professional edition.: 217-264.
- 226.** International Commission On Microbiological Specifications for Foods *Salmonellae*. In: ICMF (Ed), *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional: London, 1996, 217-264.
- 227.** INRA. 2002. Centre de Tours. *Site de l'Institut national de la recherché agronomique* [en ligne]. Comment sont élevées les Poules pondeuses. [[www.tours.inra.fr/centre/internet/connaissances/expos/poule-pondeuse/p1elevationpoule.pdf](http://www.tours.inra.fr/centre/internet/connaissances/expos/poule-pondeuse/p1elevationpoule.pdf)] consulté le 08/11/2006
- 228.** InVS. 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France: 192.
- 229.** ISO (Comité international de normalisation AW/9) (2002). ISO 6579: 2002. Microbiology-general guidance on methods for the detection of *Salmonella*-Amendment 1: Annex D: detection of *Salmonella* spp. in animal feces and in environmental samples from the primary production stage.
- 230.** Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E. and Lake. J. A. 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol*, 61: 489-495.
- 231.** Jesenberger, V., Procyk, K.J., Yuan, J., Reipert, S., Baccarini, M. 2000. *Salmonella* induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J. Exp. Med*, 192: 1035-1046.
- 232.** Jensen, M.A., and Hubner, R.J. 1996. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridation products in the identification of *Salmonella* serovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2741-2746.
- 233.** Jones, R.C. and Ambali, R.G. 1987. Re-excretion of an entero-tropic infectious-bronchitis virus by hens at point of lay after experimental-infection at day old. *Vet. Rec*, 120:117-118.
- 234.** Jones, T. F., Ingram, L.A. et al. 2008. "Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype." *J Infect Dis*, 198(1): 109-14.
- 235.** Jordan, D., Chin, J.J.-C., Fahy, V.A., Barton, M.D., Smith, M.G. and Trott, D.J. 2009. Antimicrobial use in the Australian pig industry: results of a national survey. *Aust. Vet. J*, 87: 222-229.

- 236.** Jourdan, N., S., Le Hello, et al. 2008. "Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype Give infections in infants in France, linked to infant milk formula, September 2008." *Euro Surveill* 13 (39).
- Kado, C.I., Liu, S.T., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*, 145: 1365–1373.
- 237.** Kaiser P., 1994. Avian cytokines. In: Davison T.F., Morris T.R. and Payne L.N. (eds.) *Poultry Science Symposium Series*, volume 24: *Poultry immunology*, Carfax Publishing Company, Oxfordshire, England, pp 83-114.
- 238.** Kam, K.M., Luey, K.Y., Chiu, A.W., Law, C.P., Leung, S.F. 2007. Molecular characterization of *Salmonella* enterica Serotype Typhi isolates by pulsed-field gel electrophoresis in Hong Kong, 2000–2004. *Foodborne Pathog.Dis*, 4: 41–49.
- 239.** Kariuki, S., Gilks, C. et al. 1999. "Analysis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis." *Journal of Medical Microbiology*, 48(11): 1037-1042.
- 240.** Kariuki, S, Revathi, G, Kariuki, N. et al. 2006. Invasive multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in Africa: zoonotic or anthroponotic transmission? *J Med Microbiol*, 55:585–591.
- 241.** Kauffmann, F. 1966. On the history of *Salmonella* research. *Zentralbl Bakteriol* [Orig] 201:44-48.
- 242.** Kerouantan, A., Brisabois,A.,Grout,J. et Picaed,B. 1996. Molecular epidemiological tools for *S. Dublin* typing. *FEMS, Immunological and medical microbiology*. 14: 25-29.
- 243.** Kerouanton, A., Marault, M. et al. 2007. "Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella* enterica serotype discrimination." *Foodborne Pathog Dis*, 4(3): 293-303.
- 244.** Keller, L.H., Benson, C.E., Krotec, K. and Eckroade, R.J., 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun*, 63: 2443-2449
- 245.** Kimura, A.C., Reddy,V., Marcus,R., Cieslak,P.R., Mohle-Boetani, J.C., Kassenborg, H.D., Segler,S.D., Hardnett,F.P., Barrett,T. et Swerdlow,D.L. 2004. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella* enterica serotype Enteritidis infections in the United States : a case control study in FoodNet sites. *Clin. Infect. Dis*, 38: 244-252.
- 246.** Kinde, H., Read, D.H., Chin, R.P., Bickford, A.A., Walker, R.L., Ardans, A., Breitmeyer, R.E., Willoughby, D., Little, H.E., Kerr, D. and Gardner, I.A., 1996. *Salmonella* Enteritidis, phage type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriological and epidemiological findings. *Avian Dis*, 40: 665-671
- 247.** Kinde, H. Shivaprasad, H.L., Daft, B.M., Read, D.H., Ardans, A., Breitmeyer, R., Rajashera,G., Nagaraja, K.V. and Gardner, I.A. 2000. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. *Avian Dis*, 44: 239-248.

- 248.** Kinde, H., Castellan, D.M., Kerr, D., Campbell, J., Breitmeyer, R. and Ardans, A., 2005. Longitudinal monitoring of two commercial layer flocks and their environments for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and other salmonellae. *Avian Dis*, 49: 189-194.
- 249.** Kingsley, R.A. and Bäumler, A.J. 2000. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol. Microbiol*, 36: 1006-1014
- 250.** Kingsley, R.A., Santos, R.L., Keestra, A.M., Adams, L.G. and Bäumler, A.J. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol. Microbiol*, 43: 895-905.
- 251.** Kirk, M. D., McKay, I. et al. 2008. "Food safety: foodborne disease in Australia: the OzFoodNet experience." *Clin Infect Dis*, 47(3): 392-400.
- 252.** Klasing, K.C., 1998. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune response. *Poult. Sci*, 77: 983-989.
- 253.** Kojima, A., Asai, T., Ishihara, K., Morioka, A., Akimoto, K., Sugimoto, Y., Sato, T., Tamura, Y. and Takahashi, T., 2009. National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci*, 71: 1301-1308.
- 254.** Korsak, N., Clinquart, A., Daube, G. 2004. "*Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ?" *Les annales de médecine vétérinaire*, 148(4): 174-193.
- 255.** Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris Jr., J.G., Sulakvelidze, A., 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol*. 40: 1626–1635.
- 256.** Ktari, S., Mahjoubi, F., Mnif, B., Kallel, H., Bouaziz, M., Hammami, H. 2010. Investigation de trios épidémies d'infections nosocomiales à *Serratia marcescens* survenues dans le service de réanimation –CHU de Sfax, Tunisie. *La tunisie Médicale*. Vol 88 (07) : 501-506.
- 257.** Kumao, T., Ba-Thein, W., Hayashi, H., 2002. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg outbreaks. *J. Clin. Microbiol*, 40: 2057–2061.
- 258.** Iabadene, H, Messai, Y, Ammari, H, Ramdani-Bouguessa, N, Lounes, S, Bakour, R, Arlet, G 2008. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria. *J. Antimicrob. Chemother*, 62: 133-136.
- 259.** Lahellec, C., Collin, P., Bennejean, G., Paquin, J., Guillerm, A., Debois, J. C. 1986. Influence of resident *Salmonella* on contamination of broiler flocks. *Poultry science*, 26: 179-186.
- 260.** Lailier, R., Grimont, F., Jones, Y., Sanders, P. and Brisabois, A. 2002. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathol Biol (Paris)* 50:361-368.



