

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Identification de variants de *Salmonella Typhimurium* et prise en compte de ces variants dans le programme officiel de lutte en élevage avicole

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise scientifique
et technique

Juillet 2013

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Identification
de variants de
Salmonella Typhimurium
et prise en compte
de ces variants dans
le programme officiel de
lutte en élevage avicole

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise scientifique
et technique

Juillet 2013

Édition scientifique

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 15 juillet 2013

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

relatif à « l'identification des variants de *Salmonella* Typhimurium et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole »

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments (ANSES) a été saisie le 20 août 2012 par la DGAL d'une demande d'avis relatif à l'identification des variants de *Salmonella* Typhimurium et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Éléments de contexte précisés dans la saisine de la DGAL

▪ Contexte épidémiologique et réglementaire

A l'échelle internationale, les données de surveillance des dernières années mettent en évidence l'occurrence de souches dont les formules antigéniques sont très proches de celles de *Salmonella* Typhimurium. Ces souches correspondent à des variants flagellaires du sérovar Typhimurium.

En France, suite à la survenue de plusieurs toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à des souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium », le champ d'application des arrêtés ministériels a été étendu au-delà de la réglementation européenne, en considérant les trois variants flagellaires existants du sérovar Typhimurium soit deux monophasiques (avec la persistance de la première ou de la deuxième phase flagellaire) et un immobile (avec l'absence des deux phases flagellaires).

L'objectif de lutte contre les infections à *Salmonella* en filière avicole (espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*) est poursuivi depuis plusieurs années et prévu dans le cadre des réglementations nationale et européenne en vigueur. Les arrêtés ministériels concernés pris en application de règlements européens sont :

- ✓ Les deux arrêtés du 26 février 2008 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (en filière ponte et en filière chair) ;
- ✓ L'arrêté du 4 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de dindes de reproduction ;
- ✓ L'arrêté du 22 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement.

Ces arrêtés prévoient que les troupeaux positifs pour les variants du sérovar *Salmonella* Typhimurium soient désormais traités comme des troupeaux positifs pour *Salmonella* Typhimurium (avec une formule antigénique complète) (note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 du 04 mars 2010 modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8026 du 27 janvier 2010).

Ainsi, l'isolement de ces trois variants de *S. Typhimurium* dans l'environnement d'élevage à partir de méthodes officielles, conduit aux mêmes mesures de police sanitaire que l'isolement d'une souche de *S. Typhimurium*. Suivant le type d'élevage concerné, ces mesures se traduisent par l'abattage du troupeau contaminé, ou l'envoi des œufs vers des établissements fabriquant des ovoproduits, ou encore le traitement thermique des viandes positives après recherche dans le muscle.

▪ Existence de vrais et faux variants de *S. Typhimurium*

Parmi les souches de *Salmonella* présentant l'une des trois formules antigéniques, variants de *S. Typhimurium*, certaines sont de fonds génétique Typhimurium. On parle alors de « vrais » variants du sérovar Typhimurium. D'autres, possédant les mêmes formules antigéniques, variants de *S. Typhimurium*, n'appartiennent pas au sérovar Typhimurium et portent la désignation « faux » variants de *S. Typhimurium*.

L'identification précise des variants de *S. Typhimurium* est donc importante. Elle permettrait d'exclure de la réglementation les « faux » variants qui n'appartiennent pas au sérovar Typhimurium, et ne sont donc pas concernés par celle-ci. Leur identification présenterait l'avantage de ne pas pénaliser les éleveurs concernés.

Objet de la saisine

Dans le but d'évaluer le risque que représente l'ensemble des souches appelées variants de *Salmonella* Typhimurium (formules antigéniques des variants monophasiques et variant immobile) et d'étudier la pertinence d'une adaptation de la réglementation nationale en vigueur concernant la lutte contre les salmonelles dans les filières réglementées, la DGAL, après échange avec l'Anses sur les questions à instruire, demande d'apporter des éléments scientifiques sur les points suivants :

Première question: Bilan des données de surveillance nationale concernant les souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium » dans les filières animales ;

Deuxième question: Evaluation des risques sanitaires pour la santé publique, liés à la présence de « vrais » et « faux » variants de *S. Typhimurium* et estimation de l'impact d'une caractérisation des « faux variants » sur la pertinence des mesures de gestion appliquées en élevage avicole;

Troisième question: Détermination de méthode(s) reconnue(s) pour l'isolement et la caractérisation, en santé animale et en hygiène des aliments, des souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium ».

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

Les questions 1 et 3, portant sur le bilan de la surveillance des différentes souches de *Salmonella* Typhimurium et sur les méthodes d'isolement et de caractérisation de ces souches, ont été traitées dans le cadre d'une expertise scientifique et technique (EST) réalisée par les laboratoires de santé animale et de sécurité des aliments de l'ANSES. Ce rapport, annexé au présent avis, a été remis au comité d'experts spécialisés en décembre 2012.

L'expertise collective a été réalisée entre le 29 janvier 2013 et le 14 mai 2013, par le comité d'expert spécialisé (CES) « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments », sur la base d'un rapport initial réalisé par un groupe d'experts rapporteurs issus des CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » et « Santé animale », et du rapport d'expertise scientifique et technique des laboratoires de l'ANSES.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

I. Définitions et terminologies employées

La méthode conventionnelle en vue de la dénomination des sérovars de salmonelles repose sur la détermination d'une formule antigénique par agglutination rapide sur lame, à l'aide de sérums spécifiques dirigés vers les antigènes de parois («O») ou de flagelles («H»). Les caractères antigéniques des salmonelles sont à rechercher suite à l'identification préalable de la famille, du genre, de l'espèce et de la sous-espèce sur la base de caractères biochimiques.

La formule antigénique complète de *S. Typhimurium* comporte :

- ✓ les antigènes somatiques O 1,4,[5],12 ; le facteur 1 est souligné car il peut être exprimé suite à l'acquisition d'un phage, le facteur 5 est entre crochets car son expression est variable selon les souches considérées;
- ✓ les antigènes flagellaires H, sous deux phases : en phase 1, l'antigène i, et en phase 2, les antigènes 1,2.

Soit une formule antigénique complète : *S.* 1,4,[5],12:i:1,2.

La terminologie « vrais variants » proposée par la DGAI correspond aux « variants du sérovar *Typhimurium* », tel que présenté dans le tableau 1.

TABLEAU 1: FORMULES ANTIGENIQUES POUVANT ETRE RENCONTREES CHEZ LES SOUCHES APPELEES « VARIANTS DU SEROVAR TYPHIMURIUM ».SOURCE : (AFSSA, 2009)

Formule antigénique identifiée			Conclusion	Commentaire
Antigènes somatiques O	Antigènes flagellaires H			
	en phase 1	en phase 2		
<u>1</u> ,4,[5],12	i	-	Variant monophasique du sérovar Typhimurium	Absence de l'expression de la deuxième phase flagellaire codée par le gène <i>fljB</i>
<u>1</u> ,4,[5],12	-	1,2		Absence de l'expression de la première phase flagellaire codée par le gène <i>fljC</i>
<u>1</u> ,4,[5],12	-	-	Variant immobile du sérovar Typhimurium	Absence de l'expression des deux phases flagellaires

Toutefois, toutes les souches de formules antigéniques présentées dans le tableau 1 n'ont pas obligatoirement le même fonds génétique que les souches appartenant au sérovar *S. Typhimurium*. En effet, l'identification de ces formules antigéniques de variants monophasiques ou immobiles peut être associée à l'absence d'expression de phases flagellaires de sérovares autres que Typhimurium (tableau 2). D'après la terminologie proposée ici par la DGAI, il s'agit alors des « faux variants » du sérovar Typhimurium.

TABLEAU 2: EXEMPLES D'AUTRES SEROVARS DE SALMONELLA POTENTIELLEMENT A L'ORIGINE DE VARIANTS PRESENTANT LES MEMES FORMULES ANTIGENIQUES QUE LES VARIANTS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM

Formule antigénique identifiée			Exemples d'autres sérovares de <i>Salmonella</i>	
Antigènes somatiques O	Antigènes flagellaires H		Sérovar	Formule antigénique
	en phase 1	en phase 2		
<u>1</u> ,4,[5],12	i	-	Lagos	S. <u>1</u> ,4,[5],12:i:1,5
<u>1</u> ,4,[5],12	-	1,2	Saint-Paul	S. 1,4,[5],12:e,h:1,2
			Derby	S. 1,4,[5],12:f,g:[1,2]
<u>1</u> ,4,[5],12	-	-	Banana	S. 1,4,[5],12:m,t:[1,5]
			Bispebjerg	S. 1,4,[5],12:a:e,n,x

En conclusion, les terminologies proposées par la DGAL correspondent :

- ✓ Pour les « vrais » variants de *S. Typhimurium*, à l'absence de l'expression de gène(s) codant la (les) phase(s) flagellaire(s), dans un fonds génétique de Typhimurium (S. 1,4,[5],12:i:1,2).
- ✓ Pour les « faux » variants de *S. Typhimurium*, à l'absence de l'expression de gène(s) codant la (les) phase(s) flagellaire(s), dans un fonds génétique non Typhimurium.

Selon le groupe d'experts, la dénomination de « faux » variants de *S. Typhimurium* n'est en fait pas justifiée et est source de confusion pour des variants dont le fonds génétique est différent de Typhimurium.

En conséquence, dans le présent avis, le comité propose d'adopter la terminologie « variants de non *S. Typhimurium* » pour les « faux » variants de *S. Typhimurium* et « variants de *S. Typhimurium* » pour les « vrais » variants de *S. Typhimurium*.

II. Bilan de la surveillance des différentes souches de *Salmonella Typhimurium*.

Les données constituant ce bilan sont issues :

- i. des bilans nationaux des plans de lutte contre les salmonelles dans les troupeaux des espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*, par filière et étape de production, disponibles chaque année depuis 2006 ;
- ii. des enquêtes européennes et des plans de surveillance DGAL, réalisés par le Laboratoire national de référence pour déterminer les prévalences de *Salmonella* spp. dans les filières avicoles et porcines (élevages, abattoir, distribution).

1. Bilan de la surveillance pour la filière avicole

a. Dispositifs réglementaires pour la filière avicole

En application du Règlement du Parlement européen et du Conseil n° 2160/2003, du 17 novembre 2003, sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire, la France a mis en place un certain nombre de textes réglementaires visant à limiter la prévalence des salmonelles dans les filières avicoles. Ces réglementations s'intéressent plus particulièrement aux volailles de l'espèce *Gallus gallus* (filières correspondant à la production d'œufs destinés à la consommation humaine et de carcasses et viandes découpées de poulets de chair) d'une part, et de l'espèce *Meleagris gallopavo* (filière correspondant à la production de carcasses et de viandes découpées de dindes) d'autre part.

Ces textes réglementaires¹ considèrent tous les élevages et étapes des filières de production d'œufs et de carcasses de poulets et de dindes. Les éléments clefs dans l'application de cette réglementation sont présentés ci-après :

- ✓ Dépistage systématique des infections à *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* et *S. Virchow*, dans les troupeaux de volailles *Gallus gallus* de reproduction des filières « ponte » et « chair » ;
- ✓ Dépistage systématique des infections à *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les troupeaux de poulettes futures pondeuses et pondeuses d'œufs de consommation, dans les troupeaux de dindes destinées à la reproduction et ceux des dindes et poulets d'engraissement;
- ✓ Elimination obligatoire des troupeaux de volailles de reproduction infectés par *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* et *S. Virchow*, et assainissement des produits qui en sont issus ;
- ✓ Elimination obligatoire des troupeaux de poulettes futures pondeuses d'œufs de consommation infectés par *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* et assainissement des produits qui en sont issus ;

¹ Arrêtés relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (deux arrêtés du 26 février 2008 pour l'espèce *Gallus gallus* en filières ponte et chair ; arrêté du 4 décembre 2009 pour l'espèce *Meleagris gallopavo* en filière reproduction ; arrêté du 22 décembre 2009 pour les espèces *Gallus gallus* en filière chair et *Meleagris gallopavo* en filière d'engraissement)

- ✓ Elimination obligatoire des troupeaux de dindes de reproduction infectées par *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium* et assainissement des produits qui en sont issus;
- ✓ Assainissement des produits qui sont issus des troupeaux de pondeuses d'œufs de consommation de l'espèce *Gallus gallus* infectés et, éventuellement, élimination volontaire anticipée de ces troupeaux;
- ✓ Décontamination des lieux d'élevage des volailles infectées et traitement approprié de leurs effluents.

Depuis 2004, l'organisation des plans de surveillance est assurée par la DGAL qui coordonne la récolte et l'exploitation des données obtenues. Ces résultats permettent de connaître la situation épidémiologique de ces élevages de volailles vis-à-vis de la contamination par *Salmonella* spp. Ces bilans nationaux portent sur plusieurs milliers d'analyses effectuées annuellement et sont officiellement publiés par la DGAL.

De plus, le Laboratoire national de référence pour *Salmonella* a participé à différentes enquêtes européennes visant à déterminer la prévalence de *Salmonella* spp. dans les élevages et les abattoirs de productions avicoles. Une synthèse de tous ces résultats a été réalisée dans le rapport d'expertise scientifique et technique établi dans le cadre de cette saisine.

b. Résultats de la surveillance des salmonelles pour la filière avicole

Tous les troupeaux de plus de 250 volailles (*Gallus gallus* et dindes) sont testés chaque année² dans le cadre des plans de lutte nationaux. Le nombre d'élevages dans lesquels *Salmonella* a pu être détecté demeure très faible et *a fortiori*, pour les salmonelles dites variants monophasiques ou immobiles de *S. Typhimurium*.

Malgré la bonne performance des laboratoires à effectuer le sérotypage des salmonelles (estimée par l'EILA³ organisé au sein du réseau *Salmonella*), une sous-estimation de la fréquence d'isolement des souches *S. 1,4,[5],12:i:-*, *S. 1,4,[5],12:-:1,2* et *S. 1,4,[5],12:-:1* ne peut cependant pas être totalement exclue ; en effet, selon la réglementation actuelle nationale, l'ensemble de ces souches étant considérées comme des *S. Typhimurium*, certains variants pourraient être identifiés abusivement comme étant des *S. Typhimurium*.

Dans les élevages

• *Volailles (Gallus gallus) reproductrices*

La prévalence des 5 sérovars de *Salmonella* spp. de 1^{ère} catégorie (*Enteritidis*, *Typhimurium*, *Hadar*, *Infantis* et *Virchow*) dans les troupeaux de la filière « œufs de consommation » est très faible; seules quelques souches de *S. Enteritidis* ont été isolées au cours des 5 années de surveillance (3 troupeaux positifs sur les 1 137 contrôlés, soit 0,2%).

Pour les volailles reproductrices de la filière « poulets de chair », au cours de cette même période, la contamination s'est révélée pratiquement similaire (42 troupeaux positifs sur 11 771 contrôlés, soit 0,3%). Cependant le nombre de troupeaux analysés, dix fois supérieur au nombre de troupeaux analysés en filière « ponte », a permis de mettre en évidence des salmonelles plus variées qui appartenaient majoritairement aux sérovars

²Un contrôle précédent l'abattage pour les poulets et dindes de chair ; 2 contrôles pour les poulettes futures pondeuses et 4 contrôles pour les poules pondeuses ; pour les reproducteurs *Gallus gallus* en filières ponte et chair : 5 contrôles à l'élevage et toutes les 2 semaines au couvoir ; pour les dindes reproductrices contrôles toutes les 3 semaines à l'élevage.

³EILA : *Essais interlaboratoires d'aptitude*

Enteritidis (21) et Typhimurium (14) ; les autres sérovars retenus comme dangers sanitaires de 1^{ère} catégorie (Hadar, Virchow et Infantis) ont également été identifiés. Une diminution du nombre de troupeaux positifs de poulettes futures reproductrices en filière « poulets de chair » a été observée entre 2007 et 2011.

- *Poules pondeuses d'œufs de consommation*

Lors d'une enquête européenne menée en 2004-2005, dans les élevages de poules pondeuses, près de 18% des élevages (93 sur les 519 échantillonnés) s'étaient révélés contaminés par *Salmonella* spp. ; parmi les sérovars identifiés, Typhimurium et Enteritidis (4,2 et 3,8% respectivement) étaient les plus fréquemment isolés ; une souche d'un variant monophasique (S. 1,4,[5],12:i:-) avait également été identifiée.

La prévalence des salmonelles est non seulement relativement faible pendant la période d'élevage des poulettes futures pondeuses, mais elle diminue régulièrement au fil des années (de 0,7% en 2007 à 0,1% en 2011). Au cours de la période de ponte, ces prévalences sont plus élevées, mais la même tendance à la baisse est observée (de 3,8% en 2007 à 1,5% en 2011). Les sérovars identifiés correspondent principalement à S. Enteritidis, notamment pendant la période de ponte (280 des 419 souches isolées) et S. Typhimurium. Grâce à la caractérisation moléculaire des souches ayant le profil sérologique des variants de Typhimurium, par le Laboratoire national de référence, depuis 2010, le variant monophasique S. 1,4,[5],12:i:- a été identifié à plusieurs reprises tant au niveau des élevages de poulettes (1 souche en 2010 et 2 en 2011) que des élevages de poules pondeuses (6 souches en 2010 et 1 en 2011) ; par ailleurs un variant monophasique S. 1,4,[5],12:-:1,2 a été isolé à une seule occasion. Aucun variant immobile (S. 1,4,[5],12:-:-) n'a été mis en évidence au cours de ces contrôles⁴. La méthode officielle, NF U 47-100, utilisée dans ces contrôles, permet l'isolement de *Salmonella* immobiles. Ces 11 isolements de variants, tous appartenant au sérovar Typhimurium, représentent 7,9% des souches de *Salmonella* isolées parmi celles visées par la réglementation (dangers sanitaires de 1^{ère} catégorie, anciennement MRC).

- *Poulets de chair*

L'enquête européenne menée en 2005-2006, dans 370 troupeaux, avait permis de mettre en évidence une contamination par *Salmonella* spp. dans 32 d'entre eux (prévalence de 8,6%). Au total, 1 850 échantillons avaient été analysés, permettant l'isolement de 186 souches de *Salmonella* spp. Vingt-trois sérovars différents avaient été identifiés. S. Enteritidis était présente dans 2 troupeaux et S. Typhimurium dans un seul élevage, et aucun variant monophasique n'avait été isolé au cours de cette enquête.