- 261.** Landeras, E., Mendoza, M.C.1998. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of PstI and SphI to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. *J. Med. Microbiol*, 47: 427–434.
- 262.** Landerman, W., Harteman, E., Doornenbal, P. 1996. *Salmonella*-isolatie uit pluimveemonsters: vergelijking diagnostic semi-solid Salmonella (Diasalm) en rappaport vassiliadis bouillon (rv) Detection of *Salmonella* spp. in poultry samples: Comparaison between Diagnostic Semi solid Agar (Diasalm) and Rappaport broth (rv). *De Ware (n)-Chemicus*, 26: 234-237.
- 263.** Lartigue, M. F., Poirel, L., Aubert, D. and Nordmann. P. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring béta-lactamase gene *blaCTXM* of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:1282-6.
- 264.** Laupland, K., Church, D., Vidakovich, J., Mucenski, M and Pitout, P. 2008. Community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: Importance of international travel. *J Infect*, 5:20-6.
- 265.** Lavilla, S., Gonzalez-Lopez, J., Miro, E., Dominguez, A., Llagostera, M., Bartolome, R., Mirelis, B., Navarro, F. and Prats, G. 2008. Dissemination of extended spectrum -lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J. Antimicrob. Chemother*, 61:1244.
- 266.** Lavollay, M., Mamlouk, K., Frank, T., Akpabie, A., Burghoffer, B., Ben Redjeb, S., Bercion, R., Gautier, V and Arlet, G.2006. Clonal dissemination of a CTX-M-15  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:2433-38.
- 267.** Lee, H., Yong, D., Yum, J.H., Roh, K.H., Lee, K., Yamane, K., Arakawa, Y., and Chong, Y. 2006. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinobacter baumannii* in Korea, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 56: 305-312.
- 268.** Le Hello, S, Hendriksen, R.S., Doublet, B., Fisher, I., Nielsen, E.M., et al. 2011. International spread of an epidemic population of *Salmonella* enterica serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis*, 204: 675–684.
- 269.** Le Minor, L. 1984. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900, 389, p. 427-458. In N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- 270.** Le Minor, L. and Popoff, M.Y.1987. "Designation of *Salmonella* enterica sp. nov. as the type and the only species of the genus Salmonella." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 465-468.
- 271.** Le Minor L. et Veron M. 1989. *Bactériologie médicale* 2ème Ed Flammarion Sciences Paris.
- 272.** Le Minor, L. & Richard, C. 1993. *Salmonella*. In *Methodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries*, pp. 27-54. Edited by I. Pasteur. Paris.

- 273.** Letellier, A., S. Messier, S., Paré, J., Ménard, J. and Quessy, S. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol*, 67:299- 306.
- 274.** Lever M.S. and Williams A., 1996. Cross-infection of chicks by airborne transmission of *Salmonella enteritidis* PT4. *Letters Appl. Microbiol*, 23: 347-349
- 275.** Levy, D.D., Sharma, B., Cebula, T.A., 2004. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother*, 48: 2355– 2363.
- 276.** Li, W.C., Huang, F.Y., Liu, C.P., Weng, L.C., Wang, N.Y., Chiu, N.C. & Chiang, C.S. 2005. Ceftiaxone resistance of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in Northern Taiwan attributable to production of CTX-M-14 and CMY-2 beta lactamases. *J. Clin. Microbiol*, 43: 3237-3243.
- 277.** Li, X, Payne, J.B., Santos, F.B., Levine, J.F., Anderson, K.E., et al. 2007. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. *Poult Sci*, 86: 591–597.
- 278.** Libby, S. J., Halsey, T. A., Altier, C., Potter, J., and Gyles, C. L. 2004. *Salmonella*, p. 143-167. In C. L. Gyles, J. F. Prewscott, J. G. Songer, and C.O. Thoen, (ed.), Pathogenesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing, Ames.
- 279.** Liebana, E., Guns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J. Clin. Microbiol*, 39: 3609–3616.
- 280.** Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C. et al., 2002. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J Clin Microbiol*, 40:4450-4456.
- 281.** Liebana, E., Garcia-Migura, L. et al., 2002a. "Multiple genetic typing of *Salmonella enteric* serotype typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland." *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12): 4450-4456.
- 282.** Liebana, E., Gibbs, M., Clouting, C., Barker, L., Clifton-Hadley, F. A., Pleydell, E., Abdalhamid, B., Hanson, N. D., Martin, L., Poppe, C. and Davies, R. H. 2004. Characterization of beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb Drug Resist*, 10:1-9.
- 283.** Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K., Clifton-Hadley, F., Teale, C., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E and Davies, R. 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol*, 44:1630- 1634.
- 284.** Lindstedt, B.A., Heir, E., Vardund, T., Kapperud, G.A. 2000. Variation of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction

- endonucleases, and assessment of the enzyme combination *Bgl*III-*Mfe*I for AFLP analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 189:19-24.
- 285.** Lindstedt, B.A., Vardund, T., Aas, L., Kapperud, G., 2004. Multiple-locus variablenumber tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*, 59: 163–172.
- 286.** Liou, G.F., Yoshizawa, S., Courvalin, P., and Galimand, M. 2006. Aminoglycoside resistance by *armA*-mediated ribosomal 16S methylation in human bacterial pathogens. *J. Mol. Biol.*, 359: 358-364.
- 287.** Livermore, D., and Hawkey, P. 2005. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 56:451.
- 288.** Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 59:165-74.
- 289.** Lo Ten-Foe, J. R., Van Oers, J. A. H., Kotsopoulos, A. M. M., & Buiting, A. G. M. 2007. Pulmonary colonization with *Salmonella enterica* serovar Kentucky in an intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*, 67: 105–107.
- 290.** Lukinmaa, S., Nakari, U.-M., Eklund, M., Siitonen, A., 2004. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS* 11211-12, 908–929.
- 291.** MacDonald, K.L., Cohen, M.L., Hargrett-Bean, N.T., Wells, J.G., Puhr, N.D., Collin, S.F., Blake, P.A. 1987. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. *JAMA*, 258: 1496- 1499.
- 292.** Majtán, V., Majtán, T., Majtán, J., Szabóová, M., & Majtánová, L. 2006. *Salmonella enterica* serovar Kentucky: Antimicrobial resistance and molecular analysis of clinical isolates from the Slovak Republic. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59: 358–362.
- 293.** Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3140–3145.
- 294.** Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. and Hoekstra, R.M. 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50: 882-889.
- 295.** Malorny, B., Schroeter, A. et al. 2001. "Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs." *Veterinary Research*, 32(2): 119-129.
- 296.** Mammìna, C., Talini, M., Pontello, M., Di Notto, AM. et Nastasi, A. 2003. Circulation clonale de *Salmonella enterica* sérovar Heidelberg en Italie ? Rapport de surveillance. *Eurosurveillance* vol. 8- n° 11, novembre 2003, pp : 222-225.

- 297.** Manie, T., Khan, S., Brozel, V. S., Veith, W. J., & Gouws, P. A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. *Letter Applied Microbiology*, 26: 253–258.
- 298.** Maré, L., Dicks, L.M.T. et Van der Walt, M.L. 2001. Characterisation of south african isolates of *S. Enteritidis* by phage typing numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *International journal of food microbiology*, 64: 237-245.
- 299.** Marshally , M.M., Hendricks, G.L., Kalama, M.A., Gehad, A.E., Abbas, A.O. and Patterson, P.H., 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci*, 83: 889-894.
- 300.** Martinez-Urtaza, J., Liebana, E., Garcia-Migura, L. et al., 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Appl Environ. Microbiol.* 70: 4030-4034.
- 301.** Mayer, L.W., 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 228–243.
- 302.** Mazurek, G.H., Reddy, V., Marston, B.J., Haas, W.H., and Crawford, J.T. 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2386-2390.
- 303.** Mead, P. S., Slutsker, L. et al. 1999. "Food-related illness and death in the United States." *Emerging Infectious Diseases*, 5 (5): 607-625.
- 304.** Mermin, J., Villar, R., Carpenter, J., Robert, L., Samaridden, A., Gasanova, L., Lomakina, S., Bopp, C., Hutwagner, L., Mead, P., Ross, B., Mintz, E. 1999. A massive epidemic of multidrug-resistant typhoid fever in Tajikistan associated with consumption of municipal water. *J. Infect. Dis*, 179: 1416-1422.
- 305.** Methner U., Diller, R., Reiche, R. and Böhland, K., 2006. Occurrence of *Salmonellae* in laying hens in different housing systems and conclusion for the control. *Münch. Tierartz. Wochenschr*, 119: 467-473.
- 306.** Messai, Y., Benhassine, T., Naim, M., Paul, G., Bakour, R. 2006. Prevalence of  $\beta$ -Lactams resistance among *Escherichia coli* isolates from a hospital in Algiers. *Rev. Esp. Quimoterap*, 19: 144-151.
- 307.** Messens W., Dubocage L., Grijspeerdt K., Heyndrickx M. and Herman L., 2004. Growth of *Salmonella* serovars in hen's egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiol*, 21: 25-32
- 308.** Meunier, J.R., Grimont, P.A., 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373–379.
- 309.** Meunier, D., Baucheron, D.S. et al. 2003. Florfenicol resistance in *Salmonella enterica* serovar Newport mediated by plasmid related to R55 from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 51 (4): 1007-9.

- 310.** McIlroy, S.G., McCracken, R.M., Neil, S.D. and O'Brien, J.J. 1989. Control, prevention and eradication of *Salmonella* Enteritidis infections in broilers and broiler breeder flocks. *Vet. Rec*, 125: 545-548.
- 311.** McEwen, S. A., and Fedorka-Cray, P.J. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*, 34 Suppl 3:S93-S106.
- 312.** McQuiston, J.R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., Fields, P.L. 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol*, 42: 1923-1932.
- 313.** Millemann, Y., Lesage, M.C., Chaslus-Dancla, E. and Lafont, J.P. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* 33:173–179.
- 314.** Millemann, Y., Lesage-Descauses, M.-C., Lafont, J.P., Chaslus-Dancla, E. 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 14: 129– 134.
- 315.** Millemann, Y. 1998. Pathogenicity of Salmonellae: Virulence factors and study models. *Vet. Res*, 29: 385-407.
- 316.** Millemann, Y., Gaubert, S. et al. 2000. "Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype typhimurium bovine isolates from farm to meat." *J Clin Microbiol*, 38 (6): 2204-9.
- 317.** Micheli, M.R., Bova, R., Pascale, E., D'Ambrosio, E., 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA RAPD method. *Nucleic Acids Res*, 22 : 1921–1922.
- 318.** Miriagou, V., Tassios, P.T. et al. 2004. "Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*." *Int J Antimicrob Agents*, 23 (6): 547-55.
- 319.** Mitchell, M., Shane, S. 2000. Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas (*Iguana iguana*) and their environment. *Prev. Vet. Med*, 45: 297-304.
- 320.** Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T., and Arakawa, A. 1997. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. *Avian Dis*, 41: 296-303.
- 321.** Mølbak, K. and Neimann, J. 2002. "Risk factors for sporadic infection with *salmonella enteritidis*, Denmark, 1997-1999." *American Journal of Epidemiology*, 156 (7): 654-661.
- 322.** Molbak, K. 2005. "Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens." *Clin Infect Dis*, 41 (11): 1613-20.
- 323.** Molla, B., Berhanu, A., Muckle, A., Cole, L., Wilkie, E., Kleer, J., et al. 2006. Multidrug resistance and distribution of *Salmonella* serovars in slaughtered pigs. *Journal of Veterinary Medicine*. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health, B53, 28–33.

- 324.** Mollenhorst, H., Van Woudenberg, C. J., Bokkers, E. G. M., & de Boer, I. J. M. 2005. Risk factors for *Salmonella* Enteritidis infections in laying hen. *Poultry Science*, 84: 1308–1313.
- 325.** Morris, D.B., Whelan, M., Corbett-Feney, G., et al., 2006. First of Extended-Spectrum beta-lactamases producing *Salmonella enterica* isolates in Ireland. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 50(4): 1608-1609.
- 326.** Mortimer, C.K., Peters, T.M., Gharbia, S.E., Logan, J.M., Arnold, C., 2004. Towards the development of a DNA-sequence based approach to serotyping of *Salmonella enterica*. *BMC Microbiol*, 4, 31.
- 327.** Moubareck, C., Lecso, M., Pinloche, E., Butel, M.J. and Doucet-Populaire, F. 2007. Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of beta-lactam resistance among *Enterobacteriaceae* in the gnotobiotic mouse digestive tract. *Appl Environ Microbiol*, 73:855-60.
- 328.** Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evolut*, 14: 389–394.
- 329.** Mullner, P., Jones, G. et al. 2009. "Source attribution of food-borne zoonoses in New Zealand: A modified hald model." *Risk Analysis*, 29(7): 970-984.
- 330.** Mulvey, M. R., et al. 2005. Molecular characterization of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* from Canadian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49:358–365.
- 331.** Mumma, G.A., Griffin, P.M., Meltzer, M.I., Braden, C.R., Tauxe, R.V. 2004. Egg quality assurance programs and egg-associated *Salmonella* enteritidis infections, United States. *Emerg. Infect. Dis*, 10, 1782-1789.
- 332.** Munday, C.J., Xiong, J., Li, C. Et al., 2004. Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People's Republic of China. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23: 175-80.
- 333.** Murase, T., Nakamura, A., Matsushima, A. and Yamai, S. 1996. An epidemiological study of *Salmonella* enteritidis by pulsed field gel electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak. *Microbiology and Immunology*, 11: 873–875.
- 334.** Murray, C. 2000. Environmental aspects of *Salmonella*. In: Wray C., Wray A. (Eds), *Salmonella in domestic Animals*. CABI Publishing: Oxon, 265-283.
- 335.** Musgrove, M. T. & Jones, D. R. 2005. Recovery of *Salmonella* from nest run egg cart shelves. *Poultry Science*, 84(Suppl.), 77.
- 336.** Naas, T., Lezzar, A., Bentchouala, C., Smati, F., Scheftel, J., Monteil, H. and Nordmann, P. 2005. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Senftenberg isolates producing CTX-M beta-lactamases from Constantine, Algeria. *J Antimicrob Chemother*, 56: 439-440.
- 337.** Naas T, Bentchouala, C., Lima, S., et al. 2009. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* Senftenberg isolates from Algeria. *J Antimicrob Chemother*, 64: 866–8.

- 338.** Naas, T., Bentchouala, C., Cuzona, G., Yaou, S., Lezzar, A., Smati, F., Nordmann, P. 2011. Outbreak of *Salmonella* enterica serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int.J. Antimicrob. A*, 38: 135–8.
- 339.** Nadjar, D., Rouveau, M., Verdet, C., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Lagrange, P.H., Philippon, A., and Arlet, G. 2000. Outbreak of *Klebsiella pneumonia* producing transferable AmpC-type beta-lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS. Microbiol. Lett*, 187: 35-40.
- 340.** Nakamura, M., Tagaki, M., Takahashi, T., Suzuki, S., Sato, S. and Takehara, K., 1997. The effect of the flow of air on horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in chickens. *Avian Dis*, 41: 354-360.
- 341.** Namata, H., Méroc, E., Aerts, M., Faes, C., Cortinas Abrahantes, J., Imberechts, H., et al. 2008. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 83: 323–336.
- 342.** Nayak, R., Stewart, T., Wang, R.F., Lin, J., Cerniglia, C.E., Kenney, P.B. 2004. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int. J. Food Microbiol*, 91: 51–62.
- 343.** Nataro, J. P., Bopp, C.H., Fields, P.I., Kaper, J.B. and Strockbine, N.A. 2007. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*, p. 670-687. In P. R. Murray, E.J.
- 344.** Nauerby, B., Pedersen, K., Dietz, H.H., Madsen, M., 2000. Comparison of Danish isolates of *Salmonella* enterica serovar enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs *Erinaceus europaeus* and humans by plasmid profiling and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol*, 38: 3631–3635.
- 345.** Nijsten, R., London, N., Van den Bogaard, A and Stobberingh, E. 1995. *In-vivo* transfer of resistance plasmids in rat, human or pig-derived intestinal flora using a rat model. *J Antimicrob Chemother*, 36: 975-85.
- 346.** Nijsten, R., London, N., Van den Bogaard, A. and Stobberingh, E. 1996. Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolated from faecal samples of pig farmers and pigs. *J Antimicrob Chemother*, 37:1131-1140.
- 347.** Nisbet, D.J., et Ziprin, R.L. 2001. Salmonellosis in animals. In: Foodborne Disease Handbook. Second edition. Vol. 1: Bacterial Pathogens. edited by Hui, Y.H. et col. Marcel Dekker Inc., New York-Basel.:265-284.
- 348.** Nivas, S.C., York, M.D., Pomeroy, B.S. 1976. In vitro and in vivo transfer of drug resistance for *Salmonella* and *Escherichia coli* strains in turkeys. *Am J Vet Res*. 37(4):433-7.
- 349.** Oboegbulem, S. 1993. Comparaison of two enrichment media and three selective media for isolation of *Salmonellae* from fresh chicken carcass rinse fluids and sewer swabs. *Int. J. Micribiol*, 18: 167-170.
- 350.** Ochman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299-304.