Les résultats du plan de lutte (2009-2011) dans les élevages de poulets de chair, sont également dans le rapport d'expertise scientifique et technique, exprimés en nombre de S. Enteritidis et S. Typhimurium qui sont les 2 sérovars visés par la réglementation (dangers sanitaires de première catégorie) pour cette production. Le nombre de troupeaux suivi a été de 35 911 pour la première année d'application du plan de lutte en 2009, et a atteint 57 182 en 2011. Les résultats obtenus indiquent une prévalence faible, de l'ordre de 0,5% de troupeaux contaminés, avec une prévalence pour S. Enteritidis de 0.23%, 0.12% et 0.14% en 2009, 2010 et 2011 et une prévalence pour S. Typhimurium de 0.3% pour cette période. Les autres souches isolées au cours des contrôles et retenues comme dangers sanitaires de 1^{ère} catégorie, appartiennent à des variants monophasiques. En 2010 et 2011, 40 troupeaux étaient contaminés par le variant S. 1,4,[5],12:i:- (7,6% des troupeaux positifs) et 12 par le variant S. 1,4,[5],12:-:1,2 (2,3% des troupeaux positifs) ; 7 troupeaux étaient également contaminés par le variant immobile S. 1,4,[5],12:-:- (1,3% des troupeaux positifs).

⁴ Méthodes d'analyse : pour les contrôles des prélèvements issus des "poules pondeuses" deux milieux sont à utiliser pour l'enrichissement (MSRV et MKTTn).

- *Dindes reproductrices* :

Lors de l'enquête européenne réalisée en 2006-2007, trois élevages, sur les 205 échantillonnés, s'étaient révélés contaminés par *Salmonella* (3 sérovars identifiés : *S. Enteritidis*, *S. Kottbus* et *S. Bradford*).

Les plans de lutte réalisés en 2010 et 2011, concernent plus d'un millier de troupeaux, tant au niveau de la période d'élevage (respectivement 455 et 459 troupeaux examinés en 2010 et 2011) que lors de la période de ponte (respectivement 785 et 689 élevages contrôlés en 2010 et 2011). Un seul troupeau de dindes a été retrouvé contaminé par *S. Enteritidis*, 5 par *S. Typhimurium* et 4 par un variant monophasique (*S. 1,4,[5],12:i:-*) ; ceci dénote une faible prévalence de ces sérovars dans les élevages de troupeaux de dindes reproductrices.

- *Dindes à l'engraissement* :

Une enquête européenne a été réalisée en 2006-2007 dans 302 bâtiments. Quarante-sept d'entre eux s'étaient révélés contaminés par *Salmonella* spp. (15,6%) ; seize sérovars différents avaient été identifiés, avec une prédominance de *S. Derby* et la présence de *S. Typhimurium* dans 6 troupeaux. Aucun variant potentiel n'avait été mis en évidence lors de cette enquête.

Les résultats du plan de lutte mené en 2010 et 2011, dans respectivement 9 394 et 8 046 élevages de dindes, indiquent que *S. Typhimurium* était le sérovar le plus fréquemment isolé (89 troupeaux contaminés, soit une prévalence de 0,5%) et que *S. Enteritidis* était présent dans 28 troupeaux (0,16%). Notons également que des variants monophasiques ont été retrouvés dans 13 troupeaux (0,07%), et plus particulièrement le variant *S. 1,4,[5],12:i:-* (11 troupeaux). Enfin, le variant immobile a été retrouvé dans deux élevages, en 2011⁵.

Dans les élevages de poulets de chair et de dindes, les résultats des bilans de la DGAL ne montrent pas une augmentation significative pour 2010 et 2011 de la proportion de troupeaux infectés par le sérovar *Typhimurium*.

L'analyse des données du réseau *Salmonella* concernant les souches *S. 1,4,[5],12:i:-* montre une augmentation constante de leur détection entre 2007 et 2011. Cette formule antigénique demeure de loin la plus représentée parmi les variants, notamment parmi les isolats provenant d'élevages avicoles (110 sur 167, soit 66% des isolats de formule antigénique *S. 1,4,[5],12:i:-* recensés par le Réseau *Salmonella* pour le secteur élevages avicoles en 2011). Toutefois, de l'ensemble des souches identifiées dans ces filières, *S. 1,4,[5],12:i:-*, ne représente en 2011, qu'environ 1 % (1,3 % pour l'espèce *Gallus gallus* et 0,7% pour *Meleagris gallopavo*).

Par opposition au variant monophasique *S. 1,4,[5],12:i:-*, les données recueillies ne permettent pas de conclure sur l'émergence des deux autres variants (monophasique *S. 1,4,[5],12:i:-:1,2* et immobile *S. 1,4,[5],12:i:-*).

Parallèlement à ces contrôles dans les filières avicoles, le réseau *Salmonella* poursuit ses missions, notamment de surveillance de ces bactéries dans la chaîne agro-alimentaire.

⁵En ce qui concerne les plans de lutte nationaux, la méthode d'analyse est au choix pour les échantillons de poulet et de dinde de chair : soit la norme NF U 47-100 avec ses 2 milieux d'enrichissement, soit le protocole "NF U 47-100-adapté" (MSRV comme seul milieu d'enrichissement). L'enrichissement en MRSV ne permet pas de détecter les variants immobiles.

Dans les abattoirs

Le LNR a analysé les échantillons de carcasses prélevées à l'abattoir (n=425) de l'enquête européenne de 2007-2008. La prévalence était relativement élevée (7,5%) avec 13 sérovars différents identifiés, n'incluant pas les variants.

Dans la distribution

Ce sont 1 014 échantillons, avec et sans peau, dont 691 de poulets et 323 de dindes, qui ont été prélevés entre 2009 et 2010 par les techniciens des DDPP. Les prévalences observées étaient de 2,5% pour les échantillons de poulets et de 7,4 % pour ceux de dindes. Plusieurs sérovars de *Salmonella* spp. ont été identifiés, dont *S. Typhimurium*, mais aucun variant monophasique n'a été isolé au cours de ces 3 enquêtes.

Le nombre d'isolats pour le variant monophasique *S. 1,4,[5],12:i:-* pour l'ensemble des produits de volailles, demeure faible dans les viandes de volailles (18 sur 333, soit 5,4% des variants identifiés dans le secteur « hygiène des aliments »).

2. Bilan de la surveillance pour les autres filières (porcine et bovine)

Dans la filière porcine, seules deux enquêtes européennes ponctuelles visant à établir la prévalence à l'étape production (ganglions mésentériques) et reproduction (pools de fèces) permettent d'apprécier l'importance de la présence de *Salmonella* et la représentation de sérovars d'intérêt en santé publique. En effet, il n'existe pas de réglementation nationale pour la surveillance de *Salmonella* spp. dans cette filière.

Ces études européennes ont été conduites en 2007 et 2008.

Dans le secteur production des porcs charcutiers, 22% des élevages naisseurs engraisseurs, étaient contaminé par *Salmonella*.

Dans le secteur reproduction (naisseurs, naisseurs-engrailleurs) *Salmonella* a été détectée dans 43,9% des élevages. Derby est le sérovar majoritaire (51,3% des élevages positifs) et Typhimurium est détecté dans 10,5% des élevages positifs.

Le pourcentage d'échantillons de ganglions mésentériques contaminés à l'abattoir est de 18,4% et se situe dans la fourchette haute des prévalences dans les pays européens, plaçant la France au 6^{ème} rang (EFSA-Q-2006-042A, 2008). La contamination des carcasses a pu être estimée, au cours de l'enquête de 2007, et la prévalence observée (18,6%) place la France au troisième rang des 13 états membres ayant participé à cette partie optionnelle de l'enquête. Le sérovar Typhimurium est là encore le plus représenté avec 43% des isolats de surface.

Au regard de ces chiffres, il semble que les productions porcines aient un rôle non négligeable dans la dissémination des *Salmonella* dans la chaîne alimentaire ; en conséquence, une meilleure représentation de cette filière dans les dispositifs de surveillance et de recueils des souches isolées, serait souhaitable.

Quant à la filière bovine, aucune enquête de prévalence européenne ne permet de disposer de valeur de niveau de contamination.

L'analyse descriptive de l'ensemble des données collectées dans le cadre du réseau *Salmonella*, constitue donc la principale source d'informations pour ces filières. En particulier, elle révèle une augmentation relative du nombre de souches isolées de viandes de porc et de produits laitiers, dans le secteur de l'hygiène des aliments entre 2007 et 2011. Cette augmentation, plus marquée en 2010 et 2011, résulte vraisemblablement, en partie, de l'isolement accru de variants monophasiques *S. 1,4,[5],12:i:-* du sérovar Typhimurium, suite à la survenue de foyers de cas humains de salmonelloses. Les données du réseau *Salmonella* indiquent une forte présence du

variant monophasique S. 1,4,[5],12:i- dans les viandes de porcs et les produits de charcuterie (54,3% des variants identifiés dans le secteur « hygiène des aliments » en 2011) et une émergence de ce même variant monophasique dans la filière bovine (élevages mais aussi viandes et produits laitiers) entre 2007 et 2011. Les données recueillies ne permettent pas de conclure sur l'émergence des deux autres variants (monophasique S. 1,4,[5],12:-:1,2 et immobile S. 1,4,[5],12:-:-).

III. Etude de la virulence/pathogénicité⁶ des différentes souches de Salmonelles

La pathogénicité de *Salmonella* est particulièrement bien documentée. En effet cette bactérie a servi (Finlay, 1994), et continue de servir de modèle pour décrire les mécanismes de pathogénicité mis en jeu par une bactérie intracellulaire facultative (Garai, Gnanadhas, & Chakravorty, 2012; Ibarra & Steele-Mortimer, 2009; Velge et al., 2012). Les grandes étapes sont l'adhésion, l'internalisation, pour *Salmonella*, leur capacité à éviter la fusion avec le lysosome secondaire, la multiplication intra-cellulaire près du noyau et l'orientation de la réponse immune innée et adaptative allant jusqu'à la gestion de la mort de la cellule (lyse ou apoptose). Dans le contexte de cet avis, les différentes étapes seront reprises brièvement. Le rôle des déterminants du sérovar dans chacune des étapes de pathogénicité, cela tant pour les antigènes somatiques que pour les flagellaires, seront explicités.

1. Adhésion

Les facteurs clé de la pathogénicité sont trouvés parmi ceux qui permettent ou facilitent l'adhésion aux cellules (intestinales). Les éléments principaux sont les adhésines qui sont classées en adhésines fimbriaires ou non fimbriaires (Wagner & Hensel, 2011). Elles peuvent être codées par des gènes sur le chromosome bactérien mais également possiblement portées par des plasmides et sont donc transmissibles. (Garai et al., 2012; Wagner & Hensel, 2011)

Parmi ces adhésines fimbriaires, de subtiles variations de séquence en acides aminés suffisent à induire des différences d'adhésion entre sérovats (Guo et al., 2009) voire entre souches d'un même sérovar (Hancox, Yeh, & Clegg, 1997). Les *fimbriae* sont des éléments majeurs de différenciation de la virulence entre sérovats (particulièrement entre les *Salmonella* typhiques et non typhiques) (Townsend et al., 2001). Elles sont plus largement considérées comme déterminantes dans la spécificité vis-à-vis de l'hôte (Guo et al., 2009; Kisiela et al., 2005), dans la formation de biofilm et l'adaptation aux niches écologiques (Ledebauer, Frye, McClelland, & Jones, 2006; Wagner & Hensel, 2011) ainsi que dans la colonisation à long terme de l'hôte au sein d'un même sérovar (Weening et al., 2005). Pour cette dernière, la persistance des souches de *Salmonella* est associée à la capacité des adhésines à se fixer à la fibronectine, à la laminine et au collagène de la matrice extracellulaire (Singh, Fleury, Jalalvand, & Riesbeck, 2012).

Au-delà des adhésines fimbriaires, d'autres adhésines non fimbriaires ont un rôle confirmé dans l'adhésion de *Salmonella*. Ces protéines (SiiE, BapA...) interviennent comme renfort d'une adhésion pré-existante entre la cellule eucaryote et la bactérie et préalable à l'internalisation, ou entre la surface abiotique et la bactérie (Latasa et al., 2005) dans le cas de biofilms.

⁶La pathogénicité indique la capacité de causer des lésions, et par conséquent une maladie infectieuse chez un hôte sain ; la virulence exprime le degré d'intensité du pouvoir pathogène au sein d'une même espèce microbienne.

Les lipopolysaccharides (LPS) de *Salmonella* ne sont pas impliqués dans l'adhésion (Wagner & Hensel, 2011) et l'antigène somatique O, s'il est déterminant dans la définition du sérovar, ne joue pas de rôle dans l'adhésion (Bravo et al., 2011), tout du moins par sa variabilité. En revanche, l'étude de Gerlach en 2008 (Gerlach et al., 2008), qui met en compétition SiiE et l'antigène O du LPS, montre que la diminution de longueur (nombre de répétitions et non la composition) de l'antigène O est favorable à l'internalisation, en facilitant le processus de renforcement de l'adhésion de la cellule bactérienne à l'hôte via SiiE. En ce qui concerne les flagellines codées par *fliC* et *fliB*, leur rôle spécifiquement dans l'adhésion aux cellules ou à la matrice extracellulaire apparaît anecdotique (Ramos, Rumbo, & Sirard, 2004).

En conclusion, il existe un équipement complet et diversifié qui permet l'adhérence chez *Salmonella*. Cette première étape est fondamentale puisqu'elle initie la cascade de processus constituant la pathogénèse. Ce sont également les intervenants de l'adhésion qui sont évoqués pour l'explication de phénomènes de colonisation préférentielle chez certaines espèces ou de persistances digestives (colonisations) plus longues chez un même type d'animal. Ces informations sont encore récentes et parcellaires mais à cette étape (adhésion), ni les éléments Ag somatiques, ni les structures flagellaires ne sont impliqués.

2. Internalisation

La construction d'un système moléculaire mimant une seringue, le SST3 (système de sécrétion protéique de type 3) permet l'injection, dans la cellule eucaryote, des effecteurs qui vont entraîner la rupture des jonctions serrées et la modulation des canaux Cl⁻ de la cellule eucaryote, entraînant ainsi l'accumulation de fluides intestinaux et la diarrhée (Garai et al., 2012; Velge et al., 2012; Wagner & Hensel, 2011). D'autres molécules injectées dans la cellule eucaryote vont induire un réarrangement des filaments d'actine de la cellule. Cela aboutit à la constitution d'une vésicule d'autophagie à l'intérieur de laquelle se retrouve la bactérie. Ce système d'internalisation, nommé « Trigger », fait intervenir les LPS de *Salmonella* (Forbes, Eschmann, & Mantis, 2008). Pourtant, ce ne sont ni la longueur, ni la nature de l'antigène O, mais l'intégrité du noyau (core) lipopolysaccharidique et plus encore des glucides terminaux de cette structure (ceux sur lesquels se greffent les antigènes O quels qu'ils soient) qui est nécessaire à l'internalisation (Bravo et al., 2011; Hoare et al., 2006). Aucun impact de l'expression des différentes flagellines n'est décrit. Inversement une découverte récente a permis de mettre en évidence le rôle de l'îlot de pathogénicité 1 des salmonelles (SPI-1), lequel intervient dans les prémisses de l'internalisation, dans le mécanisme de transition de phase entre *fliC* (1^{ère} phase flagellaire) et *fliB* (2^{ème} phase flagellaire). Il y a surexpression de *fliB* dans un contexte d'expression du SPI-1 (Eom et al., 2012).

3. Maintien/ multiplication intracellulaire

Une fois internalisée, la bactérie assure son maintien dans une vacuole qui accumule les marqueurs endocytiques pour éviter la fusion avec les lysosomes secondaires, et s'y multiplie (Schlecker et al., 2012). Quant aux mécanismes de régulation de la multiplication cellulaire, ils ne sont pas encore complètement décrits.

En ce qui concerne l'entrée, le maintien et la multiplication de *Salmonella* dans l'organisme, si les mécanismes impliqués sont, sans doute, parmi les mieux décrits et les plus complexes dans la régulation, le rôle des déterminants de la notion de sérovar (antigène O et antigènes flagellaires FliA FliB) est anecdotique. Les premières phases de la virulence incluant la colonisation du tractus digestif de l'hôte ne sont pas associées à la présence ou l'absence de déterminants du sérovar.

4. Activation/ régulation de la réponse immune

La phase systémique relève de l'établissement et de l'évolution d'un équilibre dans la réponse immunitaire de l'hôte.

Salmonella orchestre cet équilibre (Tukel et al., 2006). La première phase correspond au recrutement des neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires produites par la cellule eucaryote sous l'influence de *Salmonella*. *Salmonella* module positivement la réponse immunitaire tant innée qu'adaptative. Une seconde phase correspond à l'inhibition de la réponse de l'hôte (Pilar, Reid-Yu, Cooper, Mulder, & Coombes, 2012).

Par ailleurs et pour compléter l'illustration de l'intense relation entre *Salmonella* et son hôte, des effecteurs de *Salmonella* ont été décrits comme capables de prendre la main sur des mécanismes aussi subtils que l'apoptose eucaryote. Ainsi *Salmonella* est capable d'induire une survie cellulaire prolongée, par exemple à l'intérieur de la cellule la protégeant (Wu, Jones, & Neish, 2012), et à l'inverse d'induire la mort de cellules engagées dans la réponse immunitaire cellulaire (Guiney, 2005).

Au même moment, les mécanismes de défense de la cellule eucaryote tendent à l'élimination de la bactérie. Les éléments déterminants de la régulation de la réponse immunitaire suite au contact avec un pathogène sont les Toll-like receptors (TLR). Ces récepteurs transmembranaires détectent des « patrons moléculaires associés au microbe » (MAMPs) (Ramos et al., 2004). Ce sont les TLR qui vont initier la réponse pro-inflammatoire innée. Parmi les MAMP, on retrouve, chez les bactéries Gram négatives, les LPS et la flagelline.

La flagelline FliC contient des régions C-terminale et N-terminale très conservées. La partie médiane est dite hypervariable et de plus, est très antigénique. C'est la partie hypervariable de la flagelline qui est le déterminant retenu pour définir l'antigénicité flagellaire et le sérovar de la souche (Nempont et al., 2008). Il est établi que ce sont les régions conservées de FliC qui interagissent avec TLR5 (Eaves-Pyles, Wong, Odoms, & Pyles, 2001; Nempont et al., 2008; Smith et al., 2003). De même, la flagelline FliB, également un ligand de TLR5 (Pino, Martin, & Michalek, 2005), possède une séquence peptidique médiane hypervariable. Toutefois cette variabilité n'intervient pas dans la modulation de la réponse immunitaire, car cette région ne constitue pas un ligand de TLR5. Dès lors, la question se pose de la part de la réponse TLR5 dans la régulation globale de la réponse immune. Le caractère a-flagellé d'une *Salmonella* n'apparaît pas une limite majeure à sa pathogénicité. Les premières phases (chimiotactisme et mobilité) sont handicapées, mais les exemples de pouvoir pathogène bien présent de *Salmonella* constitutivement non-flagellée (*S. Gallinarum-Pullorum*) ou d'épidémies avec des souches dépourvues de flagelles, minimiseraient le rôle joué par la réponse TLR5 dans la pathogénèse. Chez les macrophages, il a été démontré que les mécanismes de stimulation de la réponse cellulaire ne dépendent pas de la présence de flagelline (Hoffmann et al., 2010).