- 351.** Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K. and Baba E., 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Dis*, 45: 61-69.
- 352.** Olive, D., Bean, P. 1999. Principales and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol*, 37: 1661-1669.
- 353.** Oliver, S. P., Jayarao, B.M. et al. 2005. "Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications." *Foodborne Pathog Dis*, 2(2): 115-29.
- 354.** Olsen, J.E., Brown, D.J., Skov, M.N., Christensen, J.P., 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet. Q*, 15: 125-135.
- 355.** Olsen, J.E., Skov, M.N., Angen, O., Threlfall, E.J., Bisgaard, M., 1997. Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE. *Microbiology*, 143: 1471-1479.
- 356.** Olsen, J.E., 2000. Molecular typing of *Salmonella*. In: Wray, C., Wray, A. (Eds.), *Salmonella*.
- 357.** Olsen, I., Hasman, H., and Aarestrup, F.M. 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug. Resist*, 10: 334-340.
- 358.** Omwandho C.O.A. and Kubota T., 2010. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: a mini-review of contamination routes and limitations to effective control. *JARQ*, 44: 7-16.
- 359.** Ozanne, G., Bedard, P., Ducic, S. and Panisset, J., 1987. Antibiotic multiresistance among coliforms isolated from the gut of swine and abattoir workers: evidence of transfer from animal to man. *Can. J. Public Health*, 78: 340-344.
- 360.** Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., and Altwegg, M. 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol*, 3: 253-255. 176.
- 361.** Pang, T., Levine, M. M., Ivanoff, B., Wain, J. & Finlay, B. B. 1998. Typhoid fever--important issues still remain. *Trends Microbiol* 6, 131-133.
- 362.** Pang, T.C., Chiu, T.H., Helmuth, R., Schroeter, A., Guerra, B., Tsen, H.Y. 2007. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of food Microbiology*, 116: 305-312.
- 363.** Pang, J. C., Chiu, T. H., Chiou, C. S., Schroeter, A., Guerra, B., Helmuth, R., et al. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis, Plasmid profiles and phage types for human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 1472-1483.



- 364.** Parry, C. M., and Threlfall, E.J. 2008. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis*, 21:531-538.
- 365.** Peña, C., Gudiol, C., Calatayud, L., Tubau, F., Domínguez, M., Pujol, M., Ariza, J., and Gudiol, F. 2008. Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among hospitalised patients: factors influencing mortality. *J Hosp Infect*, 68:116-122.
- 366.** Persoons, D., Dewulf, J., Smet, A., Herman, L., Heyndrickx, M., Martel, A., Catry, B., Butaye, P. and Haesebrouck, F. 2009. Prevalence and persistence of antimicrobial resistance in broiler and indicator bacteria. *Microb. Drug Resist*, 16: 67-74.
- 367.** Peters, T.M., Maguire, C., Threlfall, E.J., Fisher, I.S., Gill, N., Gatto, A.J. 2003. Euro Surveill. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for Salm-gene project. Feb. 8 :46-50.
- 368.** Piddock, L.J.V. 1996. Does the use of antibiotics in animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 1-3.
- 369.** Pieskus, J., Milius, J., Michalskiene, I., Zagrebneviene, G. 2006. The distribution of *Salmonella* serovars in chicken and humans in Lithuania. *J. Vet. Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53 (1): 12-6.
- 370.** Pires, S. M., Nichols, G. et al. 2008. *Salmonella* source attribution in different European countries. 21st International ICFMH Symposium: "Evolving Microbial Food Quality and Safety". Aberdeen.
- 371.** Pires, S. M., Evers, E.G. et al. 2009. "Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources." *Foodborne Pathog Dis*, 6 (4): 417-24.
- 372.** Plummer, R.A.S., Blissett, S.J., Dodd, C.E.R. 1995. Salmonella Contamination of Retail Chicken Products Sold in the UK. *J. Food. Protect*, 58: 843-846.
- 373.** Forshell, L. and Wierup, M., 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. Sci. Tech. OIE* 25: 541-554.
- 374.** Poirel, L., Decousser, J.W., and Nordmann, P. 2003. Insertion sequence *ISEcpIB* is involved in expression and mobilization of a *bla<sub>CTX-M</sub>* beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 47: 2938-2945..
- 375.** Popoff, M.Y. and Le Minor, L., 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, 1997.
- 376.** Poppe, C., 2000. *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: Wray C. and Wray A. *Salmonella* in domestic animals. CAB International, New York, US. 107-132.
- 377.** Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., and Gheesling, L.L. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, 155: 568-570.

- 378.** Prescott, J.F. 1999. Antimicrobial Chemotherapy, in *Veterinary microbiology*, D.C. Hirsh, Editor. Blackwell Science, Inc. p. 29.
- 379.** Prescott, J. 2000. Antimicrobial Drugs: Miracle Drugs or Pig Feed. *Adv Pork Prod*, 11:37-45.
- 380.** Rabsch, W., Hargis, B.M., Tsohis, R.M., Hinz, K.H., Tschäpe, H. and Bäumlner A.J., 2000. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum from poultry. *Emerging Infect. Dis*, 6: 443-448
- 381.** Rabsch, W., Tschäpe, H. and Bäumlner, A.J., 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect*, 3: 237-247.
- 382.** Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, L. G. Adams, and A. J. Baumler. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*, 70:2249-2255.
- 383.** Ramdani-Bouguessa, N., Mendonca, N., Leitão, J., Alouache, S., Tazir, M., Gautier, V., et al. 2006. CTX-M-3 and CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* from a hospital in Algiers, Algeria. *J Clin Microbiol*, 44:4584–6.
- 384.** Reeves, M. W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., and Farmer 3rd, J.J. 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol*, 27:313-320.
- 385.** Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis*, 3: 59–67.
- 386.** Rice, L. B., and Bonomo, R.A. 2007. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, p. 1114-1145. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th Edition, vol. 1. *ASM Press*, Washington, DC.
- 387.** Riley, L.W., Cohen, M.L., Seals, J.E., Blaser, M.J., Birkness, K.A., Hargrett, N.T., Martin, S.M., Feldman, R.A. 1984. Importance of host factors in human salmonellosis caused by multiresistant strains of *Salmonella*. *J. Infect. Dis*, 149: 878-883.
- 388.** Roberts J.A., Cumberland P., Sockett P.N., Wheeler J., Rodrigues L.C., Sethi D. and Roderick P.J., 2003. The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiol. Infect.* 130: 1-11
- 389.** Rodrigue, D.C.R., Tauxe, R.V., and Rowe, R., 1990. International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol. Infect*, 105: 21-27.
- 389.** Rose, N., Beaudou, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., 1999. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev. Vet. Med*, 39: 265-277.

- 390.** Rose, N., F. Beaudreau, P., Drouin, J.Y., Toux, V., Rose and Colin, P. 2000. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleaning and disinfection in French broiler-chicken houses. *Prev. Vet. Med*, 44: 9-20.
- 391.** Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J. and Mazel, D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:652-7.
- 392.** Rowe-Magnus, D. A., and Mazel, D. 2001. Integrations: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol*, 4:565-9.
- 393.** Ruiz, M., Rodriguez, J.C. et al. 2004. "Available options in the management of non-typhi *Salmonella*." *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 5(8): 1737-1743.
- 394.** Ryder, R.W., Blake, P.A., Murlin, A.C., Carter, G.P., Pollard, R.A., Merson, M.H., Allen, S.D., Brenner, D.J. 1980. Increase in antibiotic resistance among isolates of *Salmonella* in the United States, 1967-1975. *J. Infect. Dis*, 142: 485-491.
- 395.** Sahlstrom, L., De Jong, B. et al. 2006. "*Salmonella* isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis." *Lett Appl Microbiol*, 43(1): 46-52.
- 396.** Salyers, A. A., and Whitt, D.D. 2002. How bacteria become resistant to antibiotics, p. 168-184. In *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. ASM Press, Washington, D.C.
- 397.** Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1-162.
- 398.** Sanchez, S., Hofacre, C.L., Lee, M.D., Maurer, J.J., and Doyle, M.P. 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *J Am Vet Med Assoc*, 221:492-497.
- 399.** Santé Canada. (2005). *Prévention de la salmonellose*. Retrieved October 23, 2009, from [http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/alt\\_formats/pacrb-dgapcr/pdf/iyhvsv/food-aliment/salmonella-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/alt_formats/pacrb-dgapcr/pdf/iyhvsv/food-aliment/salmonella-fra.php).
- 400.** Santos, R. L. & Baumber, A. J. (2004). Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294: 225-233.
- 401.** Schaberg, D.R., Tompkins, L.S., Falkow, S., 1981. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol*, 13: 1105-1108.
- 402.** Schauser, K., Olsen, J.E., and Larsson, L.I. 2004. Immunocytochemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. *J Med Microbiol*, 53:691-695.
- 403.** Schicklmaier, P., and Schmieger, H. 1995. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella* Typhimurium complex. *Appl Environ Microbiol*, 61:1637-1640.