Le LPS est composé d'un lipide A, d'un noyau polysaccharidique (« core ») et de la chaîne polysaccharidique variable qui constitue l'antigène O somatique, seul utilisé pour la détermination du sérovar. Dans la littérature encore récente, une confusion peut apparaître entre la réaction immune contre le LPS et le rôle du LPS dans la modulation de la réponse immunitaire. Ainsi, l'intensité de la production d'anticorps anti-LPS (majoritairement contre l'antigène O) et la stimulation de l'immunité par ce dernier, peuvent ne pas être dissociées et sous-entendre un rôle majeur de l'antigène O dans l'induction ou la modulation de la virulence. Les études qui décrivent la stimulation de la réponse immunitaire par les différentes sous-unités du LPS, indiquent que le Lipide A et le core sont nécessaires et suffisants chez *Salmonella* (Kong et al., 2011). Les études qui analysent spécifiquement l'interaction du LPS des bactéries Gram négatives et du TLR4,

démontrent, comme seul ligand au récepteur eucaryote, la fraction lipidique A du LPS, qui apparaît comme un puissant inducteur de la réponse de l'hôte (Dunn-Siegrist et al., 2012; Meng, Gong, Bjorkbacka, & Golenbock, 2011). L'arborescence polysaccharidique (antigène O) n'intervient pas dans la modulation de la réponse immunitaire.

Les déterminants de la virulence de *Salmonella* sont parmi les mieux décrits pour une interaction de l'hôte et une bactérie pathogène. Les déterminants du sérovar : antigène O et séquence peptidique variable des FliC et FljB, ne sont pas impliqués dans l'expression de la virulence de *Salmonella*.

Dans ce contexte, une réglementation basée sur la surveillance d'un nombre limité de sérovars spécifiques ne doit pas être considérée *a priori* comme une surveillance des souches les plus virulentes.

En effet, c'est la large distribution de certains sérovars (*S. Typhimurium*) ou la spécificité de la transmission de certaines souches d'un sérovar donné jusqu'aux consommateurs (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*) qui a justifié leur présence dans une liste positive de sérovars à surveiller.

IV. Contexte épidémiologique humain vis-à-vis des variants du sérovar Typhimurium

1. Etudes récentes portant sur l'existence de clones de variants monophasiques de *S. Typhimurium*

Une étude américaine sur l'émergence, la distribution et les caractéristiques phénotypiques et moléculaires des souches de *S. 1,4,[5],12:i:-* a été réalisée en 2009 (Switt, Soyer, Warnick, & Wiedmann, 2009). La prévalence de ce sérovar parmi les cas humains de salmonellose, depuis la fin des années 90, a augmenté et cette formule antigénique est devenue l'une des plus fréquentes dans de nombreux pays de par le monde.

En 1999, des microbiologistes espagnols (Echeita, Aladuena, Cruchaga, & Usera, 1999; Echeita, Herrera, & Usera, 2001) ont décrit l'émergence d'une souche de *S. 1,4,[5],12:i:-* qui semblait être un variant monophasique de *S. Typhimurium*. Cette souche était retrouvée chez l'homme et chez des porcs ou des aliments d'origine porcine. Les caractéristiques de cette souche étaient:

- ✓ un lysotype U302,
- ✓ une multi-résistance (résistance à l'ampicilline, aux chloramphénicol, gentamicine, streptomycine, sulfamide, tétracycline et sulfaméthoxazole-triméthoprime, définissant le profil ACGSSuTTm),
- ✓ l'absence de l'antigène flagellaire de 2^{ème} phase par absence du gène *fljB*.

De la Torre rapportait aussi, sur la même période l'isolement, en Espagne, de souches d'origine porcine ayant les mêmes caractéristiques et provenant d'un même clone U302. (De la Torre et al., 2003)

Dans la littérature, il n'est pas retrouvé d'étude concernant l'émergence des variants monophasiques de Typhimurium provenant de filières autres que la filière porcine.

En 2010, une équipe allemande a publié une étude portant sur l'analyse de 148 souches de *Salmonella* de formule antigénique *S.4,[5],12:i:-* d'origine porcine (viande et animal) et humaine isolées en 2006 et 2007 (Hauser et al., 2010). Soixante-dix pourcent de ces souches exprimaient l'antigène O:5 (formule antigénique *S.4,5,12:i:-*) et 30% ne

l'exprimaient pas (formule antigénique S.4,12:i:-). Deux clones majeurs ont pu être identifiés : l'un, de lysotype DT193 prédominant aussi bien parmi les souches issues de viande porcine, issues de porcs vivants et d'origine humaine, et un second de lysotype DT120. Le profil d'antibiorésistance pour ces 2 clones est une quadruple résistance à ampicilline, streptomycine, sulfamide et tétracycline (ASSuT). Une étude européenne associant l'Italie, le Danemark et le Royaume-Uni, a aussi traité de l'émergence de ce variant monophasique de Typhimurium avec tétra-résistance d'origine chromosomique qui circule dans ces 3 pays (Lucarelli et al., 2010).

En 2010, une étude européenne (Royaume Uni, France, Allemagne, Italie, Pologne, Espagne et Hollande) a caractérisé 116 souches de formule antigénique S.4,[5],12:i:- provenant de viande porcine, de porcs vivants et d'origine humaine (Hopkins et al., 2010). Deux clones, DT193 et DT120, avec un profil d'antibiorésistance de type ASSuT étaient mis en évidence et émergeaient en Europe. Le porc était le réservoir vraisemblable de cette émergence.

En 2012, une équipe polonaise a publié une étude concernant des souches d'origine vétérinaire de variant monophasique de Typhimurium isolées depuis 2008 qui provenaient de filières différentes (volaille, porc, bœuf, environnement et nourriture pour animaux) (Wasył & Hoszowski, 2012). La majorité des souches provenaient de la filière porcine.

Bugarel et al., en 2012, ont réalisé une étude microbiologique de souches de variants monophasiques de Typhimurium reçues par le Réseau *Salmonella* de l'ANSES entre 2001 et 2010. La grande majorité (71%) de ces souches provenait du clone européen multi-résistant, seuls 2% provenait du clone américain sensible aux antibiotiques (Bugarel, Vignaud, Moury, Fach, & Brisabois, 2012).

Il semble donc qu'il existe au moins 2 clones de variant monophasique de *S. Typhimurium* circulant actuellement, le DT193 majoritaire circulant en Europe et aux USA (Soyer et al., 2009) et le DT120, rapporté en Europe uniquement.

2. Rappel concernant la surveillance des infections à *Salmonella* chez l'homme en France

Le Centre national de référence des *Salmonella* (CNR-Salm), en charge de la surveillance microbiologique des salmonelloses humaines, reçoit des souches et des comptes rendus de sérotypage d'un réseau de laboratoires volontaires, privés et hospitaliers.

En 2009, 1 542 laboratoires répartis en 381 laboratoires hospitaliers (25%) et 1 161 laboratoires d'analyses biomédicales privés (75%) ont participé à la surveillance des infections à *Salmonella* en France, soit environ 35% des laboratoires d'analyses médicales recensés en France en 2007. Une étude conjointe du CNR, de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) et de l'Institut de veille sanitaire (InVS) a permis d'estimer l'exhaustivité du CNR-Salm à 66% des salmonelloses humaines confirmées en laboratoire en France et dans les territoires ultramarins (CNR-*Salmonella*, 2011).

Chaque semaine, des algorithmes de détection de dépassement de seuils, établis pour chaque sérovar à partir des données historiques du CNR-Salm, sont utilisés par le CNR-Salm et l'InVS afin de détecter des augmentations inhabituelles ou des cas groupés de souches d'un sérovar donné. La mise en œuvre de méthodes de typage moléculaire (PFGE, MLVA) pour l'investigation de cas groupés, est d'une aide très précieuse dans la détection et l'investigation des épidémies.

La surveillance des infections humaines à *Salmonella* est complétée par la surveillance des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) qui sont à déclaration obligatoire en France, depuis 1987. Ainsi, en 2010, 92 TIAC confirmées à *Salmonella* ont été déclarées, représentant environ 40% des foyers de TIAC dont l'agent étiologique a été confirmé. Ces TIAC à *Salmonella* ont été à l'origine de 1 066 malades et 145 hospitalisations. (Delmas et al., 2010)

3. Cas avérés de TIAC à *Salmonella*

Les cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)⁷ liées à *Salmonella* sont enregistrés de deux façons : par le biais de la feuille d'information envoyée au CNR avec la souche et par les déclarations obligatoires (DO) de TIAC.

Lors de l'envoi de souches de *Salmonella* au CNR, les biologistes remplissent une feuille d'information concernant le contexte d'isolement de la souche. Une analyse a porté sur la période 2010-2012 et la fréquence de « cas groupés » signalés lors de l'envoi de souches de *Salmonella*, en fonction du caractère « variant monophasique de *S. Typhimurium* » (formules *S. 4,5,12:i:-*, *S. 1,4,5,12:i:-*, *S. 4,12:i:-* et *S. 1,4,12:i:-*), « variant immobile de *S. Typhimurium* » (formules *S. 1,4,5,12:-:-*, *S. 1,4,12:-:-*, *S. 4,5,12:-:-* et *S. 4,12:-:-*) ou autre. Sur ces 3 années, la fréquence de signalement de « cas groupés⁸ » lors de l'envoi d'une souche de variant monophasique de *S. Typhimurium* est comprise entre 2,65% (52/1967 en 2010) et 3,05% (68/2230 en 2011). Les variants immobiles sont très rarement identifiés au CNR avec moins d'une vingtaine de souches reçues chaque année au CNR. Un à deux variants immobiles par an sont envoyés au CNR avec indication de cas groupés. La fréquence de signalement de « cas groupés » concernant les autres sérovars est comprise entre 2,44% (161/6600 en 2010) et 2,61% (180/6901 en 2011).

Il ne semble donc pas que les variants monophasiques de *S. Typhimurium* ou les variants immobiles de *S. Typhimurium* soient isolés plus souvent dans un contexte de cas groupés que les souches d'autres sérovars.

Notons également que, selon les données obtenues par le CNR « *Salmonella* », il n'existe pas de différences significatives entre les souches de *S. Typhimurium* et les variants monophasiques pour ce qui est des sites de prélèvements (selles, urines, sang, autres sites, etc.) ou de l'âge des patients atteints.

Les DO des TIAC ne peuvent pas être utilisées pour étudier les TIAC dues spécifiquement au variant monophasique de *S. Typhimurium*. En effet, les sérovars sont rarement renseignés sur les DO TIAC à *Salmonella*, et encore plus rarement lorsqu'il s'agit de sérovars autres que *Typhimurium* et *Enteritidis*. Par ailleurs, les variants monophasiques de *S. Typhimurium* sont souvent confondus avec *S. Typhimurium* par les laboratoires. A partir de 2013, l'information sur le caractère monophasique de *S. Typhimurium*, s'il est connu lors de l'établissement de la DO TIAC, pourra être saisie dans le cadre de la déclaration obligatoire d'une maladie auprès de l'InVS et pourra ensuite être exploitée.

4. Données françaises humaines concernant les variants de *S. Typhimurium* (CNR *Salmonella*)

Les variants monophasiques de *S. Typhimurium* sont passés du 11^{ème} rang des sérovars reçus au CNR (souches et comptes-rendus de sérotypage) en 2005 au 2^{ème} rang depuis 2011. En tenant compte de l'incertitude des données de sérotypage envoyées par

⁷ Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie en général digestive dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

⁸ Au moins 2 cas de gastro-entérite liés de maladie d'origine alimentaire quel que soit l'agent en cause.

les laboratoires au CNR, le variant monophasique de *S. Typhimurium* de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- constitue probablement aujourd'hui le sérovar majeur. Ces variants représentent 25% des souches reçues au CNR en 2011 et 22% en 2012. Pour mémoire, les 2 autres sérovares majeurs en France sont *Typhimurium* (avec 33% de souches et comptes-rendus reçus en 2011, et 23% des souches reçues en 2012) et *Enteritidis* (16% des souches et comptes-rendus reçus au CNR en 2011, et 14% des souches reçues en 2012).

Le tableau 3 présente les données du CNR *Salmonella* pour la période 2007-2012 sur le nombre de souches des variants monophasiques de *S. Typhimurium* (formules S. 4,5,12:i:-, S. 1,4,5,12:i:-, S. 4,12:i:-, S. 1,4,12:i:-, S. 1,4,12:-:1,2, S. 4,12:-:1,2, S. 4,5,12:-:1,2 et S. 1,4,5,12:-:1,2) et des variants immobiles (formules S. 1,4,5,12:-:-, S. 1,4,12:-:-, S. 4,5,12:-:- et S. 4,12:-:-).

TABLEAU 3: DISTRIBUTION DU NOMBRE DE SOUCHES DE *SALMONELLA* TOUT SEROVAR, DE VARIANTS MONOPHASIQUES ET IMMOBILES, PAR ANNEE, DE 2007 A 2012, FRANCE. DONNEES CNR 2007-2012.

Année	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nb de souches reçues au CNR	5628	7439	7464	7463	8849	8868
Variants monophasiques (% sur l'ensemble des souches de <i>Salmonella</i> reçues)	122 (2,2%)	409 (5,5%)	996 (13,4%)	1098 (14,7%)	2232 (25,2%)	1967 (22,2%)
4,5,12 :i :-	58	223	693	743	1757	1518
4,12 :i :-	27	40	133	264	390	392
1,4,5,12 :i :-	18	118	135	43	59	32
1,4,12 :i :-	15	28	49	48	24	25
1,4,12 :- :1,2	2	2	1	0	0	0
4,12 :- :1,2	10	5	2	3	6	4
4,5, 12 :- :1,2	2	1	9	10	5	6
1,4,5,12 :- :1,2	0	0	1	0	2	0
Variants immobiles	8 (0,1%)	25 (0,3%)	13 (0,2%)	21 (0,3%)	9 (0,1%)	19 (0,2%)
1,4,5,12 :- :-	3	10	7	0	1	2
1,4,12 :- :-	1	4	2	0	0	1
4,5,12 :- :-	3	3	3	7	7	12
4,12 :- :-	1	8	1	14	1	4

La part de variants monophasiques, toutes formules confondues, parmi l'ensemble des souches de *Salmonella* reçues au CNR chaque année est passée de 2,2% (avec 122 souches) en 2007 à 22,2% (avec 1967 souches) en 2012 (tableau 3). En 2011, cette proportion était la plus élevée sur la période d'étude avec 25,2% des souches reçues cette année (soit 2232 souches) : en effet, 2 épidémies à S.4,5,12:i:- d'ampleur importante sont survenues cette année-là (Gossner et al., 2012).

La formule antigénique la plus fréquente parmi les variants monophasiques est S.4,5,12:i:-, représentant 48% (en 2007) à 79% (en 2011) des variants monophasiques en fonction des années. La 2^{ème} formule la plus fréquente est S.4,12:i:-, représentant 10% à 24% de l'ensemble des variants monophasiques en fonction des années. Le nombre de souches de formule S.4,12:i:- est passé de 27 en 2007 à 392 en 2012.

Dans le tableau 3, on peut voir que parmi les souches de variants monophasiques reçues au CNR sur la période 2007-2012, peu de souches sont de formule antigénique se terminant par '-:1,2', entre 8 et 14 souches chaque année. Il ne semble pas non plus qu'il y ait une tendance à l'augmentation du poids de ces souches parmi les variants monophasiques. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, nous ne traiterons que des souches dont la formule antigénique se termine par 'i:-' pour l'étude des variants monophasiques de *S. Typhimurium*.

Les variants immobiles représentent peu de souches chaque année, de 8 à 25 en fonction des années, soit une proportion de 0,1% à 0,3% sur l'ensemble des souches reçues au CNR chaque année. On ne note pas de tendance à une augmentation de la part des variants immobiles parmi les souches reçues au CNR.

A partir des résultats obtenus par la méthode de typage CRISPOL en 2011 (Fabre et al., 2012), le CNR *Salmonella* a pu évaluer que 82% de ces variants immobiles avaient un fonds génétique de Typhimurium et surtout, près de 100% des souches monophasiques possédaient un fonds génétique de Typhimurium.

Les données du CNR-Salm entre 2007 et 2012 témoignent d'une nette augmentation de la proportion des souches de variants monophasiques de *S. Typhimurium* parmi les isolats reçus. Parmi les variants, les formules antigéniques S.4,5,12:i:- et S.4,12:i:- sont de loin les plus fréquentes. Parmi les souches identifiées comme variants monophasiques, près de 100% avaient un fonds génétique de *S. Typhimurium*. C'est également le cas pour 82% des variants immobiles. La détection de ces derniers apparaît, par leur occurrence, anecdotique.

5. Evaluation de la gravité des cas associés à des variants de *S. Typhimurium*

Une approche de la gravité des cas liés à des variants monophasiques de Typhimurium peut se faire par l'observation de la fréquence d'isolement de ces souches dans le sang et le suivi de l'évolution des taux d'hospitalisation liés à ces variants.

De 2007 à 2012, respectivement 1, 8, 19, 19, 32 et 24 variants monophasiques de *S. Typhimurium* avaient été isolés à partir d'hémoculture, soit un taux d'isolement dans le sang de 0,9% à 2% en fonction des années. En comparaison, pour la même période, ce taux était compris entre 3,7% et 4,5% pour le sérovar Enteritidis, et il était compris entre 2,7% et 4,0% pour le sérovar Typhimurium.

Concernant les variants immobiles de *S. Typhimurium*, de 0 à 2 souches par an étaient isolées de sang sur la période 2007-2012.

En dehors de la TIAC survenue à New-York en 1998 avec un taux d'hospitalisation de 70% (31/44) (Agasan et al., 2002), les taux d'hospitalisation dans les épidémies liées au sérovar S.4,[5],12:i:- (6%, 24% et 32% pour les 3 épidémies américaines (CDC, 2011b), 21% pour l'épidémie luxembourgeoise (Mossong et al., 2007), ne sont pas différents des taux d'hospitalisation observés pour des cas de salmonellose (lors d'épidémies ou non) provoqués par des sérovares différents. Par exemple, aux Etats-Unis, le taux d'hospitalisation des cas de salmonellose, tout sérovar confondu (en dehors de *S. Typhi* et *S. Paratyphi*), a été estimé à 27% (données 2000-2008, (Scallan et al., 2011)) et 28% sur des données de 1996 à 2010 (CDC, 2011b). Lors de l'épidémie européenne récente à *S. Stanley*, le taux d'hospitalisation pour les 40 cas épidémiques allemands et hongrois était de 53%. Néanmoins, ce taux d'hospitalisation élevé est à relativiser car les cas épidémiques étaient principalement identifiés à partir des laboratoires hospitaliers (ECDC/EFSA, 2012).

En France, les taux d'hospitalisation pour les 5 épidémies liées à un variant monophasique de *S. Typhimurium* en 2010 et 2011, étaient de 6% (Raguenaud et al., 2012), 23%, 33% (Bone et al., 2010), 36% (Gossner et al., 2012) et 39%. Pour comparaison, lors d'épidémies de salmonellose survenues en France depuis 2010, les taux d'hospitalisation observés étaient compris entre 11% et 63% avec un taux d'hospitalisation médian de 21% (données InVS non publiées).

Au vu des données françaises disponibles (source CNR), il ne semble pas que les infections humaines dues à un variant monophasique de Typhimurium conduisent à plus d'infections invasives que celles dues à d'autres sérovars.

Au vu des données disponibles, il ne semble pas que les infections humaines dues à un variant monophasique de Typhimurium conduisent à des taux d'hospitalisation plus élevés que pour des infections dues à d'autres sérovars.

6. Principales matrices alimentaires concernées

Dans la littérature, différentes matrices alimentaires ont été impliquées dans des épidémies humaines à variant monophasique de *S. Typhimurium*

- ✓ Initialement, le porc et les produits dérivés ont été associés à cette émergence. Deux épidémies de salmonellose de sérovar S.4,12:i:- au Luxembourg totalisant 133 cas confirmés, 24 hospitalisations et 1 décès sont survenues en 2006 (Mossong et al., 2007). Elles étaient liées à la consommation de produits à base de porc dans un établissement pour personnes âgées, dans une crèche et dans des restaurants. La souche était de lysotype DT193 et présentait un profil de résistance ASSuT. La même souche avait été identifiée dans un abattoir quelques mois auparavant.
- ✓ En 2006, 3 cas de salmonellose à S.4,5,12:i:- ont pu être liés à des contacts avec des tortues dans les états de l'Ohio et du Tennessee aux Etats-Unis (CDC, 2007b).
- ✓ En 2008, une épidémie familiale de salmonellose de sérovar S.4,[5],12:i:- liée à de l'eau de source contaminée, est survenue dans l'état du Tennessee aux Etats-Unis (Kozlica, Claudet, Solomon, Dunn, & Carpenter, 2010).
- ✓ Une épidémie liée à la manipulation de souris congelées contaminées par S.4,5,12:i:- et destinées à nourrir des reptiles au domicile des personnes (nouveaux animaux de compagnie, NAC) est survenue en 2010 aux Etats-Unis avec 34 malades identifiés (CDC, 2010). La souche responsable de cette épidémie américaine était identique à celle à l'origine d'une épidémie au Royaume-Uni en 2009 et liée aussi à l'utilisation de souris congelées pour nourrir les NAC. Ces souris provenaient d'une entreprise américaine (Harker, Lane, De Pinna, & Adak, 2011). Cette souche correspond au clone *S. Typhimurium* DT191a qui a été décrit au Royaume Uni depuis fin 2008 (Peters et al., 2010) et présente une résistance unique aux tétracyclines.
- ✓ Une autre épidémie liée à la consommation d'un « frozen pot pie » (sorte de tourte à base de viande ou de légumes) contaminé par S.4,[5],12:i:- est survenue, en 2007, aux USA et était à l'origine de 272 malades. (CDC, 2007a)
- ✓ Enfin, fin 2010, début 2011, une épidémie liée à la consommation de graines germées de luzerne (seules ou mélangées à des graines germées de radis ou de clous de girofles) contaminées par S.4,[5],12:i:- a été à l'origine de salmonelloses, chez 140 personnes, aux USA. (CDC, 2011a)

En France, 5 épidémies majeures de salmonellose, dues à un variant monophasique de *S. Typhimurium* sont survenues depuis 2010 et ont été investiguées (Jourdan Da Silva N. & Le Hello S., 2012).

- ✓ En 2010, avec 132 cas identifiés, une épidémie était due au variant 4,12:i:- et était liée à la consommation de saucisses sèches distribuées en grande surface. (Bone et al., 2010)

- ✓ Une autre épidémie était liée à la consommation de steaks hachés de bœufs surgelés contaminés par S.4,5,12:i:-. Cette épidémie survenue dans des collèges de Poitiers, a concerné 554 malades. (Raguenaud et al., 2012)
- ✓ Trois épidémies à S.4,4,512:i:- sont survenues en 2011 : l'une était due à la consommation de fromages de chèvre au lait cru (13 malades), la deuxième à la consommation de saucisson sec (337 cas) (Gossner et al., 2012). Pour la troisième (682 cas identifiés entre août et octobre versus 212 cas sur la même période en 2010), aucune source n'a pu être identifiée.

La 1^{ère} TIAC identifiée en France et liée à la consommation d'un produit à base d'œufs frais (tiramisu maison) contaminés par un variant immobile de S. Typhimurium, est survenue en 2009 (Le Hello et al., 2012).

Au total, depuis 2006, de nombreuses matrices alimentaires, mais aussi des contacts avec des nouveaux animaux de compagnie, ont été associés à des épidémies de salmonelloses dues à des variants monophasiques de Typhimurium, aussi bien en France que dans d'autres pays européens ou aux Etats-Unis.

V. Synthèse en vue de l'évaluation de l'impact des variants de S. Typhimurium en santé publique

Considérant les éléments ci-dessous :

- ✓ L'émergence mondiale de souches particulières, variants monophasiques de S. Typhimurium, est décrite depuis quelques années (2009-2010).
- ✓ Les épisodes récents recensés en France, en relation avec la consommation d'aliments contaminés par ces variants et les données du CNR, tendent à prouver que le risque de contamination alimentaire de l'Homme par ces variants et notamment ceux de formule antigénique 1,4,[5],12:i:-, est clairement le plus important depuis 2009 (ces variants représentent les agents étiologiques des principales TIAC et des épidémies nationales investiguées).
- ✓ D'après l'analyse détaillée par la technique CRISPOL, sur les 2 297 souches de variants monophasiques et 34 souches de variants immobiles analysées, 97,7% des monophasiques et 44,1% des immobiles appartiennent au sérovar Typhimurium.
- ✓ Sachant que les déterminants du sérovar de *Salmonella* spp. (antigène O et séquence peptidique variable des FliC et FljB) ne sont pas impliqués dans l'expression de la virulence de *Salmonella*, une réglementation basée sur la surveillance d'un nombre limité de sérovars spécifiques ne peut pas être considérée, *a priori*, comme une surveillance des souches les plus virulentes.
- ✓ L'analyse des données de surveillance concernant les souches S. 1,4,[5],12:i:- montre une augmentation de ces variants monophasiques entre 2010 et 2011 dans les élevages de volailles.
- ✓ Dans le cadre du réseau *Salmonella*, une augmentation des souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- est révélée dans la filière bovine (secteur Santé et Production animales) et dans les aliments issus de la filière porcine ; sur les 689 souches collectées entre 2011 et 2012 et présentant la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- (données du réseau *Salmonella*), 99,8% de ces souches possédaient un fonds génétique de Typhimurium.

- ✓ Toutes les souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:-:1,2 et cinq des neuf souches immobiles de formule antigéniques S. 1,4,[5],12:-:- collectées dans le cadre du réseau *Salmonella* possédaient un fonds génétique de Typhimurium (soit 56%).

Les variants monophasiques et immobiles de fonds génétique Typhimurium, présentent un risque sanitaire pour la santé publique, au même titre que S. Typhimurium. L'émergence du variant monophasique 1,4,[5],12:i:-, ainsi que sa large dispersion dans les filières et aliments recensés, est en faveur de son maintien dans le cadre des programmes de lutte. Par ailleurs, un suivi épidémiologique de ces différents variants semble utile.

VI. Pertinence des mesures de gestion appliquées en élevages

Actuellement les mesures de gestion n'existent qu'en filières avicoles. Les différentes réglementations en vigueur mettent l'accent sur les mesures à mettre en place en cas de suspicion et de confirmation d'infections des troupeaux par les sérovars concernés. Ces mesures sont différentes, en fonction des filières de production et des étapes de détection (entrée en élevage, œufs au couvoir, poussins en sortie de couvoirs, etc.).

D'une manière générale, la mise en évidence d'un sérovar visé entraîne la suspicion d'infection salmonellique contagieuse des volailles concernées⁹ et doit être immédiatement déclarée au Directeur en charge des services vétérinaires du département où ont été réalisés les prélèvements. A ce stade, les troupeaux concernés sont mis sous surveillance, c'est-à-dire séquestrés et maintenus isolés, et des prélèvements et analyses de confirmation sont réalisés dans les plus brefs délais. Lorsque la présence de l'infection est confirmée, le troupeau est déclaré infecté et des mesures spécifiques de police sanitaire sont appliquées, différentes selon le stade et les filières de production, mais visant particulièrement l'interdiction de sortie de l'exploitation des volailles et des produits qui en sont issus, l'élimination du troupeau concerné, le nettoyage et la désinfection des bâtiments. Dans tous les cas, il est interdit de remettre en place des volailles dans le bâtiment incriminé avant la levée de l'arrêté préfectoral portant déclaration d'infection.

Ainsi, ces mesures très strictes, appliquées depuis quelques années, ont entraîné un assainissement remarquable des troupeaux de volailles de reproduction et une diminution progressive de la prévalence salmonellique dans ces filières. De plus, l'application de ces mesures dans les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation (élimination des troupeaux, retrait et rappel des œufs de consommation produits par ces troupeaux infectés) a entraîné, indubitablement, une diminution de l'entrée de ces sérovars dans la chaîne alimentaire depuis 1998. (Poirier et al., 2008)

L'émergence des variants monophasiques et immobiles de S. Typhimurium dans les filières avicoles concernées par cette réglementation ne s'est pas traduite par une recrudescence de la prévalence salmonellique dans ces élevages. En conséquence, l'application des mesures réglementaires de gestion recommandées dans les filières avicoles, incluant les variants monophasiques et immobile de S. Typhimurium, devrait être maintenue. Dans le cadre d'un suivi épidémiologique de ces souches, la mise en place de cette surveillance devrait s'accompagner d'une procédure adaptée de caractérisation de

⁹ A l'exception des troupeaux de poulets et de dindes de chair, pour lesquels il n'y a pas l'étape de "confirmation" par l'analyse d'autres prélèvements.

ces souches ; une attention particulière devrait être portée aux méthodes de détection et de caractérisation des souches immobiles.

Concernant les variants de non *S. Typhimurium*, il convient de rappeler que si certains sérovars sont «exotiques», d'autres sont isolés plus fréquemment dans les filières de production animale (Agama, Stanley, Saintpaul, Derby, Agona, Heidelberg, Coeln) ou présentent un danger en santé publique; ainsi, en 2002, *S. Paratyphi B*, variété Java a été à l'origine de nombreux cas de toxi-infections alimentaires aux Pays-Bas, liés à la consommation de viandes de volailles (W. Van Pelt et al. 2003). Cependant, à l'heure actuelle les réglementations en vigueur, dans les filières avicoles, concernent uniquement *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*, ainsi que trois autres sérovars (Hadar, Infantis et Virchow) pour les reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus*. De plus il semble que, selon les données du CNR « *Salmonella* », lors de la détection d'une souche présentant une formule antigénique compatible avec un variant de *S. Typhimurium*, la probabilité qu'il s'agisse d'un variant de non *S. Typhimurium* est très faible. En conséquence, ces variants de non *S. Typhimurium*, à condition d'être confirmés comme tels par des méthodes de diagnostic adaptées faisant probablement appel à la biologie moléculaire, pourraient être écartés des mesures de police sanitaire préconisées.

Les mesures strictes appliquées depuis des années ont entraîné une diminution progressive de la prévalence des salmonelles dans les filières avicoles. Au regard de la représentation importante et croissante du variant monophasique de *S. Typhimurium* dans les cas humains et de la faible contribution des filières avicoles pour ce variant, une plus large répartition dans les filières animales des dispositifs de surveillance et la mise en œuvre de mesures de gestion adaptées méritent considération.

VII. Méthodes reconnues pour la détection et la caractérisation

1. Performances des méthodes de détection des variants de *S. Typhimurium*

Les expériences menées par le LNR, le Service commun des laboratoires (SCL) de Rennes et les conclusions émanant des ateliers de travail du LR-UE *Salmonella* de 2010 et 2011 rejoignent les conclusions figurant dans les récents avis des agences d'évaluation (AFSSA, 2009; EFSA, 2010b): les variants monophasiques sont détectables par les méthodes normalisées et les variants immobiles également, excepté par les méthodes basées sur la mobilité des souches. Les méthodes alternatives validées peuvent être utilisées à condition que l'étude de validation ait inclus les variants considérés.

2. Sous-estimation analytique éventuelle de certains variants

Comme le précisait déjà en 2009 l'avis de l'AFSSA du 16 octobre, il est essentiel de pouvoir distinguer les souches variants monophasiques ou immobiles présentant les formules antigéniques *S.* 1,4,[5],12:i:-, *S.* 1,4,[5],12:-:1,2 et *S.* 1,4,[5],12:-:- des souches de sérovar *Typhimurium*. Un sérotypage complet de ces souches, incluant l'étape d'inversion de phase, est donc demandé par la DGAL depuis le 4 mars 2010 dans la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059.

Aujourd'hui, une sous-estimation des souches de formule *S.* 1,4,[5],12:i:- semble pouvoir exister même si la capacité des laboratoires agréés et reconnus à détecter ces variants, évaluée par EILA, est satisfaisante et que la performance des méthodes utilisées ne semble pas remise en cause en l'état actuel des connaissances. Cette sous-estimation s'avère difficile à apprécier et une amélioration de la qualité des résultats rendus peut encore être obtenue en accentuant les efforts de communication sur l'intérêt de détailler la formule antigénique obtenue par sérotypage complet.

Au regard des données collectées par les enquêtes et contrôles réalisés en élevages, en utilisant la méthode officielle normalisée AFNOR qui permet de détecter toutes les souches de *Salmonella* spp., la fréquence d'isolement des souches de variants immobiles en filière *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo* est bien plus faible que celle des variants monophasiques. Malgré cette observation, il n'apparaît pas opportun de se restreindre uniquement aux méthodes permettant la détection des souches monophasiques en filière avicole. Même si la part des variants immobiles en clinique humaine semble faible, elle peut être sous estimée. Maintenir par des méthodes analytiques adaptées la détection du variant immobile permet également de collecter des données de surveillance, démarche dont l'intérêt a été récemment souligné en atelier de travail organisé par le LR-UE.

3. Disponibilité d'une méthode de caractérisation des variants S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 ou S. 1,4,[5],12:-: reconvenue comme méthode officielle pour différencier les variants des différents sérovars

Une méthode a été développée par le LNR pour différencier les variants de sérovar Typhimurium des variants de sérovars non Typhimurium, dans le respect des recommandations émises par l'EFSA dans son avis de 2010.

A ce jour, il n'existe pas de protocole pour la validation d'une méthode de confirmation ou de caractérisation applicable dans le domaine de l'hygiène des aliments, s'appuyant sur la méthode NF EN ISO 16140 complétée pour les méthodes PCR par la norme NF EN ISO 22118. Concernant le domaine de la santé animale, la norme NF U47-600 décrit les exigences applicables à la validation d'une méthode PCR.

Les travaux menés par le LNR permettent aujourd'hui d'avoir des garanties suffisantes de performance de cette méthode interne, en termes d'inclusivité et d'exclusivité et au regard des résultats qui peuvent être obtenus par d'autres méthodes, testées en absence de méthode de référence. La corrélation des résultats obtenus en comparaison avec la méthode Check&Trace *Salmonella* et les autres données de caractérisation moléculaire (PFGE, MLVA, etc.) conforte les performances de la méthode interne du LNR.

Parmi les 689 souches collectées en 2011 et 2012 par le réseau *Salmonella* et présentant la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, 99,8% de ces souches étaient des variants du sérovar Typhimurium.

Toutes les souches S. 1,4,[5],12:-:1,2 collectées en 2011 et 2012 (n=8), étaient des variants du sérovar Typhimurium.

Par contre, cinq des neuf souches immobiles S. 1,4,[5],12:-: collectées sur cette même période étaient des souches dérivées d'un autre sérovar que Typhimurium.

Si l'objectif est de caractériser systématiquement tous les isolats présentant une formule antigénique de type variant, alors plusieurs méthodes pourront, à terme, permettre de le faire ; mais, à ce jour, et en l'état actuel des connaissances, la méthode interne développée par le LNR est la méthode la plus complète pour répondre à l'objectif recherché. La facilité de mise en œuvre de cette méthode est propice à sa mise en place rapide et aisée au sein d'un laboratoire agréé ou reconnu, surtout si celui-ci pratique déjà des analyses par PCR conventionnelle. Cependant, quelle que soit l'expérience du laboratoire, celui-ci devra avoir préalablement évalué la reproductibilité intra-laboratoire de la méthode avant de rendre des résultats officiels d'analyse.

Conclusions du CES « Biorisk »

Concernant le bilan de la surveillance dans les filières animales

Même si, dans un premier temps, la filière de production porcine était principalement concernée par l'émergence de ce variant monophasique, ces souches semblent avoir diffusé dans plusieurs filières animales dans de nombreux pays, dont la France. En

l'absence de surveillance des *Salmonella* dans la filière porcine, l'origine de l'émergence en France reste hypothétique. Cependant, les différentes enquêtes menées tant dans les élevages que sur les produits alimentaires démontrent également l'émergence de ce variant monophasique dans les secteurs de la volaille et des bovins. De même, les résultats d'enquêtes épidémiologiques consécutives à des toxi-infections alimentaires, indiquent que différentes matrices alimentaires issues de différentes filières ont également été incriminées (saucisses et saucissons secs, steaks hachés, fromages de chèvre au lait cru). A ce jour, en France, les variants immobiles de *S. Typhimurium* représentent une très faible part des cas de salmonellose, même si une TIAC liée à ce sérovar a été identifiée en 2009.

Concernant l'évaluation de l'impact des variants de *S. Typhimurium* en santé publique

L'émergence du variant monophasique de *S. Typhimurium* est bien réelle, aussi bien en France que dans les autres pays européens ou aux Etats-Unis, et le poids des salmonelloses humaines liées à ce sérovar ne cesse d'augmenter.

Au vu des données issues de la littérature d'une part et du CNR *Salmonella* et de l'InVS d'autre part, les variants monophasiques de *S. Typhimurium* ne semblent pas être associés à une morbidité plus élevée que les autres sérovares de *Salmonella*. De fait, il est établi que ces variants ne possèdent pas de pathogénicité particulière, ce qui est compatible avec le fait que les déterminants antigéniques du sérovar (antigènes somatiques et flagellaires) ne sont pas impliqués dans l'expression de la virulence des salmonelles. En conséquence, ces variants doivent être considérés au même titre que *S. Typhimurium*, en termes de danger.