- 404.** Schlosser, W.D., Henzler, D.J., Mason, D., Kradel, L., Shipman, S., Trock, S., Hurd, S.H., Hogue, A.T., Sischo, W. and Ebel, E., 1999. The *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Pilot Project. In: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals. A.M. Saeed, R.K. Gast, M.E. Potter and P.G. Wall (eds.) Iowa State University Press, Ames, IA. pp 353-365.
- 405.** Schroeder, S.A., Terry, P.M., Bennett, J.V. 1968. Antibiotic resistance and transfer factor in *Salmonella*, United States 1967. *JAMA*, 205: 903-906.
- 406.** Schwarz, S., et Liebisch, B. 1994. Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis for the identification of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium vaccine strain zoo.saloral H and its identification from wild type strains of the same serovar. *ZBL.BaKt*, 281: 442-450.
- 407.** Schwaiger, K., Schmied, E.-M.V. and Bauer, J., 2008. Comparative analysis of antibiotic resistance characteristics of Gram-negative bacteria isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health*, 55: 331-341.
- 408.** Schwaiger, K., Schmied, E.-M.V. and Bauer, J., 2010. Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health*, 57: 171-180.
- 409.** Schwarz, S., and Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*, 32:201-225.
- 410.** Schwartz, S., Cloeckaert, A., and Roberts, M.C. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents, p. 73-98. *In F. M.*
- 411.** Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A. and Musser, J.M. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infection and Immunity*, 58: 2262-2275.
- 412.** Shelobolina, E. S., Sullivan, S. A., O'Neill, K. R., Nevin, K. P. & Lovley, D. R. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 70, 2959-2965.
- 413.** Shivaprassad, H.L., Timoney, J.F., Morales, S., Lucio, B., Baker, R.C. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Dis*, 34: 548-557.
- 403.** Shivaprassad, H.L. 2003. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Diseases of poultry. 11th ed. eds. Saif, Y.M. et col. Iowa state press. USA.: 567-582.
- 414.** Schutze, G.E., Fawcett, H.A., Lewno, M.J., Flick, E.L. and Kirby, R.S., 1996. Prevalence of *Salmonella enteritidis* in poultry shell eggs in Arkansas. *South. Med. J*, 89: 889-891.

- 415.** Sirinavin, S., P. Jayanetra, and A. Thakkinstian. 1999. Clinical and prognostic categorization of extraintestinal nontyphoidal *Salmonella* infections in infants and children. *Clin Infect Dis*, 29:1151-1156.
- 416.** Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., and Tauxe, R.V. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot*, 67:2342-2353.
- 417.** Skov, M.N., Carstensen, B., Tornøe, N., Madsen, M. 1999. Evaluation of sampling methods for the detection of *Salmonella* in broiler flocks. *Journal of applied Microbiology*, 86: 695–700.
- 418.** Skov, M.N., Spencer, A.G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B., Madsen, M., 2004. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilica *Campylobacter* spp. between broiler flocks. *Avian Dis*, 48: 9–18.
- 419.** Speedy, A.W. 2003. Global production and consumption of animal source foods. *J Nutr*, 133(11 Suppl 2):4048S–53.
- 420.** Soussy, C., J., Cavallo, H., Chardon, C., Chidiac, P., Choutet, P., Courvalin, H., Dabernat, H., Drugeon, L., Dubreuil, and Goldstein, F. 2007. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2007, Ed. Janvier 2007. Société Française de Microbiologie, Paris, France.
- 421.** Spratt, B.G., 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol*, 2: 312–316.
- 422.** Stanley, J., Burnens, A., Powell, N., Chowdry, N., Jones, C., 1992. The insertion sequence IS200 fingerprints chromosomal genotypes and epidemiological relationships in *Salmonella* Heidelberg. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2329–2336.
- 423.** Steen, S., and Webb, P. 2007. ESBL-producing bacteria isolated from companion animals. *Vet Rec*, 161:795.
- 424.** Steinert, L., Virgil, D., Bellemore, E., Williamson, B., Dinda, E., Harris, D., Scheider, D., Fanella, L., Bogacki, V., Liska, F., Birkhead, G.S., Guzewich, J.J., Fudala, J.K., Kondracki, S.F., Shayegani, M., Morse, D.L., Dennis, D.T., Healey, B., Tavriss, D.R., Duffy, M. and Drinnen, K., 1990. Update: *Salmonella* Enteritidis infections and grade A shell eggs: United States. *MMWR* 38: 877-880.
- 425.** Stenzel, T., Tykalowski, B., Mazur-Lech, B. and Koncicki, A., 2008. Infections in wildlife birds – results of a serological screening. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 52: 63-66.
416. Stoycheva, M. V. and Murdjeva, M.A. 2006. "Antimicrobial therapy of salmonellosis--current state and perspectives." *Folia medica*, 48(1): 5-10.
- 426.** Stubbs, A.D., Hickman-Brenner, F.W., Caüeron, D.N., et Farmer III, J.J. 1994. Differentiation of *Salmonella* Enteritidis phage type 8: Evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profile antibiotic susceptibility patterns and biotyping. *Journal of clinical microbiology*, 32: 199-201.

- 427.** Struelens, M.J., et members of the European study group on epidemiological markers (ESGEM) .1996.Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection*, 2,pp: 2-11.
- 428.** Struelens, M.J., De Gheldre,Y. et Deplano, A.1998. Comparative and library epidemiological typing systems: Outbreak investigations versus surveillance systems. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19,pp: 565-569.
- 429.** Su, L. H., C. Chu, C., Cloeckart, A., and Chiu, C.H. 2008. An epidemic of plasmids? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 52:155-68.
- 430.** Sunagawa H., Ikeda T., Takeshi K., Takada T., Tsukamoto K., Fujii M., Kurokawa M., Watabe K., Yamane Y. and Ohta H. 1997. A survey of *Salmonella* enteritidis in spent hens and its relation to farming style in Hokkaido, Japan. *International Journal of Food Microbiology* Volume 38, Issues 2-3, 16, Pages 95-102
- 431.** Swaminathan, B., Barrett, T.J., 1995. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious disease. *J. Microbiol. Methods*, 2: 129–139.
- 432.** Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis*, 7, 382–389.
- 433.** Swanson, S. J., Snider, C. et al. 2007. "Multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype Typhimurium associated with pet rodents." *N Engl J Med*, 356(1): 21-8.
- 434.** Tamada, Y., Nakaoka, Y., Nishimori, K., Doi, A., Kumaki, T., Uemura, N., Tanaka, K., Makino, S.I., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Uchida, I., 2001. Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol*, 39: 1057– 1066.
- 435.** Tauxe, R. V. 1997. "Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge." *Emerging Infectious Diseases*, 3(4): 425-434. tel-00485441.
- 436.** Telzak, E.E., Budnick, L.D., Greenberg, M.S., Blum, S., Shayegani, M., Benson, C.E., Schlitz, S. 1990. A nosocomial outbreak of *Salmonella* enteritidis infection due to the consumption of raw eggs. *N. Engl. J. Med*, 323: 394-397.
- 437.** Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33:2233-2239.
- 438.** Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. et coll. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection control and Hospital Epidemiology*,18,pp: 426-439.
- 439.** Thong, K.L., Ngeow, Y.F., Altwegg, M., Navaratnam, P., Pang, T. 1995. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J. Clin. Microbiol*, 33: 1070-1074.