Concernant la pertinence des mesures de gestion en élevages

Depuis de nombreuses années, une réglementation est appliquée pour lutter, avec succès, contre la présence de certains sérovares de *Salmonella*, et plus particulièrement de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les élevages avicoles (*Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*). L'émergence des variants monophasiques a été notée par cette surveillance, sans assister pour autant à une recrudescence de la prévalence des salmonelles dans les troupeaux de plus de 250 individus. Actuellement, seules trois filières avicoles sont prises en considération ; or, les données recueillies par les laboratoires suggèrent que *S. Typhimurium* et ses variants monophasiques sont au moins autant présents dans d'autres systèmes de productions animales (porcs, bovins). Dans un tel contexte, des filières animales autres que celles liées à l'aviculture mériteraient également d'être surveillées. La mise en place de ces mesures devrait conduire à une meilleure surveillance de l'émergence de nouvelles souches de *Salmonella* et à une meilleure visibilité de l'évolution des profils d'antibiorésistance. Cette surveillance élargie permettra un ajustement régulier de la réglementation pour un impact favorable sur la santé publique.

Concernant la détermination de méthodes reconnues pour l'isolement et la caractérisation, en santé animale et en hygiène des aliments, des variants du sérovar *Typhimurium*

Le sérotypage complet des souches reçues par les laboratoires reconnus et agréés, permettrait de mieux apprécier une probable sous-estimation des souches de *S. 1,4,[5],12:i:-*. De même, cela permettrait de collecter des données de surveillance des différentes souches de variants en santé animale et en hygiène des aliments. Les propositions faites par le LNR dans son rapport d'expertise scientifique et technique semblent propices à la mise en place de la méthode interne du LNR dans les laboratoires agréés et reconnus, si toutefois le gestionnaire prenait une telle décision au regard des éléments présentés dans cet avis et d'éléments de gestion dont il dispose par ailleurs.

Concernant les variants de non *S. Typhimurium* - c'est-à-dire des variants dont le fonds génétique correspond à des sérovares autres que *Typhimurium*, et pour lesquels l'évolution dans l'expression des phases flagellaires leur confère une formule antigénique identique

aux variants de *S. Typhimurium* -, il apparaît qu'aucun d'entre eux n'est actuellement inclus dans la liste des 5 sérovars recherchés dans le cadre de l'application des réglementations nationales mises en place pour les filières avicoles (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis* et *S. Virchow*) ; cependant, certains d'entre eux sont retrouvés dans les filières de production animale, y compris avicole, et sont parfois à l'origine d'incidents de santé publique (par exemple *S. Paratyphi B*, var. Java). Il semble cependant que les variants identifiés, par les systèmes de surveillance, comme monophasiques et, dans une moindre mesure immobiles, appartiennent très majoritairement au sérovar *Typhimurium*. Il pourrait être possible d'exclure les variants de non *S. Typhimurium* des mesures de gestion, à condition que ces derniers soient véritablement confirmés sous ce statut. Compte-tenu de la faible incidence que représentent actuellement ces variants de non *S. Typhimurium* dans les données recueillies, le bénéfice de cette mesure d'exclusion devrait être évalué en fonction des conséquences économiques induites.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions des CES « Biorisk » et souligne la pertinence d'une évaluation régulière de la situation épidémiologique en matière de salmonelles afin d'adapter le suivi, et le cas échéant les mesures de gestion dans les différentes filières à l'évolution des sérovars (notamment émergents comme Kentucky récemment) et des profils d'antibiorésistance.

Le directeur général

Marc Mortureux

SIGLES ET ABBREVIATIONS

CNR : Centre national de référence ;

CRISPOL: Clustered regularly interspaced short palindromic polymorphism ;

DGAL : Direction générale de l'alimentation ;

DGCCRF : Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes ;

DGS : Direction générale de la santé ;

EST : Expertise scientifique et technique ;

HQPAP : Unité d'hygiène et qualité des produits avicoles et porcins ;

InVS : Institut national de veille sanitaire ;

LNR : Laboratoire national de référence ;

LSA : Laboratoire de santé animale ;

LSAI : Laboratoire de sécurité des aliments ;

MLVA : Analyse de plusieurs locus VNTR (Multiple Loci VNTR Analysis) ;
MRC : Maladies réputées contagieuses ;
PFGE: Electrophorèse en champs pulsé (Pulsed field gel electrophoresis);
TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives ;
VNTR: Variable number of tandem repeat.

MOTS-CLES

Variants de *Salmonella* Typhimurium ; police sanitaire ; détection ; caractérisation ; filières animales.

BIBLIOGRAPHIE

- AFSSA. (2009). Avis de la saisine n°2009-SA-0182, relatif à une demande d'avis sur deux projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus*. <http://www.anses.fr/Documents/SANT2009sa0182.pdf>.
- Agasan, A., Kornblum, J., Williams, G., Pratt, C. C., Fleckenstein, P., Wong, M., & Ramon, A. (2002). Profile of *Salmonella* enterica subsp. enterica (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 1924-1929.
- Bone, A., Noel, H., Le Hello, S., Pihier, N., Danan, C., Raguenaud, M. E., . . . Jourdan-da Silva, N. (2010). Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Euro surveillance*, 15(24).
- Bravo, D., Hoare, A., Silipo, A., Valenzuela, C., Salinas, C., Alvarez, S. A., . . . Contreras, I. (2011). Different sugar residues of the lipopolysaccharide outer core are required for early interactions of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Typhimurium with epithelial cells. *Microbial pathogenesis*, 50(2), 70-80. doi: 10.1016/j.micpath.2010.11.001
- Bugarel, M., Vignaud, M. L., Moury, F., Fach, P., & Brisabois, A. (2012). Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Microbiologyopen*, 1(4), 481-489. doi: 10.1002/mbo3.39
- CDC. (2007a). Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with frozen pot pies. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008 Nov 28;57(47):1277-80.: Centers for Disease Control and Prevention, Etats-Unis.
- CDC. (2007b). Turtle-associated salmonellosis in humans, weekly report 56(26), pp.649-52: Centers for Disease Control and Prevention, Etats-Unis.
- CDC. (2010). Multistate Outbreak of Human *Salmonella* I 4,[5],12:i:-Infections Associated with Frozen Rodents <http://www.cdc.gov/salmonella/frozenrodents/index.html>: Centers for Disease Control and Prevention, Etats-Unis. .
- CDC. (2011a). Multistate Outbreak of Human *Salmonella* I 4,[5],12:i:- Infections Linked to Alfalfa Sprouts <http://www.cdc.gov/salmonella/i4512i-/021011/index.html>: Centers for Disease Control and Prevention
- CDC. (2011b). Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2010. *MWR Morbidity Mortality Weekly Report*. Jun 10;60(22); pp.749-55.: Centers for Disease Control and Prevention, Etats-Unis.

- CNR-*Salmonella*. (2011). Centre National de Référence des *Salmonella* (<http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004i-03v/ra-cnr-salm-2011.pdf>): Institut Pasteur, France.
- De la Torre, E., Zapata, D., Tello, M., Mejia, W., Frias, N., Garcia Pena, F. J., . . . Torre, E. (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2395-2400.
- Delmas, G., Jourdan da Silva, N., Pihier, N., Weill, FX, Vaillant, V, & de Valk, H. (2010). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008 *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* (pp. pp.344-348.).
- Dunn-Siegrist, I., Tissieres, P., Drifte, G., Bauer, J., Moutel, S., & Pugin, J. (2012). Toll-like receptor activation of human cells by synthetic triacylated lipid A-like molecules. *The Journal of biological chemistry*, 287(20), 16121-16131. doi: 10.1074/jbc.M112.348383
- Eaves-Pyles, T. D., Wong, H. R., Odoms, K., & Pyles, R. B. (2001). *Salmonella* flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *Journal of immunology*, 167(12), 7009-7016.
- ECDC/EFSA. (2012). Rapid risk Assessment: Multi-country outbreak of *Salmonella* Stanley infections http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/20120921_rra_stanley_salmonella.pdf.
- Echeita, M. A., Aladuena, A., Cruchaga, S., & Usera, M. A. (1999). Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), 3425.
- Echeita, M. A., Herrera, S., & Usera, M. A. (2001). Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), 2981-2983. doi: 10.1128/jcm.39.8.2981-2983.2001
- EFSA-Q-2006-042A. (2008). Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 135, pp.1-111.
- EFSA. (2010a). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm. *EFSA Journal* 8(10):1826., 48 pp.
- EFSA. (2010b). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*, 8(10), p.1826.
- Eom, J. S., Kim, J. S., Jang, J. I., Kim, H. G., Bang, I. S., & Park, Y. K. (2012). Effect of iacP mutation on flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium strain UK-1. *Journal of bacteriology*, 194(16), 4332-4341. doi: 10.1128/jb.00076-12
- Fabre, L., Zhang, J., Guigon, G., Le Hello, S., Guibert, V., Accou-Demartin, M., . . . Weill, F. X. (2012). CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 7(5), e36995. doi: 10.1371/journal.pone.0036995
- Finlay, B. B. (1994). Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, 192, 163-185.
- Forbes, S. J., Eschmann, M., & Mantis, N. J. (2008). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antilipoplysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. *Infection and immunity*, 76(9), 4137-4144. doi: 10.1128/iai.00416-08
- Garai, P., Gnanadhas, D. P., & Chakravorty, D. (2012). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence*, 3(4), 377-388. doi: 10.4161/viru.21087

- Gerlach, R. G., Claudio, N., Rohde, M., Jackel, D., Wagner, C., & Hensel, M. (2008). Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cellular microbiology*, 10(11), 2364-2376. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01218.x
- Gossner, C. M., van Cauteren, D., Le Hello, S., Weill, F. X., Terrien, E., Tessier, S., . . . Jourdan-da Silva, N. (2012). Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveillace*, 17(5).
- Guiney, D. G. (2005). The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Current topics in microbiology and immunology*, 289, 131-150.
- Guo, A., Cao, S., Tu, L., Chen, P., Zhang, C., Jia, A., . . . Schifferli, D. M. (2009). FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. *Microbiology*, 155(Pt 5), 1623-1633. doi: 10.1099/mic.0.026286-0
- Hancox, L. S., Yeh, K. S., & Clegg, S. (1997). Construction and characterization of type 1 non-fimbriate and non-adhesive mutants of *Salmonella* typhimurium. *FEMS immunology and medical microbiology*, 19(4), 289-296.
- Harker, K. S., Lane, C., De Pinna, E., & Adak, G. K. (2011). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT191a associated with reptile feeder mice. *Epidemiology and infection*, 139(8), 1254-1261. doi: 10.1017/s0950268810002281
- Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., . . . Malorny, B. (2010). Pork contaminated with *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4601-4610. doi: 10.1128/aem.02991-09
- Hoare, A., Bittner, M., Carter, J., Alvarez, S., Zaldivar, M., Bravo, D., . . . Contreras, I. (2006). The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella* enterica serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infection and immunity*, 74(3), 1555-1564. doi: 10.1128/iai.74.3.1555-1564.2006
- Hoffmann, C., Galle, M., Dilling, S., Kappeli, R., Muller, A. J., Songhet, P., . . . Hardt, W. D. (2010). In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of *S. typhimurium* can proceed in the absence of flagellin. *PLoS One*, 5(8), e12477. doi: 10.1371/journal.pone.0012477
- Hopkins, K. L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S. A., Lucarelli, C., Porrero, M. C., . . . Mevius, D. J. (2010). Multiresistant *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro surveillance*, 15(22), 19580.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella*-the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular microbiology*, 11(11), 1579-1586. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x
- Jourdan Da Silva N., & Le Hello S. (2012). Salmonelloses en France, 2002-2010 : tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. Numéro thématique « Risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale : surveillance et évaluation ». http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8148. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire - Hors-série*.
- Kisiela, D., Sapeta, A., Kuczkowski, M., Stefaniak, T., Wieliczko, A., & Ugorski, M. (2005). Characterization of FimH adhesins expressed by *Salmonella* enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum: reconstitution of mannose-binding properties by single amino acid substitution. *Infection and immunity*, 73(9), 6187-6190. doi: 10.1128/iai.73.9.6187-6190.2005
- Kong, Q., Yang, J., Liu, Q., Alamuri, P., Roland, K. L., & Curtiss, R., 3rd. (2011). Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella* enterica serovar typhimurium. *Infection and immunity*, 79(10), 4227-4239. doi: 10.1128/iai.05398-11

- Kozlica, J., Claudet, A. L., Solomon, D., Dunn, J. R., & Carpenter, L. R. (2010). Waterborne outbreak of *Salmonella* 4,5,12:i. *Foodborne pathogens and disease*, 7(11), 1431-1433. doi: 10.1089/fpd.2010.0556
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R., & Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular microbiology*, 58(5), 1322-1339. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x
- Le Hello, S., Brisabois, A., Accou-Demartin, M., Josse, A., Marault, M., Francart, S., . . . Weill, F. X. (2012). Foodborne outbreak and nonmotile *Salmonella enterica* variant, France. *Emerging infectious diseases*, 18(1), 132-134. doi: 10.3201/eid1801.110450
- Ledeboer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M., & Jones, B. D. (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and immunity*, 74(6), 3156-3169. doi: 10.1128/iai.01428-05
- Lucarelli, C., Dionisi, A. M., Torpdahl, M., Villa, L., Graziani, C., Hopkins, K., . . . Luzzi, I. (2010). Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *Journal of clinical microbiology*, 48(6), 2103-2109. doi: 10.1128/jcm.01371-09
- Meng, J., Gong, M., Bjorkbacka, H., & Golenbock, D. T. (2011). Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions. *Journal of immunology*, 187(7), 3683-3693. doi: 10.4049/jimmunol.1101397
- Mossong, J., Marques, P., Ragimbeau, C., Huberty-Krau, P., Losch, S., Meyer, G., . . . Schneider, F. (2007). Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro surveillance*, 12(6), E11-12.
- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., & Sirard, J. C. (2008). Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal of immunology*, 181(3), 2036-2043.
- Peters, T., Hopkins, K. L., Lane, C., Nair, S., Wain, J., & de Pinna, E. (2010). Emergence and characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT191a. *Journal of clinical microbiology*, 48(9), 3375-3377. doi: 10.1128/jcm.00109-10
- Pilar, A. V., Reid-Yu, S. A., Cooper, C. A., Mulder, D. T., & Coombes, B. K. (2012). GogB is an anti-inflammatory effector that limits tissue damage during *Salmonella* infection through interaction with human FBXO22 and Skp1. *PLoS pathogens*, 8(6), e1002773. doi: 10.1371/journal.ppat.1002773
- Pino, O., Martin, M., & Michalek, S. M. (2005). Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infection and immunity*, 73(10), 6763-6770. doi: 10.1128/iai.73.10.6763-6770.2005
- Poirier, E., Watier, L., Espie, E., Weill, F.-X., Valk, H. D., & Desenclos, J.-C. (2008). Evaluation of the impact on human salmonellosis of control measures targeted to *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in poultry breeding using time-series analysis and intervention models in France. *Epidemiology and Infection*, 136(09), 1217-1224. doi: doi:10.1017/S0950268807009788
- Raguenaud, M. E., Le Hello, S., Salah, S., Weill, F. X., Brisabois, A., Delmas, G., & Germonneau, P. (2012). Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. *Euro surveillance*, 17(40), 20289.

- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology*, 12(11), 509-517. doi: 10.1016/j.tim.2004.09.002
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., . . . Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7-15. doi: 10.3201/eid1701.091101p1
- Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C. S., Umansky, V., & Cerwenka, A. (2012). Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Immunology*, 189(12), 5602-5611. doi: 10.4049/jimmunol.1201018
- Singh, B., Fleury, C., Jalalvand, F., & Riesbeck, K. (2012). Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS microbiology reviews*, 36(6), 1122-1180. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00340.x
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., . . . Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature immunology*, 4(12), 1247-1253. doi: 10.1038/ni1011
- Soyer, Y., Moreno Switt, A., Davis, M. A., Maurer, J., McDonough, P. L., Schoonmaker-Bopp, D. J., . . . Wiedmann, M. (2009). *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *Journal of clinical microbiology*, 47(11), 3546-3556. doi: 10.1128/jcm.00546-09
- Switt, A. I., Soyer, Y., Warnick, L. D., & Wiedmann, M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i-. *Foodborne pathogens and disease*, 6(4), 407-415. doi: 10.1089/fpd.2008.0213
- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., . . . Baumler, A. J. (2001). *Salmonella* enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infection and immunity*, 69(5), 2894-2901. doi: 10.1128/iai.69.5.2894-2901.2001
- Tukel, C., Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Akcelik, M., & Baumler, A. J. (2006). Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS immunology and medical microbiology*, 46(3), 320-329. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00051.x
- Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chausse, A. M., . . . Virlogeux-Payant, I. (2012). Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiologyopen*, 1(3), 243-258. doi: 10.1002/mbo3.28
- Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella* enterica. *Advances in experimental medicine and biology*, 715, 17-34. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9_2
- Wasył, D., & Hoszowski, A. (2012). Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella* enterica serovar typhimurium (1,4,[5],12:i:-) of non-human origin in Poland. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Foodborne pathogens and disease*, 9(11), 1037-1043. doi: 10.1089/fpd.2012.1154
- Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M., & Baumler, A. J. (2005). The *Salmonella* enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infection and immunity*, 73(6), 3358-3366. doi: 10.1128/iai.73.6.3358-3366.2005
- Wu, H., Jones, R. M., & Neish, A. S. (2012). The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. *Cellular microbiology*, 14(1), 28-39. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01694.x

ANNEXE

Rapport d'expertise scientifique et technique.

Identification de variants de *Salmonella* Typhimurium et prise en compte de ces variants dans le programme officiel de lutte en élevage avicole

Saisine « 2012-SA-0214, Identification de variants de *Salmonella* Typhimurium et prise en compte de ces variants dans le programme officiel de lutte en élevage avicole »

Saisine liée « 2009-SA-0182, Projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus* »

RAPPORT d'expertise scientifique et technique

**Laboratoire de sécurité des aliments,
sites de Maisons-Alfort et de Boulogne-sur-Mer,
Unité Epidémiologie et Caractérisation Bactérienne (CEB)**

**Laboratoire de Ploufragan/Plouzané,
Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP)**

Décembre 2012

Mots clés

Salmonella ; Variants de S. Typhimurium ; Lutte en élevage ; Santé animale ; Hygiène des aliments ; Méthode d'analyse officielle ; Détection ; Caractérisation ; Laboratoires agréés et reconnus.

Présentation des intervenants

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique / Secrétariat administratif

M. Renaud LAILLER – Chef adjoint de l'unité CEB – Anses

Contribution scientifique

Mme Marylène BOHNERT – Responsable du LNR *Salmonella*, unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP) – Anses - Site de Ploufragan

Mme Anne BRISABOIS – Chef de l'unité « Caractérisation et épidémiologie bactérienne » (CEB) - Laboratoire de sécurité des aliments, site de Maisons-Alfort (LSAI) - Anses

Mme Marianne CHEMALY – Adjointe au chef d'unité HQPAP – Anses – Site de Ploufragan

Mme Martine DENIS – Chef de l'unité HQPAP – Anses - Site de Ploufragan

M. Renaud LAILLER – Chef adjoint de l'unité CEB- LSAI – Anses

M. Bertrand LOMBARD – Sous-Directeur en charge de la référence - LSAI - Anses

Mme Frédérique MOURY – Responsable de l'équipe *réseau Salmonella* de l'unité CEB - LSAI - Anses

AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES

/

CONTRIBUTIONS EXTERIEURES AU COLLECTIF

Service Commun des Laboratoires – SCL Laboratoire 35

Mme Nelly JARDY- Directrice de l'Unité Biologie

Laboratoire Départemental de la Sarthe

Mme Sylvie POLIAK - Directrice

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	7
Liste des tableaux.....	7
Liste des figures	10
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande d'expertise scientifique et technique dans le cadre de la saisine	11
1.1 Contexte.....	11
1.2 Objet de la saisine.....	13
1.2.1 Les enjeux de la saisine.....	13
1.2.2 Rappel des questions posées.....	13
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	14
2 Définitions et terminologies employées.....	15
2.1 Terminologies employées	15
2.2 Reformulation des questions de la saisine	18
3 Surveillance nationale des <i>Salmonella</i> – importance des variants d'origine agro-alimentaire :.....	20
3.1 Bilan de la surveillance dans la filière volaille	20
3.1.1 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de Reproducteurs de l'espèce <i>Gallus gallus</i>	21
3.1.2 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de poules pondeuses.....	22
3.1.2.1 Enquête européenne de 2004-2005.....	22
3.1.2.1 Bilan national d'exécution du plan de lutte	23
3.1.3 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de poulets de chair.....	24
3.1.3.1 Enquête européenne de 2005-2006.....	24
3.1.3.1 Bilan national d'exécution du plan de lutte	25
3.1.4 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de dindes	26
3.1.4.1 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de dindes de chair	26
3.1.4.1.1 Enquête européenne 2006-2007.....	26
3.1.4.1.2 Bilan national d'exécution du plan de lutte	26
3.1.4.2 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de dindes reproductrices	27
3.1.4.2.1 Enquête européenne 2006-2007.....	27
3.1.4.2.2 Bilan national d'exécution du plan de lutte	28
3.1.5 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les abattoirs sur les carcasses de poulets de chair, en 2008	28
3.1.6 Prévalence de <i>Salmonella</i> sur les produits de poulets de chair à la distribution.....	29
3.1.7 Prévalence de <i>Salmonella</i> sur les produits de dindes de chair à la distribution.....	30
3.2 Bilan de la surveillance dans la filière porcine	31
3.2.1 Prévalence de <i>Salmonella</i> dans les élevages de porcs	31
3.2.1.1 Chez les reproducteurs	31
3.2.1.2 Chez les porcs charcutiers	35
3.2.2 Prévalence de <i>Salmonella</i> sur les carcasses de porcs charcutiers à l'abattoir.....	35
3.2.3 Prévalence de <i>Salmonella</i> sur les produits de porcs à la distribution	37

3.3	Bilan de la surveillance assurée par le réseau <i>Salmonella</i>	37
3.3.1	Le réseau <i>Salmonella</i> : objectifs et fonctionnement	37
3.3.2	La qualité des données collectées.....	38
3.3.3	Données descriptives des isollements de souches enregistrées dans la base de données du réseau <i>Salmonella</i>	41
3.3.3.1	Données générales disponibles	41
3.3.3.1	Données concernant plus spécifiquement les variants.....	47
4	Disponibilité des méthodes analytiques	51
4.1	Concernant la détection de ces variants	51
4.1.1	Etat des lieux des méthodes officielles.....	51
4.1.1.1	Qu'est ce qu'une méthode officielle ?.....	51
4.1.1.2	Liste des méthodes alternatives validées NF pour la détection des <i>Salmonella</i>	52
4.1.2	Retour d'expérience du terrain concernant la détection des variants	56
4.1.2.1	Retour d'expérience du LNR	56
4.1.2.2	Questionnaire du LNR adressé aux réseaux de laboratoires agréés et aux laboratoires reconnus	56
4.1.2.3	Etude du SCL de Rennes.....	56
4.1.2.1	Groupes de travail du LR-UE <i>Salmonella</i>	58
4.2	Concernant la caractérisation de ces variants	59
4.2.1	Méthode mise en œuvre par le LNR associé	59
4.2.2	Reconnaissance officielle de la méthode interne	61
4.2.3	Résultats et performances de la méthode interne.....	62
4.2.4	Autres méthodes.....	63
4.2.5	Résultats des travaux de confirmation des variants par le LNR.....	65
5	Conclusion	68
5.1	Concernant la synthèse des données issues de la surveillance	68
5.2	Concernant les performances des méthodes de détection des variants	68
5.3	Concernant la sous-estimation analytique éventuelle de certains variants	69
5.4	Concernant la disponibilité d'une méthode de caractérisation des variants S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-, reconnue comme méthode officielle pour différencier les variants des différents sérovars	69
5.5	Concernant la mise en place de la méthode interne du LNR par les laboratoires agréés et reconnus	70
6	Bibliographie	71
6.1	Publications.....	71
6.2	Normes.....	72
6.3	Ateliers de travail	73
6.4	Législation et réglementation.....	73
ANNEXES	74
Annexe 1	: Lettre de saisine	75
Annexe 2	: Questionnaire du LNR adressé aux laboratoires agréés / reconnus	79

Annexe 3 : Illustrations des résultats d'amplification par PCR par la méthode interne n°CEB21 du LNR pour la confirmation des souches de *Salmonella* , variants du sérovar Typhimurium. [-A : résultats obtenus par PCR simple ; -B : résultats obtenus par les deux PCR multiplex].80

Sigles et abréviations

AM : Ampicilline ;

C : Chloramphénicol ;

CNR : Centre national de référence ;

CRISPOL : Clustered regularly interspaced short palindromic polymorphism ;

DGAL : Direction générale de l'alimentation ;

ECDC : Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (European Centre for Disease Prevention and Control) ;

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments (European Food Safety Authority) ;

G : Gentamicine ;

IC95% : Intervalle de Confiance à 95%

LNR : Laboratoire national de référence ;

MLVA : Analyse de plusieurs locus VNTR (Multiple Loci VNTR Analysis) ;

MO : Mode opératoire

PFGE : Electrophorèse en champ pulsé (Pulsed field gel electrophoresis) ;

S : Streptomycine ;

SCL : Service commun des laboratoires ;

SDSSA : Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments ;

SE : *Salmonella* Enteritidis ;

SSS : Sulfamides ;

STm : *Salmonella* Typhimurium ;

SXT : Sulfamides et Triméthoprime (Cotrimoxazole) ;

TE : Tétracycline.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Formules antigéniques pouvant être rencontrées chez les souches appelées « variants du sérovar Typhimurium » (source : [Afssa, 2009]) _____ 16

Tableau 2 : Liste des sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine de variants présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:- _____ 17

Tableau 3 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus* selon leurs stades dans les filières Ponte et Chair. _____ 22

Tableau 4 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de poules pondeuses contaminés par <i>Salmonella</i> (n = 519).	23
Tableau 5 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de poules d'œufs de consommation, selon leurs stades [# : non recherché].	23
Tableau 6 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de poulets de chair contaminés par <i>Salmonella</i> (n=186).	24
Tableau 7 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de poulets de chair	25
Tableau 8 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de dindes de chair contaminés par <i>Salmonella</i> (n = 302).	26
Tableau 9 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2010– 2011, des troupeaux de dindes	26
Tableau 10 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie », au cours de la période 2010–2011, des troupeaux reproducteurs de dindes, selon leurs stades	28
Tableau 11 : Répartition des sérovars de <i>Salmonella</i> mis en évidence sur les carcasses de poulet de chair prélevées à l'abattoir (n=425).	29
Tableau 12 : Estimation de la prévalence de <i>Salmonella</i> spp. dans les échantillons de poulets prélevés au niveau de la distribution entre avril et décembre 2009 (n=691).	30
Tableau 13 : Estimation de la prévalence de <i>Salmonella</i> spp. dans les échantillons de dinde prélevés au niveau de la distribution entre janvier et décembre 2010 (n=323).	30
Tableau 14 : Répartition des sérovars dans les différentes catégories de viande de dinde.	31
Tableau 15 : Répartition des élevages porcins contaminés ou non par <i>Salmonella</i> , en fonction du type d'exploitation.	32
Tableau 16 : Répartition des échantillons contaminés ou non par <i>Salmonella</i> , en fonction du type d'exploitation.	32
Tableau 17 : Répartition des sérovars, selon les géloses et le nombre d'élevages concernés.	34
Tableau 18 : Prévalence en salmonelle chez les charcutiers à l'élevage.	35
Tableau 19 : Tableau de concordance de la détection des <i>Salmonella</i> selon le type de prélèvements analysés (ganglions ou carcasses de porcs charcutiers à l'abattoir), enquête communautaire 2006-2007 [négatif : non détection de <i>Salmonella</i> , positif : détection de <i>Salmonella</i>].	35
Tableau 20 : Répartition des sérovars issus des ganglions et des surfaces de carcasse.	36
Tableau 21 : Participation des laboratoires adhérents au réseau <i>Salmonella</i> à l'essai interlaboratoires annuel d'aptitude au sérotypage des <i>Salmonella</i> depuis 2004 [pas d'EILA en 2005 pour cause de déménagement du laboratoire organisateur].	40
Tableau 22 : Nombre de résultats de sérotypage collectés, chaque année, dans le cadre du réseau <i>Salmonella</i> entre 2007 et 2011, selon le secteur d'isolement et l'origine du sérotypage.	42
Tableau 23 : Principaux sérovars isolés entre 2007 et 2011, dans le cadre du réseau <i>Salmonella</i> , toute origine confondue.	43
Tableau 24 : Proportion relative (%) annuelle des différentes filières animales, au sein de la base de données du réseau <i>Salmonella</i> (secteur santé et production animales), entre 2007 et 2011.	44
Tableau 25 : Proportion relative (%) annuelle des différentes catégories d'aliments au sein de la base de données du réseau <i>Salmonella</i> (secteur hygiène des aliments), entre 2007 et 2011.	44

- Tableau 26 : Représentativité, au sein des filières de productions de l'espèce *Gallus gallus*, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2), entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle). _____ 45
- Tableau 27 : Représentativité, au sein des filières de productions de l'espèce *Meleagris gallopavo*, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2), entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle). _____ 46
- Tableau 28 : Représentativité, au sein de la filière porcine, secteur santé et production animales, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2) entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle). _____ 47
- Tableau 29 : Nombre d'isolats collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon la formule antigénique de variant identifiée par sérotypage conventionnel (sources : inventaires des *Salmonella* d'origine non humaine disponibles en ligne. [* : les données présentées pour 2012 sont partielles et n'incluent pas les résultats de sérotypage des laboratoires partenaires mais concernent uniquement les résultats de sérotypage des souches adressées à l'unité CEB]. _____ 48
- Tableau 30 : Nombre d'isolats présentant la formule antigénique 1,4,[5],12:i:-, collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon les secteurs et principales espèces animales ou catégories d'aliments [SPA : secteur Santé et production animales ; H : secteur Hygiène des aliments ; E : Ecosystème naturel ; Aa : alimentation animale ; ND : origine de l'espèce non déterminée] _____ 49
- Tableau 31 : Nombre d'isolats présentant les formules antigéniques 1,4,[5],12:-:1,2 ou 1,4,[5],12:-:-, collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon les secteurs et principales espèces animales ou catégories d'aliments [SPA : secteur Santé et production animales ; H : secteur Hygiène des aliments ; E : Ecosystème naturel ; Aa : alimentation animale] _____ 50
- Tableau 32 : Liste des kits rapides d'analyse validés par Afnor Certification (NF Validation) pour la détection des *Salmonella* [tableau établi à partir de l'information disponible sur le site <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-methodes-validees/salmonella.html> consulté le 10 déc. 2012, mise à jour du 4 décembre 2012] [MC : Milieu de culture ; TI : Tests immunologiques ; TIE : Tests immunoenzymatiques ; THM : Tests d'hybridation moléculaire ; Ah+Aa : tous produits d'alimentation humaine et animale ; All : tous produits d'alimentation humaine et animale et prélèvements d'environnement de production]. _____ 53
- Tableau 33 : Souches de *Salmonella* utilisées par le SCL de Rennes pour comparer les performances de quatre méthodes de détection, certifiées NF Validation. _____ 57
- Tableau 34 : Séquences des amorces PCR utilisées pour la méthode interne du LNR (n°CEB21). _____ 60
- Tableau 35 : Témoins PCR utilisés pour la méthode interne du LNR (n°CEB21). _____ 60
- Tableau 36 : Interprétations des résultats obtenus par la méthode interne du LNR (n°CEB21) [+ : détection de l'amplicon spécifique du marqueur présentant la taille attendue ; - : absence de détection de l'amplicon spécifique du marqueur ; pb : paires de bases d'ADN] _____ 61
- Tableau 37 : Résultats obtenus par la méthode interne n°CEB21 et par la méthode Check&Trace *Salmonella*, en fonction de l'année, sur le panel de souches collectées par le réseau *Salmonella* au 18 décembre 2012 ou dans le cadre des enquêtes communautaires. [codes de la méthode Check&Trace *Salmonella* 2570 : non défini, 2717 : S.I 1,4,[5],12:i:-, 10909 : Typhimurium, 14622 : Coeln, 14909 : Schwarzengrund (S.I 1,4,12,27:d:1,7) ou Grumpensis (S.I 1,13,23:d:1,7)] _____ 67

Liste des figures

- Figure 1 : Répartition des élevages ER et EP en fonction du nombre d'échantillons positifs dans l'élevage [ER : élevages de reproduction, EP : élevages de production]. _____ 32
- Figure 2 : Illustration de l'apparence caractéristique de quatre milieux gélosés, utilisés pour la détection de *Salmonella*. _____ 57

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande d'expertise scientifique et technique dans le cadre de la saisine

1.1 Contexte

L'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments (Anses) a été saisie le 20 août 2012 par la DGAL d'une demande d'avis relatif à l'identification des variants de *Salmonella* Typhimurium et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole.

Les infections à *Salmonella* provoquent généralement des crampes, de la fièvre, des diarrhées et douleurs abdominales. Les aliments impliqués sont principalement les œufs et les produits à base d'œufs crus ou ayant subi un traitement thermique insuffisant, les produits laitiers (lait cru ou faiblement thermisé), ainsi que les produits carnés (bovins, porcs et volailles). [Anses, 2011].

Cette demande s'inscrit dans un contexte épidémiologique récent qui met en évidence, d'une part, une augmentation de l'occurrence du sérovar S.I 1,4,[5],12:i:- parmi les salmonelles isolées chez l'Homme et parmi les isolats d'origine vétérinaire et alimentaire, d'autre part, la survenue de plusieurs toxi-infections alimentaires collectives en France liées à des souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium », présentant notamment les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:- et S.I 1,4,[5],12:-:-.

D'après le rapport « zoonose »¹, publié par l'EFSA et l'ECDC en mars 2012 et relatif aux données de prévalence rapportées par les différents Etats Membres pour l'année 2010 [EFSA, 2012], *Salmonella* demeure après *Campylobacter* la principale cause d'infection humaine d'origine alimentaire (au regard du nombre de cas confirmés). Cependant, ces cas humains de salmonellose ont diminué de 8,8 % entre 2009 (n=108 618) et 2010 (n=99 020), ce qui engendre une diminution continue de cette prévalence sur les six dernières années. La prévalence des *Salmonella* dans la filière avicole est également en diminution à l'échelle européenne.

L'hypothèse la plus probable, avancée par l'EFSA et l'ECDC, pour expliquer cette diminution du nombre de cas de salmonelloses humaines réside dans le succès des programmes européens de lutte contre *Salmonella* pour réduire la prévalence de la bactérie dans les populations de volailles, en particulier chez les poules pondeuses².

Conformément au règlement (CE) 2160/2003, ces programmes de contrôle visent à atteindre un objectif de réduction de prévalence des *Salmonella*, fixé par les Règlements (CE) n°200/2010,

¹ Zoonoses : infections et maladies, transmissibles directement ou indirectement entre les animaux et l'Homme, par exemple en consommant des aliments contaminés ou par contact avec des animaux infectés. La gravité de ces maladies chez les humains varie de symptômes bénins à des affections potentiellement mortelles. Afin de prévenir l'apparition de zoonoses, il est important d'identifier les animaux et les denrées alimentaires qui sont les principales sources d'infection. Dans ce but, les informations qui vise à protéger la santé humaine sont recueillies et analysées auprès de tous les États membres de l'UE. (traduction de la source : EFSA, consulté le 30/11/2012, <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120308.htm>).

² RÈGLEMENT (CE) No 2160/2003 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.

(CE) n°517/2011 et (CE) n°200/2012. Ces Règlements ciblent les sérovars *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* et *S. Hadar* dans les cheptels reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus* et *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les troupeaux de poules pondeuses, poulets de chair et dindes.

Pour transcrire cet objectif européen dans la réglementation française, l'autorité compétente a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) à plusieurs reprises entre 2006 et 2009. Suite notamment aux avis rendus par l'Agence, les arrêtés ministériels suivants ont été pris en application de ces règlements européens :

- Les deux arrêtés du 26 février 2008 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (en filière Ponte et en filière Chair) ;
- L'arrêté du 4 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de dindes de reproduction ;
- L'arrêté du 22 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement.

Une note de service du 27 janvier 2010 (DGAL/SDSSA/N2010-8029) modifiée par celle du 4 mars 2010 (DGAL/SDSSA/N2010-8059), a été publiée par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour mettre en œuvre ces arrêtés ministériels et préciser les mesures relatives aux laboratoires d'analyse et à l'envoi des souches de *Salmonella* au Laboratoire national de référence (LNR).

La réglementation française exige pour l'ensemble des salmonelles dites variants de Typhimurium, assimilées aux isolats présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou encore S.I 1,4,[5],12:-:-, la mise en place en élevage avicole de mesures de gestion identiques à celles prises pour *S. Typhimurium* (S.I 1,4,[5],12:i:1,2).

De plus, à la demande de la Commission européenne, l'EFSA a rendu un avis scientifique [EFSA 2010] concernant (i) l'évaluation du risque que représentent les souches «*Salmonella Typhimurium-like*» pour la santé publique en comparaison avec *S. Typhimurium*, (ii) l'évaluation des performances des méthodes d'analyse actuellement utilisées pour les détecter et (iii) l'opportunité de proposer une harmonisation de la terminologie pour l'identification de ces souches.