- 440.** Thorns, J., Woodward, M. 1998. Application of Random Amplified Polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* typhi and other *Salmonella* species. *J. Appl. Microbiol*, 85: 693-702.
- 441.** Thaxton, P., Wyatt, R.D., and Hamilton, P.B., 1974. The effect of environmental temperature on paratyphoid infection in the neonatal chicken. *Poult. Sci*, 53: 88-94.
- 442.** Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R., Rowe, B., 1990. Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 49 of *Salmonella* typhimurium in outbreak investigations. *Epidemiol. Infect*, 104: 243–251.
- 443.** Threlfall, E.J., Hampton, M.D., Chart, H., et Rowe, B. 1994. Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans. Poultry and eggs. *Epidemiology Infection*, 112: 25-31.
- 444.** Threlfall, E. 2000. Epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother*, 46: 7-10.
- 445.** Threlfall, E.J., Rowe, B. et Ward, L.R. 1989. Subdivision of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol. Infect*. 102: 459-465.
- 446.** Timoney, J.F., Shivaprasad, H.L., Baker, R.C., Rowe, B. 1989. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Vet. Rec*, 125: 600-601.
- 447.** Todd, E. C., Greig, J.D., et al. 2008. "Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 5. Sources of contamination and pathogen excretion from infected persons." *J Food Prot* 71(12): 2582-95.
- 448.** Touati, A., Benallaoua, S., Gharout, A., Amar, A.A., Le Magrex Debar, E., Brasme, L., et al. First report of CTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Kedougou recovered from an Algerian hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2008, 27: 479–80.
- 449.** Towner, K., Et Grundmann, H., 2001. dans:Dijkshoorn,L., Towner, K.J. et Struelens, M. 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier Science.Amsterdam, the Netherlands.pp: 135-158.
- 450.** Tsai, T.Y., Luo, W.C., Wu, F.T., Pan, T.M., 2005. Molecular subtyping for *Escherichia coli* O157: H7 isolated in Taiwan. *Microbiol. Immunol.* 49, 579–588.
- 451.** Turner, P.J. 2005. Trends in antimicrobial susceptibilities among bacterial pathogens isolated from patients hospitalized in European medical centres: 6-year report of the MYSTIC Surveillance Study (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, 51: 281-9.
- 452.** United States Department of Agriculture; Economic Research Service; The Economics of Food, Farming, Natural Resources, and Rural America. 2009. *Data sets: Foodborne illness cost calculator*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>.

- 453.** Usera, M.A., Popovic, T., Bopp, C.A. and Strockbine, N.A. 1994 Molecular subtyping of *Salmonella* enteritidis phage type 8 strains from the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 194–198.
- 454.** Usera, M.A., Aladuena, A., Gonzalez, R., De la Fuente, M., Garcia-Pena, J., Frias, N. and Echeita, M.A. 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *J. Food. Prot.*, 65: 768-773.
- 455.** Uyttendaele, M. R., Debevere, J.M., et al. 1998. "Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium." *International Journal of Food Microbiology*, 40(1-2): 1-8.
- 456.** Uzzau S., Brown D.J., Wallis T., Rubino S., Leori G., Bernard S., Casadesus J., Platt D.J., and Olsen J.E. 2000 : Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica A review *Epidemiol. Infect.*, 125: 229-255.
- 457.** Valancony, H., Fournier, G., Drouin, P., Toux, J.Y., Colin, P.. 2001. Disinfection of cage layer houses contaminated with *Salmonella* Enteritidis. *British Poultry Science*, 42: 539-40.
- 458.** Valdezate, S., Vidal, A., Herrera-Leon, S. et al. 2005. *Salmonella* Derby clonal spread from pork. *Emerg Infect Dis*, 11: 694-698.
- 459.** Valverde, A., Grill, F., Coque, T., Pintado, V., Baquero, F., Canton, R. and Cobo, J. 2008. High rate of Intestinal Colonization with Extended Spectrum  $\beta$ - Lactamases Producing Organisms in Household Contacts of Infected Community Patients. *J Clin Microbiol.*
- 460.** Van de Giessen, A.W., Bouwknegt, M., Dam-Deisz, W.D.C., Van Pelt, W., Wannet, W.J.B. and Visser, G., 2006. Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in The Netherlands, *Epidemiol. Infect.*, 134: 1266-1275.
- 461.** Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13 (Suppl. 3), 1–46.
- 462.** Van den Bogaard, A., N. London, C. Driessen, and E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers, *J Antimicrob Chemother*, 47: 763-771.
- 463.** Van den Bogaard, A.E., Hazen, M. et al. 2002. Effects of flavophospholipol on resistance in fecal *Escherichia coli* and enterococci of fattening pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(1): 110-8.
- 464.** Van den Brandhof, W.E., De Wit, G.A., De Wit, M.A.S. and Van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Costs of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.*, 132: 211-221.



- 465.** Van der Velden, A. W., Lindgren, S.W., Worley, M.J. and Heffron, F. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun*, 68:5702-5709.
- 466.** Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., De Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., De Kruif, A. and Dewulf, J., 2009. Faecal sampling underestimates the actual prevalence of *Salmonella* in laying hen flocks. *Zoonoses Public Health*, 56: 471-476.
- 467.** Van Hoorebeke, S., Van Immerseel, F., Schulz, J., Hartung, J., Harisberger, M., Barco, L., Ricci, A., Theodoropoulos, G., Xylouri, E., De Vylder, J., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F., De Kruif, A. and Dewulf J., 2010. Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for *Salmonella* infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Prev. Vet. Med*, 94: 94-100.
- 468.** Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans F., Bohez, L., Boyen F., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R., 2004. Intermittent Long-Term Shedding and Induction of Carrier Birds after Infection of Chickens Early Posthatch with a Low or high Dose of *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci*, 83: 1911-1916.
- 469.** Van Ooyen, A. 2001. Theoretical Aspects of pattern Analysis. dans: New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Edited by Dijkshoorn, L.; Towner, K.J. Et Struelens, M. *Elsevier science*; pp:31-45.
- 470.** Varnam, A., Evans, M. 1996. Chapter 4- *Salmonella*. In: Varnam A., Evans, M. (Eds) *Foodborne pathogens- an illustrated text 2<sup>nd</sup> ed.* Manson Publishing: London, 51-86.
- 471.** Versalovic, J., Koeth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823-6831.
- 472.** Vimal, D., Khullar, M., Gupta, S., Ganguly, N., 2000. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Mol. Cell. Biochem*, 204: 107-17.
- 473.** Virgin, F.W., Kubota, K.A., Ribot, E.M., et al., 2002. PFGE diversity among *Salmonella Heidelberg* in the United States. *International Conference on Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, GA, March 24-27.
- 474.** , A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. and Tauxe, R.V. 2004. For the Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin. Infect. Dis*, 38(S3): S127-134.
- 475.** Wachsmuth, I.K., et Kiehlauch, J.A. 1991. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne diarrheal diseases. *International journal of food microbiology*, 12:77-90.
- 476.** Wain, J., Hoa, N. T. Chinh, H. Vinh, M. J. Everett, T. S., Diep, N. P., Day, T., Solomon, N. J., White, L. J., Piddock, and Parry, C.M., 1997. Quinolone-resistant *Salmonella Typhi* in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis*, 25:1404-1410.

- 477.** Wallis, T.S., and Barrow, P., 2006. *Salmonella* epidemiology and pathogenesis in food producing animals. EcoSal Module 8.6.2.1. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Microbiology. EcoSal website,ASM Press. <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp>.
- 478.** Walsh, C. 2003. Antibiotics actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology* press, Washington, D. C.
- 479.** Wegener, H.C., Hald, T., Wong, D.L.F., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P. and Mólbak, K., 2003. *Salmonella* Control Programs in Denmark. *Emerg. Infect. Dis*, 9: 747-780.
- 480.** Weiner, M.P., Hudson, T.J., 2002. Introduction to SNPs: discovery of markers for disease. *Biotechniques* (Suppl. 4–3).
- 481.** Walker, R., Kinde, H., Anderson, R., Brown, A. 2001. Comparaison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swabs sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. *Int. J. Food Microbiol*, 67: 123-129.
- 482.** Waltman, W. 2000. Methods for the cultural isolation of *Salmonella*. In: Wray C., Wray A. (Eds). *Salmonella* in domestics Animals. *CABI Publishing*: Oxon, 355-372.
- 483.** Weide-Botjes, M., Kobe, B. and Schwarz, S. 1998. Inter- and intraphage type differentiation of *Salmonella* enterica subsp. Enteric serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, 288: 181–193.
- 484.** Weinberger, M., Andorn, N., et al. 2004. "Blood invasiveness of *Salmonella* enterica as a function of age and serotype." *Epidemiol Infect*, 132(6): 1023-8.
- 485.** Weill, F. X., Lailier, R.K., Praud, A., Kerouanton, L., Fabre, A., Brisabois, A., Grimont, P.A. and A. Cloeckaert, A., 2004. Emergence of extended-spectrum-béta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol*, 42:5767-73.
- 486.** Weill, F. X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Polomack, L., and Grimont, P.A., 2006. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol*, 44:700-708.
- 482.
- 487.** Weill, F. X. 2008. "*Salmonella* : épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques." *Revue Francophone des Laboratoires*, 400: 37-47.
- 488.** White W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279: 996–7.
- 489.** WHO Global Salm-Surv. 2009. *Progress report (2000-2005): Building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response/WHO GlobalSalm-Surv*. Retrieved October 23, 2009, from. <http://www.who.int/salmsurv/links/GSSProgressReport2005.pdf>