L'EFSA a ainsi recommandé aux Etats Membres de procéder, pour ces souches, à l'identification des deux phases flagellaires par inversion de phase (une seule inversion de phase est demandée). De plus, au regard des caractéristiques similaires de virulence et de sensibilité aux antibiotiques, entre les isolats de sérovar *S. Typhimurium* et ceux présentant la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-, l'EFSA a recommandé également de considérer comme comparable le risque pour la santé publique que représentent ces deux types de salmonelles. Cette recommandation de l'Agence européenne concerne uniquement les salmonelles présentant la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-.

Selon son expérience, le Laboratoire national de référence associé au LNR (LNR Associé) en charge du sérotypage des salmonelles d'origine non humaine réalise trois essais d'inversion de phase avant de rendre un résultat de formule antigénique monophasique. Le Centre national de référence (CNR) réalise un à trois essais d'inversion de phase selon la souche d'origine humaine à sérotyper et pour toutes les souches présentant la formule antigénique du clone émergent S.I 1,4,[5],12:i:-, un seul essai d'inversion de phase est réalisé et une méthode moléculaire complémentaire est systématiquement mise en œuvre (S. Le Hello, communication personnelle).

1.2 Objet de la saisine

1.2.1 Les enjeux de la saisine

Au regard des données d'épidémiologie humaine, des recommandations de l'EFSA et de la réglementation appliquée actuellement en France, la Direction générale de l'Alimentation sollicite l'Anses pour évaluer le risque que représentent l'ensemble des souches appelées variants de Typhimurium, de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-, ne se résumant pas uniquement aux souches de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-.

La DGAL étudie la pertinence d'une adaptation de la réglementation nationale en vigueur concernant la lutte contre les salmonelles dans les filières avicoles réglementées. Pour cela, elle souhaite disposer d'éléments scientifiques lui permettant d'argumenter ces choix, dans une approche globale d'analyse de risque justifiant les mesures de gestion mises en place.

Dans ce but, l'Anses qui a la charge du mandat de Laboratoire national de référence pour les *Salmonella*, doit établir une actualisation du bilan de la surveillance des *Salmonella* en France, en mettant plus particulièrement l'accent sur les données disponibles concernant ces variants dans les filières avicole et porcine. Un état des lieux des méthodes de détection et de caractérisation de ces souches et de leurs performances doit être dressé.

Au regard des éléments qui seront dégagés, des recommandations sont attendues par la DGAL pour statuer sur la nécessité d'une adaptation des mesures de gestion pour spécifier les mesures de lutte en élevage et contribuer à l'amélioration permanente de la maîtrise du danger *Salmonella* dans la chaîne alimentaire, par une prise en compte de l'avancée des récentes connaissances acquises dans ce domaine.

1.2.2 Rappel des questions posées

- Question 1

Afin d'apprécier la part des variants (« vrais » et « faux ») dans le secteur avicole et leur évolution temporelle, il est demandé un bilan des résultats de typage réalisé sur les souches collectées par l'Anses dans ce secteur.

Compte-tenu des discussions en cours au niveau européen sur la surveillance des salmonelles en filière porcine, il s'avèrerait également intéressant d'avoir un bilan qualitatif de ce type de souches dans le secteur porcin.

- Question 2

Dans une perspective visant à proportionner les mesures de gestion en élevage avicole au risque lié aux variants (« vrais » et « faux »), il conviendrait d'évaluer leur impact sur la santé humaine, par exemple en appréciant leur mise en cause dans l'apparition de TIAC ou de salmonelloses humaines, comparativement aux sérovars définissant les MRC.

- Question 3

En l'absence de norme relative à la détection des « faux » variants de *S. Typhimurium*, il est demandé à l'Anses, dans le cadre de ses activités de référence pour *Salmonella*, de préciser les protocoles analytiques qui pourraient être considérés comme méthodes officielles dans ce domaine, ainsi que les détails de leur mise en œuvre pour une utilisation en routine dans les laboratoires agréés et reconnus.

La saisine adressée à l'Anses par la DGAL est présentée en annexe 1 de ce rapport.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'instruction partielle de cette saisine, dans le cadre d'une expertise scientifique et technique à deux de ces laboratoires :

- Laboratoire de sécurité des aliments – Sites de Maisons-Alfort et de Boulogne-Sur-Mer, Unité Epidémiologie et caractérisation bactérienne (CEB) ;
- Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP) ;

Désignés, par l'arrêté du 29 décembre 2009 modifié par l'arrêté du 19 octobre 2011, laboratoires nationaux de référence dans le domaine de la santé publique vétérinaire :

- Le LNR-*Salmonella sp.* est nommé dans le domaine de compétence « Contaminants biologiques présents dans les denrées alimentaires »,
- le LNR-Salmonelloses aviaires est nommé dans le domaine de compétence « Maladies animales »

Les éléments préparés par les deux laboratoires de l'Anses et présentés dans ce rapport répondent aux questions 1 et 3 de la saisine et apportent des informations à la Direction d'évaluation des risques de l'Agence pour traiter la question 2.

2 Définitions et terminologies employées

La terminologie « *faux variant* » et « *vrai variant* » citée dans la saisine, peut être ambiguë. Avant de dresser le bilan des données disponibles, il est nécessaire de préciser la terminologie employée dans les récents avis rendus sur le sujet afin de reformuler les questions posées et préciser les attendus.

2.1 Terminologies employées

La dénomination « *Typhimurium-like* » utilisée dans l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 16 octobre 2009 [Afssa, 2009] « *ne correspond pas à une appellation officiellement reconnue, mais elle présente un intérêt pratique. Elle permet de regrouper l'ensemble des souches proches de *S. Typhimurium*, mais qui ont perdu une des deux phases flagellaires (souches monophasiques), et les souches ayant perdu les deux phases flagellaires (souches devenant alors immobiles). Ces souches sont proches en termes de sérotypage, partageant avec *Typhimurium* les antigènes somatiques O (de paroi) et une partie des antigènes flagellaires H.* ».

L'EFSA dans son dernier avis relatif à la même problématique scientifique utilise également la terminologie « *Salmonella Typhimurium-like* » [EFSA, 2010]. Ces bactéries correspondent à des salmonelles ayant un fond génétique identique à celui de *S. Typhimurium*. Plus précisément, l'avis nomme « *monophasic S. Typhimurium* » les souches de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-.

L'EFSA recommande dans son avis, pour éviter toute ambiguïté, de déterminer la formule antigénique complète de ces isolats : « *To ensure complete consistency of reporting, all isolates of putative *Salmonella* should ideally be fully serotyped and the full antigenic formula reported, as recommended by the White-Kauffmann-Le Minor scheme [...]* ».

La méthode conventionnelle pour le sérotypage des salmonelles repose sur la détermination d'une formule antigénique par agglutination rapide sur lame, à l'aide de sérums spécifiques dirigés principalement vers les antigènes de parois (« O ») ou de flagelles (« H »); le sérum dirigé contre « Vi » étant utile pour le sérovar Dublin (S.I 1,9,12[Vi] :g,p:-). Les caractères antigéniques des salmonelles sont à rechercher suite à l'identification préalable de la famille, du genre, de l'espèce et de la sous-espèce sur la base de caractères biochimiques. Il existe en effet de nombreuses communautés antigéniques « O » au sein des Entérobactéries, et en particulier entre *Salmonella* et *Citrobacter freundii* et *Hafnia alvei*. En revanche, les antigènes « H » sont spécifiques de *Salmonella*.

Plus de 2500 sérovares, identifiés par leur formule antigénique, sont classés selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor ; cette classification, établie dans un but de diagnostic, est mise à jour par le centre collaborateur de référence de l'organisation mondiale de la santé pour les *Salmonella* à l'Institut Pasteur de Paris. Seuls certains sérovares de la sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* portent un nom, assigné à la formule antigénique (Grimont et Weill, 2007). Cette formule distingue les facteurs « O » caractéristiques d'un groupe, des facteurs « O » accessoires, qui peuvent être absents ou présents. Sur la forme, les facteurs accessoires liés à une conversion bactériophagique sont soulignés, les autres apparaissent entre crochets. La présence de facteurs accessoires n'intervient pas dans le diagnostic du sérovar, mais présente un intérêt comme marqueur épidémiologique.

Le mode opératoire pour réaliser le sérotypage conventionnel des salmonelles, tel qu'il est réalisé sur des cultures pures de *Salmonella* par le Laboratoire de Sécurité des Aliments – Site de Maisons-Alfort de l'Anses, est expliqué dans la publication de Danan *et al.* [2009].

Pour mémoire, la formule antigénique complète de *Typhimurium* comporte :

- les antigènes somatiques O 1,4,[5],12 ; le facteur 1 est souligné car il peut être exprimé suite à l'acquisition d'un phage, le facteur 5 est entre crochets car son expression est variable ;
- les antigènes flagellaires H, sous deux phases : en phase 1, l'antigène i, et en phase 2, les antigènes 1,2.

D'un point de vue taxonomique, les souches dont la formule antigénique dérive de celle du sérovar *Typhimurium*, se présentent sous plusieurs formules antigéniques, puisque les déterminants antigéniques O:1 et O:5 peuvent être absents (tableau 1) :

Tableau 1 : Formules antigéniques pouvant être rencontrées chez les souches appelées « variants du sérovar *Typhimurium* » (source : [Afssa, 2009])

Formule antigénique identifiée			Conclusion	Commentaire
Antigènes somatiques O	Antigènes flagellaires H			
	en phase 1	en phase 2		
<u>1</u> ,4,[5],12	i	-	Variant monophasique du sérovar <i>Typhimurium</i>	Absence de l'expression de la deuxième phase flagellaire codée par le gène <i>fljB</i>
<u>1</u> ,4,[5],12	-	1,2		Absence de l'expression de la première phase flagellaire codée par le gène <i>fliC</i>
<u>1</u> ,4,[5],12	-	-	Variant immobile du sérovar <i>Typhimurium</i>	Absence de l'expression des deux phases flagellaires

Il est important de souligner, à ce stade, qu'une lecture rapide des avis précités et de leur terminologie employée ne doit pas laisser sous-entendre que toutes les souches de formules antigéniques telles que présentées dans le tableau 1 ont obligatoirement le même fond génétique que les souches appartenant au sérovar *S. Typhimurium*. En effet, l'identification de ces formules antigéniques de variants monophasiques ou immobiles peut être associée à l'absence d'expression de phases flagellaires de sérovars autre que *S. Typhimurium*.

Le tableau 2 présente la liste des sérovars potentiellement à l'origine de variants présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou encore S.I 1,4,[5],12:-:-. Ce tableau précise la formule antigénique correspondante de ces sérovars.

Tableau 2 : Liste des sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine de variants présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-

[1 : présence du Facteur O:1 liée à la conversion bactériophagique, le facteur est présent que si la culture est lysogénisée par le phage convertisseur correspondant ; [x] : absence possible de l'expression du Facteur O (antigène somatique) ou H (antigène flagellaire) et dont la présence n'est pas liée à la conversion bactériophagique].

Sérovars	Formule antigénique [Grimont et Weill, 2007]
<ul style="list-style-type: none"> concernant les variants monophasiques de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- 	
Typhimurium	S.I 1,4,[5],12:i:1,2
Lagos	S.I 1,4,[5],12:i:1,5
Agama	S.I 4,12:i:1,6
Farsta	S.I 4,12:i:e,n,x
Tsevie	S.I 1,4,12:i:e,n,z ₁₅
Tumodi	S.I 1,4,12:i:z ₆
<ul style="list-style-type: none"> concernant les variants monophasiques de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:-:1,2 	
Typhimurium	S.I 1,4,[5],12:i:1,2
Kisangani	S.I 1,4,[5],12:a:1,2
Paratyphi B	S.I 1,4,[5],12:b:1,2
Stanley	S.I 1,4,[5],12,[27]:d:1,2
Saintpaul	S.I 1,4,[5],12:e,h:1,2
Derby	S.I 1,4,[5],12:f,g:[1,2]
Agona	S.I 1,4,[5],12:f,g,s:[1,2] [z ₂₇], [z ₄₅]
Hato	S.I 1,4,[5],12:g,m,s:[1,2]
Kingston	S.I 1,4,[5],12,[27]:g,s,t:[1,2]
Fyris	S.I 4,[5],12:l,v:1,2
Kunduchi	S.I 1,4,[5],12,[27]:l,[z ₁₃],[z ₂₈]:1,2
Heidelberg	S.I 1,4,[5],12:r:1,2
Coeln	S.I 1,4,[5],12:y:1,2
Shubra	S.I 4,[5],12:z:1,2
Stanleyville	S.I 1,4,[5],12,[27]:z ₄ ,z ₂₃ :[1,2]
Haifa	S.I 1,4,[5],12:z ₁₀ :1,2

Sérovars	Formule antigénique [Grimont et Weill, 2007]
<ul style="list-style-type: none"> concernant les variants immobiles de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:-:- 	
<p>Au total, 103 formules antigéniques (O:27 négatif) peuvent correspondre à ces variants après perte d'expression des deux phases flagellaires. Parmi ces formules, sont inclus les sérovars déjà présentés ci-dessus et qui peuvent potentiellement devenir des variants immobiles.</p> <p>Quarante cinq sérovars supplémentaires doivent être comptabilisés (n=148) si l'expression du facteur O:27 n'est pas déterminée du fait de l'absence de recherche systématique de ce facteur à l'obtention d'un isolat présentant la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:-:-.</p> <p>En plus des sérovars déjà mentionnés dans ce tableau comme potentiellement à l'origine des variants monophasiques, sont cités ci-dessous les sérovars les plus fréquemment isolés, d'origine humaine ou non humaine parmi les 148 formules antigéniques possibles.</p>	
Abony	S.I 1,4,[5],12,[27]:b:e,n,x
Abortusovis	S.I 4,12:c:1,6
Bredeney	S.I 1,4,12,27:l,v:1,7 [Z ₄₀]
Brandenburg	S.I 4,[5],12:l,v:e,n,Z ₁₅
Indiana	S.I 1,4,12:z:1,7
Schwarzengrund	S.I 1,4,12:y:1,2

Nb : La production du facteur O:27 est due au gène $wzy_{\alpha(1-6)}$ localisé dans le groupe de gènes déterminant le facteur antigénique O principal sur le chromosome bactérien. L'expression « [27] » dans la formule antigénique est indiquée pour tenir compte de sa présence variable.

2.2 Reformulation des questions de la saisine

Au regard des enjeux présentés ci-dessus, le gestionnaire du risque souhaiterait pouvoir distinguer :

- les souches appartenant au sérovar Typhimurium ou correspondant à des variants (monophasiques ou immobiles) de ce sérovar, appelés dans la saisine « vrai variants » ;
- les souches dérivant d'un autre sérovar que Typhimurium et ayant évolué dans l'expression de leurs phases flagellaires pour finalement présenter les mêmes formules antigéniques, appelés dans la saisine « faux variants ».

Le rapport présente ci-après les éléments disponibles à ce jour, issus de la surveillance nationale des *Salmonella* d'origine non humaine pour évaluer l'importance des sérovars d'intérêt en santé publique³ et des principaux sérovars potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2), plus particulièrement dans les secteurs avicole et porcin (Question 1).

Il dresse également le bilan des méthodes disponibles pour détecter et caractériser les salmonelles, isolées en hygiène des aliments ou en santé et production animales, pour permettre notamment de distinguer les « vrai variants » et « faux variants » (Question 3).

³ Selon l'annexe III du Règlement (CE) N2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques, présents dans la chaîne alimentaire.

Au regard des premiers résultats obtenus suite aux travaux mis en œuvre par l'Anses, dans le respect des recommandations de l'EFSA, des éléments de réponse concernant l'existence d'une méthode officielle pour caractériser les différents types de souches correspondant aux formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou encore S.I 1,4,[5],12:-:- sont présentés pour compléter la réponse à la question 3 de la saisine.

3 Surveillance nationale des *Salmonella* – importance des variants d'origine agro-alimentaire :

Le dispositif français de surveillance des salmonelles est en place depuis de nombreuses années. Il a évolué sous l'effet combiné de la réglementation européenne et des niveaux de prévalences observées dans les différentes sources. Les réglementations européennes et nationales constituent un socle majeur pour faciliter l'harmonisation et la collecte des données de surveillance en élevage et tout au long de la chaîne alimentaire. Ce rapport présente ci-après les données issues de cette surveillance réglementaire au sein de la filière avicole et de la filière porcine.

L'existence concomitante de réseaux de surveillance complémentaires dans les domaines vétérinaires et agro-alimentaires, tel que le réseau *Salmonella*, permet d'obtenir des informations précieuses sur des secteurs ou points de collecte de données non couverts par la réglementation. Ils sont notamment très utiles pour le suivi des tendances, la détection d'émergence d'événements inhabituels ou de nouveaux pathogènes et pour l'expertise apportée dans le cadre des investigations épidémiologiques en situation d'alerte sanitaire.

La diversité des acteurs de cette surveillance, l'organisation mise en place pour garantir la qualité et la représentativité des données ainsi que les atouts et spécificités de chaque élément de ce dispositif national font de ce dernier un système efficace pour répondre aux attentes des gestionnaires et des évaluateurs de risques [David et *al.*, 2011].

3.1 Bilan de la surveillance dans la filière volaille

Le Laboratoire National de Référence pour *Salmonella* intervient depuis 2004 pour réaliser les analyses de recherche et de dénombrement de *Salmonella* dans le cadre des enquêtes européennes visant à déterminer la prévalence de *Salmonella* spp. dans les élevages et les abattoirs de la production avicole et à la distribution.

Voici, par ordre chronologique, par filière et étage de production, les enquêtes effectuées pour la détermination de la prévalence de *Salmonella* spp. :

- 2004-2005 : élevages de poules pondeuses ;
- 2005-2006 : élevages de poulets de chair ;
- 2006-2007 : élevages de dindes de chair et des reproducteurs ;
- 2007-2008 : abattoirs de poulets de chair (détermination de la prévalence de *Salmonella* spp. sur les carcasses) ;
- 2009 : plan de surveillance sur les produits de poulets de chair au niveau de la distribution ;
- 2010 : plan de surveillance sur les produits de poulets de chair et de dindes au niveau de la distribution.

Les bilans nationaux annuels du plan de lutte contre les salmonelles dans les troupeaux des espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo* sont disponibles, depuis 2008, sous forme de Note de Service et/ou d'article publié dans le Bulletin épidémiologique :

- Pour le bilan de 2008 :

Bulletin épidémiologique N°33 / septembre 2009, pages 11-12, M. Picherot *et al.* ;

Note de Service DGAL/SDSSA/N2009-0959 du 11 décembre 2009.