- 490.** Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 6531–6535.
- 491.** Winokur, P.L., A. Brueggemann, D. DeSalvo, L. Hoffmann, M. Apley, E. Uhlenhopp, M. Pfaller, and G. Doern. 2000. Animal and Human Multidrug- Resistant, Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Isolates Expressing a Plasmid- Mediated CMY-2 AmpC  $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:2777- 2783.
- 492.** Winokur, P.L., Vonstein, D.L. et al. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 45 (10): 2716-22.
- 493.** Wiuff, C., Lykkesfeldt, J. et al. 2003. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci*, 75 (3): 185-93.
- 494.** Wong, R.A., Tellez, G.I., Valladares, J. and Hargis, B.M., 1996. Pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum on an experimental infection of one-day-old broiler chicks. *Poult. Sci*, 75: 44.
- 495.** Woodward, D. L., Khakhria, R., et al. 1997. "Human salmonellosis associated with exotic pets." *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11): 2786-2790.
- 496.** Woodward, M.J., Gettinby, G., Breslin, M.F., Corkish, J.D., and Houghton, S., 2002. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella* enterica subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Path*, 31: 383-392.
- 497.** World Health Organization. 2003. *Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance : Scientific assessment*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>.
- 498.** World Health Organization – International Food Safety Authorities Network, 7 March. 2008. Antimicrobial Resistance from Food Animals. INFOSAN Information Note No. 2/2008
- 499.** Wray, C., Hedges, R.W. et al. 1986. Apramycin and gentamicin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonellas* isolates from farm animals. *J. Hyg (Lond)*, 97 (3): 445-56.
- 500.** Yamane, K., Wachino, J., Doi, Y., Kurokawa, H., Arakawa, Y., 2005. Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg Infect Dis*, 11:951–3.
- 501.** Yan, J. J., et al. 2004. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* isolates from two Taiwanese hospitals. *J. Antimicrob. Chemother*, 54:1007–1012.
- 502.** Zhao, S., White, D.G., McDermott, P.F., Friedman, S., English, L., Ayers, S., Meng, J., Maurer, J.J., Holland, R., and Walker, R.D., 2001. Identification and expression of cephamycinase *bla*CMY genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 3647-50.
- 503.** Zhang, W., Jayarao, B.M., Knabel, S.J., 2004. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 : 913–920.

**504.** Zhang, W., Qi, W., Albert, T.J., Motiwala, A.S., Alland, D., Hyytia-Trees, E.K., et al., 2006. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Res*, 16, 757–767.

**505.** Zheng, H., Sun, Y., Mao, Z., Jiang, B., 2008. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 53: 368–374.

**506.** Zhou, D. and Galán, J., 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of typeIII secreted effector proteins. *Microbes Infec*, . 3: 1293-1298.

### **Références Rajoutés.**

**507.** Bouwknecht, M., Dam Deisz, D.C., Van Pelt, J.B., Visser, G., Van de Giessen, A.W. 2004. Surveillance of zoonotic bacteria in farm animals in the Netherlands. Results from January 1998 until December 2002. *RIVM (Netherlands National Institute for Public Health and the Environment)*, 1–13.

**508.** Collard, J.M., S. Bertrand, K. Dierick, C. Godard, C. Wildemauwe, K. Vermeersch, J.F.V.A.N.I. Duculot, F. Pasmans, H. Imberechts, C. Quinet. 2007. Drastic decrease of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. *Epidemiol. Infect.* 1–11.

## 7. Annexes

**7.1. Annexe 1.** A questionnaire-based, transversale study of *Salmonella* contamination in Algerian laying hen flocks (18 laying hen flocks, Annaba and Eltarf). The number of questions per subset is indicated in brackets.

<b>Questions related to the farm characteristics (n= 14)</b>
Number laying-houses on the farm 1 2 or more
Number of poultry-houses on the farm 1 2 or more
Presence of other animal productions on the farm Yes No
Other avian husbandry under the same proprietor Yes No
Presence of backyard poultry on the farm yes no
Farm afield to the egg-production cooperative yes no
Farm adherent to the official sanitary program yes no
Easy access to farm out staff (presence of fence) yes no
Presence of future laying hens on the farms yes no
Livestock insured in case of natural disaster or notifiable diseases yes no
Farm adherent to the selling commercially cooperative of table eggs yes No
Domestics and other animals species access on the farm (dogs, cats, sheep, cattle, etc) yes no
Distance between the house studied and the nearest poultry farm

<p>≤ 500 m</p> <p>&gt; 500m</p>
<p>Presence of a dairy farm &lt; 2Km</p> <p>yes</p> <p>no</p>
<p><b>Questions related to the poultry-house characteristics (n=29)</b></p> <p>Holding size</p> <p>2400-3100</p> <p>4800-7200</p> <p>10000-30000</p>
<p>Age of the building (in years)</p> <p>[1- 5[</p> <p>[5-10[</p> <p>&gt; 10</p> <p>unknown</p>
<p>Age of infrastructure</p> <p>[1- 5[</p> <p>&gt; 5</p> <p>unknown</p>
<p>Change room at the entrance</p> <p>yes</p> <p>no</p>
<p>Type of henhouse</p> <p>conventional battery</p> <p>on floor</p>
<p>Number of hens per cage</p> <p>&lt; 5</p> <p>&gt; 5</p>
<p>Number of gates</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>none gate</p>
<p>Metal gates</p> <p>yes</p> <p>no</p>
<p>Using the same gates for loading and disposal</p> <p>Yes</p> <p>No</p>
<p>Concrete ceiling</p> <p>yes</p> <p>none</p> <p>other</p>
<p>Beetles observed in the house at the time of the visit</p> <p>yes</p> <p>no</p>
<p>Stock feed room at the entrance</p>

yes no
Presence of hole in walls and ceiling yes non
Structure of floor concrete other
Concrete walls yes no
Plastered walls yes no
Wall material other than concrete or plastered Yes, specify no
Wooden beams yes no
Type of ventilation static dynamic
Feeding system distribution feed carts chain feeders feeders
Watering system nipples with recipients nipples without recipients drinkers
Egg gathering system manual automatic
Egg grading and packing on the farm yes no
Egg storage room yes no
Reuse of egg storage room for other activity Yes No
Water facilities present close to the poultry-house entrance Yes

No
Wash basin with water available to the poultry-house entrance yes, functional yes but not functional no washbasin
Hand soap present Yes Non
Manure in cages flocks deep pit droppings belts
<b>Questions related to the previous flock characteristics (n= 5)</b> <i>Salmonella</i> status of previous flock yes no unknow
Disease leading of the previous flock yes, specify no unknow
An antibiotic treatment of the previous flock yes no
Mortality rate of the previous laying hen flock none significantly High unknow
Time break sanitary (months) < 1 [2 -6 [ > 6
<b>Questions related to the farm staff (n= 4)</b> Number of persons working on the farm 1 2 3 or more
Farm staff specific for laying hen's care yes no
Staff take of other animal husbandries yes No
Activity outside the holding yes



no
<b>Questions related to the disease vectors (n=11)</b>
Common equipment with other holdings yes no
Presence of trucks run near entrance of laying building yes no
Pest control procedure before pullets loading yes non
Rodent control by a contractor by farmer
Rodent observed in the layer house during sampling visit yes no
Rodent observed in made feed room yes no
Frequency of dead bird collection kept on the farm at least one week once a day
Management of ill birds kept in the house eliminated
Dead bird storage frozen no frozen
Frequency of manure elimination (days) [7-10 [ [10-15[ ≥ 15
Container for dead bird disposal yes no
<b>Questions related to the biosecurity measures, sanitary practice, and management of the flock under the study (n=20)</b>
Specific clothes for farmer yes No
Specific shoes for farmer yes no
Dry cleaning of the house before pullets loading

yes no
Dry cleaning cages before pullets loading yes no
Washing of the house before pullets loading yes no
Washing of the cages before pullets loading yes no
Renewed the water of the footbath at poultry-house entrance 1 by week at least twice by week >1 by 2 weeks
Disinfection of the poultry-house before pullets loading yes no
Disinfection of the cages before pullets loading yes no
Cleaning and disinfection of hard surfaces yes no
Disinfection of the house by the farmer by a professional contractor
Only cold water used for cleaning yes no
Feed made on farm yes no
Heat treatment of feed yes no
Drinking-water origin public private (well, boring)
Pump water in laying house yes No
Drinking-water filtration yes no
Drinking-water chlorination

yes no
Cleaning of watering system with a detergent yes no
Drinkers maintenance cleaning Frequent, specify No frequent
Clean chain feeding system during laying period 1 2 2 or more never
<b>Questions related of pullets and treatments practice in the flock (n=8)</b> Genetic breed of pullets Isa-brown Hy-line other, specify
Pullets vaccinated against <i>Salmonella</i> yes no unknow
Mortality rate over the laying period (20-88 weeks) < 8% ≥ 8%
Disease leading during laying period yes no
Veterinary visits from laying period regular visit in case of disease no visit
Number of antibiotic treatment during the laying period 0 1 2 3 or more unknow
Antibiotic treatment during the 2 weeks prior to the sampling visit yes no
Maximum laying rate > 95% <95%
<b>Sampled flock characteristics (n= 4)</b> Hen age at sampling visit (weeks) 20-33

47-60 70-86
Transport time of samples from to the laboratory (hours) < 2 > 2
Temperature inside the laying house at sampling visit ≥28°C <30°C
Type of sample feed water environmental swabs faeces

<b>Questions related to the farm characteristics (n= 14)</b>
Number laying-houses on the farm 1 2 or more
Number of poultry-houses on the farm 1 2 or more
Presence of other animal productions on the farm Yes No
Other avian husbandry under the same proprietor Yes No
Presence of backyard poultry on the farm yes no
Farm afield to the egg-production cooperative yes no
Farm adherent to the official sanitary program yes no
Easy access to farm out staff (presence of fence) yes No
Presence of future laying hens on the farms yes no
Livestock insured in case of natural disaster or notifiable diseases yes no

Farm adherent to the selling commercially cooperative of table eggs yes no
Domestics and other animals species access on the farm (dogs, cats, sheep, cattle, etc) yes no
Distance between the house studied and the nearest poultry farm ≤ 500 m > 500m
Presence of a dairy farm < 2Km yes No
<b>Questions related to the poultry-house characteristics (n=29)</b> Holding size 2400-3100 4800-7200 10000-30000
Age of the building (in years) [1- 5[ [5-10[ > 10 unknown
Age of infrastructure [1- 5[ > 5 unknown
Change room at the entrance yes no
Type of henhouse conventional battery on floor
Number of hens per cage < 5 > 5
Number of gates 1 2 none gate
Metal gates yes no
Using the same gates for loading and disposal Yes no

Concrete ceiling yes none other
Beetles observed in the house at the time of the visit yes no
Stock feed room at the entrance yes no
Presence of hole in walls and ceiling yes non
Structure of floor concrete other
Concrete walls yes no
Plastered walls yes no
Wall material other than concrete or plastered Yes, specify no
Wooden beams yes no
Type of ventilation static dynamic
Feeding system distribution feed carts chain feeders feeders
Watering system nipples with recipients nipples without recipients drinkers
Egg gathering system manual automatic
Egg grading and packing on the farm yes no

Egg storage room yes no
Reuse of egg storage room for other activity Yes No
Water facilities present close to the poultry-house entrance Yes No
Wash basin with water available to the poultry-house entrance yes, functional yes but not functional no washbasin
Hand soap present Yes Non
Manure in cages flocks deep pit droppings belts
<b>Questions related to the previous flock characteristics (n= 5)</b> <i>Salmonella</i> status of previous flock yes no unknow
Disease leading of the previous flock yes, specify no unknow
An antibiotic treatment of the previous flock yes no
Mortality rate of the previous laying hen flock none significantly High unknow
Time break sanitary (months) < 1 [2 -6 [ > 6
<b>Questions related to the farm staff (n= 4)</b> Number of persons working on the farm 1 2 3 or more
Farm staff specific for laying hen's care yes

no
Staff take of other animal husbandries yes no
Activity outside the holding yes no
<b>Questions related to the disease vectors (n=11)</b> Common equipment with other holdings yes No
Presence of trucks run near entrance of laying building yes no
Pest control procedure before pullets loading yes non
Rodent control by a contractor by farmer
Rodent observed in the layer house during sampling visit yes no
Rodent observed in made feed room yes no
Frequency of dead bird collection kept on the farm at least one week once a day
Management of ill birds kept in the house eliminated
Dead bird storage frozen no frozen
Frequency of manure elimination (days) [7-10 [ [10-15[ ≥ 15
Container for dead bird disposal yes no
<b>Questions related to the biosecurity measures, sanitary practice, and management of the flock under the study (n=20)</b> Specific clothes for farmer yes



no
Specific shoes for farmer yes no
Dry cleaning of the house before pullets loading yes no
Dry cleaning cages before pullets loading yes No
Washing of the house before pullets loading yes no
Washing of the cages before pullets loading yes no
Renewed the water of the footbath at poultry-house entrance 1by week at least twice by week >1 by 2 weeks
Disinfection of the poultry-house before pullets loading yes no
Disinfection of the cages before pullets loading yes no
Cleaning and disinfection of hard surfaces yes no
Disinfection of the house by the farmer by a professional contractor
Only cold water used for cleaning yes no
Feed made on farm yes no
Heat treatment of feed yes no
Drinking-water origin public private (well, boring)

Pump water in laying house yes no
Drinking-water filtration yes no
Drinking-water chlorination yes No
Cleaning of watering system with a detergent yes no
Drinkers maintenance cleaning Frequent, specify No frequent
Clean chain feeding system during laying period 1 2 2 or more never
<b>Questions related of pullets and treatments practice in the flock (n=8)</b> Genetic breed of pullets Isa-brown Hy-line other, specify
Pullets vaccinated against <i>Salmonella</i> yes no unknow
Mortality rate over the laying period (20-88 weeks) < 8% ≥ 8%
Disease leading during laying period yes no
Veterinary visits from laying period regular visit in case of disease no visit
Number of antibiotic treatment during the laying period 0 1 2 3 or more unknow

<p>Antibiotic treatment during the 2 weeks prior to the sampling visit</p> <p>yes</p> <p>no</p>
<p>Maximum laying rate</p> <p>&gt; 95%</p> <p>&lt;95%</p>
<p><b>Sampled flock characteristics (n= 4)</b></p> <p>Hen age at sampling visit (weeks)</p> <p>20-33</p> <p>47-60</p> <p>70-86</p>
<p>Transport time of samples from to the laboratory (hours)</p> <p>&lt; 2</p> <p>&gt; 2</p>
<p>Temperature inside the laying house at sampling visit</p> <p>≥28°C</p> <p>&lt;30°C</p>
<p>Type of sample</p> <p>feed</p> <p>water</p> <p>environmental swabs</p> <p>faeces</p>

## 7.2. Annexe 2. Fiche de prélèvements

**Nom de l'enquêteur :**  
**Date de prélèvement :**  
**Heure de prélèvement :**  
**Type de prélèvement :**  
**Température du jour :**

**Bâtiment d'élevage de poules pondeuses :**

**Type de bâtiment :**

**Nom du propriétaire :**  
**Commune (adresse) du bâtiment :**

**Nombre de poules pondeuses :**  
**Nombre de batteries :**  
**Origine des pondeuses :**  
**Age des pondeuses :**  
**Race des pondeuses :**  
**Distance entre la ville et le bâtiment :**

**Fiche d'analyses :**

<b>N° Echantillon</b>	<b>Type d'échantillon (surface, aliment, eau, œufs, sujet, fientes)</b>	<b>Lieu de prélèvement</b>
<b>A</b>		
<b>B</b>		
<b>C</b>		
<b>D</b>		
<b>E</b>		
<b>F</b>		
<b>G</b>		