- Pour le bilan de 2009 :

Note de Service DGAL/SDSSA/N2010-8255 du 8 septembre 2010 ;

- Pour le bilan de 2010 :

Bulletin épidémiologique N°46 Spécial MRC – Bilan 2010 / décembre 2011, p. 49-53, M. Picherot *et al.* ; http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BE_46.pdf

- Pour le bilan de 2011 :

Note de Service DGAL/SDSSA/N2012-8232 du 26 novembre 2012 (disponible en ligne,

http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN20128232Z_cle816143.pdf)

Bulletin épidémiologique N°54 Spécial MRE – Bilan 2011 / novembre 2012, p. 54-59, E. Hamelin *et al.* ; http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BEP-mg-BE54_cle45f8ec.pdf

Les plans de lutte contre les infections à salmonelles – mesures de police sanitaire – ne concernent que les sérovars dits « de santé publique ». Le Règlement (CE) No 2160/2003, dans son annexe III, liste les critères spécifiques pour déterminer les sérovars de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique. Des objectifs européens sont fixés pour ces sérovars, par des règlements européens spécifiques à chaque filière et stade de production.

Dans la réglementation française, ces sérovars sont considérés comme des « dangers sanitaires de première catégorie » (anciennement MRC, maladie réputée contagieuse), d'après le décret n°2012-845 du 30 juin 2012, Les sérovars « danger sanitaire de 1^{ère} catégorie » sont Enteritidis, Typhimurium (y compris les variants), Hadar, Infantis et Virchow pour les troupeaux de *Gallus* reproducteurs et uniquement les deux sérovars Enteritidis et Typhimurium (y compris les variants) pour les troupeaux de poulettes et poules pondeuses d'œufs de consommation, les poulets de chair, les dindes reproductrices et d'engraissement (tableau 1 de la note de service DGAL/SDSSA/N2012-8232).

Ces sérovars sont nommés « dangers sanitaires de première catégorie » dans la suite de ce rapport.

Pour ces productions, les autres sérovars de *S. enterica* sous espèce *enterica* sont des « dangers de deuxième catégorie » (anciennement MDO, maladie à déclaration obligatoire) et font l'objet d'une surveillance épidémiologique.

3.1.1 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de Reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus*

Pour les cinq années de 2007 à 2011, le bilan national d'exécution du programme de lutte contre les sérovars de *Salmonella* réputés être des dangers sanitaires de première catégorie, publié par la DGAL fait état de trois cas d'infection en filière Ponte, et de 42 cas en filière Chair (voir les tableaux ci après).

Tableau 3 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus* selon leurs stades dans les filières Ponte et Chair.

<i>Gallus</i> filière Ponte, reproducteur en période d'élevage	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	111	70	80	115	87
Nbre de cas d'infection	0	0	1 Enteritidis	0	0

<i>Gallus</i> filière Ponte reproducteur en période de ponte	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	147	105	108	182	132
Nbre de cas d'infection	1 Enteritidis	0	0	1 Enteritidis	0

<i>Gallus</i> filière Chair reproducteur en période d'élevage	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	1045	1049	1070	1186	1336
Nbre de cas d'infection	3 Enteritidis 2 Typhimurium 1 Hadar 1 Virchow	5 Enteritidis	2 Enteritidis	0	1 Infantis

<i>Gallus</i> filière Chair, reproducteur en période de ponte	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	1030	998	1041	1487	1529
Nbre de cas d'infection	3 Enteritidis 2 Hadar 1 Infantis	1 Enteritidis 4 Typhimurium	3 Enteritidis	4 Enteritidis 3 Typhimurium 1 Virchow	5 Typhimurium

3.1.2 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de poules pondeuses

3.1.2.1 Enquête européenne de 2004-2005

519 élevages ont été enquêtés par les services vétérinaires. La détermination du statut salmonellique des lots a reposé sur la recherche bactériologique de *Salmonella* dans sept échantillons par troupeau :

- 5 échantillons de matières fécales de 250 g (élevages en cages) ou 5 stéribottes (élevages au sol) ;

- 2 échantillons de poussières d'un volume de 250 ml, prélevés en dessous des cages ou dans la salle d'élevage pour les troupeaux au sol et sur les convoyeurs d'oeufs.

Les analyses bactériologiques ont été réalisées selon un protocole adapté de la norme NF EN ISO 6579:2002, avec un seul milieu d'enrichissement sélectif (MSRV semi-solide). Le sérotypage des souches isolées a été effectué selon le schéma White – Kauffmann – Le Minor.

Sur les 519 élevages retenus, 93 étaient contaminés par *Salmonella* (17,9 %) c'est-à-dire qu'au moins un échantillon en provenance de ces élevages a été détecté contaminé par une salmonelle de l'espèce *Salmonella enterica* (tableau 4).

Tableau 4 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de poules pondeuses contaminés par *Salmonella* (n = 519).

Sérovar	Nombre d'élevages contaminés par <i>Salmonella</i>	%
<i>Salmonella</i> spp.	93	17,9
S. Typhimurium	22	4,2
S. Enteritidis	20	3,8
S. Infantis	8	1,5
S. Virchow	3	0,6
S. Hadar	1	0,2
S.I 1,4,[5],12:i:-	1	0,2

3.1.2.1 Bilan national d'exécution du plan de lutte

Tableau 5 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de poules d'œufs de consommation, selon leurs stades [# : non recherché].

<i>Gallus</i> filière Ponte, Poulettes futures pondeuses	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	2115	2093	2050	2330	2060
Nbre de cas d'infection					
Enteritidis	7	6	2	1	0
Typhimurium	7	3	9	2	1
1,4,[5],12 : i : -	#	#	#	1	2
1,4,[5],12 : - : 1,2	#	#	#	0	0
1,4,[5],12 : - : -	#	#	#	0	0

<i>Gallus</i> filière Ponte, Poules pondeuses d'œufs de consommation	2007	2008	2009	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	2980	3067	2855	4013	4000

Nbre de cas d'infection					
Enteritidis	81	62	51	48	38
Typhimurium	33	36	22	20	19
1,4,[5],12:i:-	#	#	#	6	1
1,4,[5],12:-:1,2	#	#	#	1	0
1,4,[5],12:-:-	#	#	#	0	0

3.1.3 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair

3.1.3.1 Enquête européenne de 2005-2006

370 élevages ont été enquêtés par les services vétérinaires de 46 départements français. Cinq pédichiffonnettes étaient réalisées pour chaque troupeau enquêté, indépendamment du mode d'élevage des poulets. Le protocole de recherche et d'isolement de *Salmonella enterica* utilisé est dérivé de la norme NF EN ISO 6579:2002. Cela inclut un préenrichissement en eau peptonée tamponnée suivi d'un enrichissement unique sur milieu semi-solide (MSRV) incubé à 41,5°C +/- 1°C pendant 24h +/- 3h reconduit une fois. Le sérotypage a ensuite été conduit selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor.

Sur les 370 troupeaux retenus, 32 troupeaux ont été dépistés contaminés par *Salmonella* c'est-à-dire qu'au moins un des cinq prélèvements réalisés au cours de la visite en élevage a été détecté contaminé pour une salmonelle de l'espèce *Salmonelle enterica*. Le pourcentage de troupeaux contaminés par *Salmonella* était de 8,65% avec un écart type de $\pm 1,46\%$, ce qui conduit à un intervalle de confiance (IC_{95%}) dans la population compris entre 5,78% et 11,51%.

Au total, 1850 échantillons ont été analysés au LNR de Ploufragan. Sur l'ensemble de ces échantillons, 95 ont été dépistés positifs (contaminés par *Salmonella*) et ont donné lieu à 186 isollements de salmonelles sérotypables. Vingt trois sérovars différents ont pu être identifiés (tableau 6). Le sérovar Hadar a été le plus fréquemment isolé (12,90%), suivi des sérovars Anatum et Mbandaka (8,6%).

Tableau 6 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de poulets de chair contaminés par *Salmonella* (n=186).

Sérovar	Nombre d'élevages contaminés par <i>Salmonella</i>	%
S. Hadar	3	0,8
S. Anatum	3	0,8
S. Virchow	3	0,8
S. Montevideo	3	0,8
S. Mbandaka	2	0,5
S. Indiana	2	0,5
S. Enteritidis	2	0,5
S. Livingstone	1	0,3
S. Napoli	1	0,3

S. Ohio	1	0,3
S. Paratyphi B	1	0,3
S. Schwarzengrund	1	0,3
S. Braenderup	1	0,3
S. Kedougou	1	0,3
S. Newport	1	0,3
S. Heidelberg	1	0,3
S. Infantis	1	0,3
S. Typhimurium	1	0,3
S. Lexington	1	0,3
S. Senftenberg	1	0,3
S. Veneziana	1	0,3
S. IIIa 48:Z ₄ ,Z ₂₃ :-	1	0,3
S. IIIb 21:k:z	1	0,3

Aucun variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé au cours de cette enquête.

3.1.3.1 Bilan national d'exécution du plan de lutte

Tableau 7 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2007 – 2011, des troupeaux de poulets de chair

Gallus filière Chair, Poulets de chair	Prévalence enquête 2006-2007	2009		2010		2011	
		Cas	Taux	Cas	Taux	Cas	Taux
Nbre de troupeaux contrôlés		35911		49024		57182	
Nbre de cas d'infection							
Enteritidis	0,20%	81 *	0,23%	61	0,12%	82	0,14%
Typhimurium	0,10%	109 *	0,30%	149	0,30%	179	0,31%
1,4,[5],12:i:-				21	0,04%	19	0,03%
1,4,[5],12:-:1,2				10	0,02%	2 **	<0,01%
1,4,[5],12:-:-				2	<0,01%	5 **	0,01%

* 2 troupeaux simultanément positifs à SE et STm

**1 troupeau simultanément positif à STm, STm variant S.I 1,4,[5],12:-:- et variant S.I 1,4,[5],12:-:1,2.

3.1.4 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de dindes

3.1.4.1 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de dindes de chair

3.1.4.1.1 *Enquête européenne 2006-2007*

302 élevages de dindes de chair ont été enquêtés par les agents des services vétérinaires départementaux. Des pédichiffonnettes ont été réalisées dans les bâtiments de dindes, au cours des trois dernières semaines précédant le dernier enlèvement vers l'abattoir. Le protocole de recherche et d'isolement de *Salmonella enterica* utilisé est celui de la norme ISO 6579-A1 Annexe D (2007). Cela inclut un préenrichissement en eau peptonée tamponnée suivi d'un enrichissement unique sur milieu semi-solide (MSRV) incubé à 41,5°C +/- 1°C pendant 24h +/- 3h reconduit une fois. Le sérotypage a ensuite été conduit selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor.

Sur les 302 élevages retenus, 47 élevages ont été détectés positifs à *Salmonella* soit 15,56% (IC à 95% : [11,47% ; 19,65%]), c'est à dire qu'au moins un des 5 échantillons prélevés au cours de la visite en élevage a été détecté positif pour une salmonelle de l'espèce *Salmonella enterica* (tableau 8).

Tableau 8 : Répartition des sérovars en fonction du nombre d'élevages de dindes de chair contaminés par *Salmonella* (n = 302).

Sérovar	Nombre d'élevages contaminés par <i>Salmonella</i>	%
S. Derby	13	4,3
S. Typhimurium	6	1,9
S. Enteritidis	5	1,7
S. Mbandaka	5	1,7
S. Hadar	3	0,9
S. Indiana	3	0,9
S. Newport	2	0,2
S. Saintpaul	2	0,6
S. Bredeney	2	0,6
S. Agona	2	0,6
S. Coeln	1	0,3
S. Ajiobo	1	0,3
S. Muenster	1	0,3
S. Napoli	1	0,3
S. Remo	1	0,3
S. Illa	1	0,3

Aucun variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé au cours de cette enquête.

3.1.4.1.2 *Bilan national d'exécution du plan de lutte*

Tableau 9 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie » au cours de la période 2010– 2011, des troupeaux de dindes

<i>Meleagris gallopavo</i> période d'engraissement	2010		2011	
	Cas	Taux	Cas	Taux
Nbre de troupeaux contrôlés	9394		8046	
Nbre de cas d'infection				
Enteritidis	14	0,15%	14	0,17%
Typhimurium	42	0,45%	47	0,58%
<u>1,4</u> ,[5],12 : i : -	3	0,03%	8	0,10%
<u>1,4</u> ,[5],12 : - : 1,2	2	0,02%	0	
<u>1,4</u> ,[5],12 : - : -	0		2	0,02%

Les données des tableaux 5,7 et 9 donnent des prévalences inférieures aux objectifs fixés dans les règlements européens spécifiques à chacune de ces trois productions : réduction de prévalence de 10% par an par rapport à l'année précédente dans les troupeaux de poules pondeuses d'œufs de consommation et prévalences inférieures à 1% dans les troupeaux de poulets et de dindes de chair.

3.1.4.2 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de dindes reproductrices

3.1.4.2.1 *Enquête européenne 2006-2007*

205 élevages de dindes reproductrices ont été enquêtés par les agents des services vétérinaires départementaux. Des pédichiffonnettes ont été réalisées dans les bâtiments dans un délai de neuf semaines avant le dernier enlèvement. Le protocole de recherche et d'isolement de *Salmonella enterica* utilisé est celui de la norme ISO 6579-A1 Annexe D (2007).

Trois élevages ont été détectés positifs sur les 205 élevages retenus, c'est à dire qu'au moins un des 5 échantillons prélevés au cours de la visite en élevage a été détecté positif pour une salmonelle de l'espèce *Salmonella enterica*. Un sérovar a été détecté à chaque fois : *S. Kottbus*, *S. Bradford* ou *S. Enteritidis*. La population enquêtée étant assimilée à la population exhaustive des dindes reproductrices élevées en France, la prévalence de la contamination par *Salmonella enterica* peut donc être estimée à 1,46%.

3.1.4.2.2 Bilan national d'exécution du plan de lutte

Tableau 10 : Cas d'infection par les salmonelles désignées comme « dangers sanitaires de première catégorie », au cours de la période 2010–2011, des troupeaux reproducteurs de dindes, selon leurs stades

<i>Meleagris gallopavo</i> reproducteurs en période d'élevage	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	455	459
Nbre de cas d'infection		
Enteritidis	0	1
Typhimurium	1	2
<u>1</u> ,4,[5],12 : i : -	0	0
<u>1</u> ,4,[5],12 : - : 1,2	0	0
<u>1</u> ,4,[5],12 : - : -	0	0

<i>Meleagris gallopavo</i> reproducteurs en période de ponte	2010	2011
Nbre de troupeaux contrôlés	785	689
Nbre de cas d'infection		
Enteritidis	0	0
Typhimurium	0	2
<u>1</u> ,4,[5],12 : i : -	4	0
<u>1</u> ,4,[5],12 : - : 1,2	0	0
<u>1</u> ,4,[5],12 : - : -	0	0

3.1.5 Prévalence de *Salmonella* dans les abattoirs sur les carcasses de poulets de chair, en 2008

425 lots de carcasses de poulets de chair provenant de 58 abattoirs ont été échantillonnés. Une carcasse par lot a été prélevée après ressuyage puis envoyée au LNR pour la recherche de *Salmonella*. La méthode de détection a été réalisée suivant la norme NF EN ISO 6579:2002, présentée brièvement ci-dessous :

- pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée (16 à 20h à 37°C +/- 1°C) ;
- enrichissement d'une part en RVS (24h +/- 3h à 41,5°C +/- 1°C) ;
- enrichissement en MKTTn d'autre part (24h +/- 3h à 37°C +/- 1°C).

Les bouillons enrichis ont ensuite été isolés sur les milieux sélectifs de XLD et de Rambach. Puis, des colonies caractéristiques ont été repiquées (au moins 1 et jusqu'à 5 par boîte d'isolement). Enfin, les caractères biochimiques ont été déterminés avant réalisation de la sérotypie.

32 carcasses sur 425 étaient positives à *Salmonella* soit une prévalence de 7,5 % (IC_{95%} : [5,01 ; 10,05]). Treize sérovars différents ont été identifiés (tableau 11).

Tableau 11 : Répartition des sérovars de *Salmonella* mis en évidence sur les carcasses de poulet de chair prélevées à l'abattoir (n=425).

Sérovars	Lots contaminés par <i>Salmonella</i>	%
S. Indiana	12	33,3
S. Kottbus	5	13,9
S. Derby	4	11,1
S. Brandenburg	3	8,3
S. Agona	2	5,5
S. Montevideo	2	5,5
S. Anatum	2	5,5
S. Enteritidis	1	2,8
S. Hadar	1	2,8
S. Livingstone	1	2,8
S. Mbandaka	1	2,8
S. Thompson	1	2,8
S. Bareilly	1	2,8

Aucun variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé au cours de cette enquête.

3.1.6 Prévalence de *Salmonella* sur les produits de poulets de chair à la distribution

Les prélèvements ont concerné trois types d'échantillons : carcasses entières, produits de découpe avec peau (cuisses) et produits de découpe sans peau (escalopes). Tous les échantillons ont été collectés au niveau de la distribution.

361 échantillons ont été analysés entre avril et décembre 2009 et 330 échantillons en 2010, répartis de manière égale entre carcasses entières, cuisses et escalopes. Soit un total de 691 échantillons sur les deux années.

Les analyses ont été réalisées suivant la norme NF EN ISO 6579 qui préconise un pré-enrichissement en eau peptonée et une incubation à 37°C pendant 16 à 20h. L'enrichissement a été effectué sur deux milieux MKTTn et RVS pendant 24h +/- 3h à 37°C ± 1°C et 41,5°C ± 1°C respectivement. Un isolement a été ensuite réalisé sur deux milieux sélectifs XLD et Rambach pendant 24h +/- 3h à 37°C ± 1°C. Les colonies caractéristiques ont été identifiées par voie biochimique puis sérotypées selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor.

Sur un total de 691 échantillons, 17 ont permis d'isoler *Salmonella* spp. soit 2,5 % des échantillons analysés (tableau 12). Dix échantillons de carcasses étaient contaminés sur un total de 231 échantillons soit 4,3 % ; Quatre échantillons de cuisses étaient contaminés sur un total de 230 échantillons soit 1,7 % et trois échantillons d'escalopes étaient contaminés sur un total de 230 échantillons soit 1,3 % (tableau 12).

Tableau 12 : Estimation de la prévalence de *Salmonella* spp. dans les échantillons de poulets prélevés au niveau de la distribution entre avril et décembre 2009 (n=691).

Catégorie	Nombre d'échantillons	Echantillons contaminés	Prévalence (%)
Carcasses	231	10	4,3
Cuisses	230	4	1,7
Escalopes	230	3	1,3
Total	691	17	2,5

Les sérovars retrouvés sur les carcasses étaient : *S. Livingstone* (4/10), *S. Kotbus* (2/10), *S. Typhimurium* (1/10), *S. Mbandaka* (1/10), *S. Indiana* (1/10) et *S. Albany* (1/10). Un échantillon était contaminé par deux sérovars *S. Agona* et *S. Ferruch*.

Les sérovars retrouvés sur les échantillons de cuisses contaminées étaient : *S. Bredeney* (1/4), *S. Livingstone* (1/4) et *S. Indiana* (2/4). Sur les escalopes, les sérovars retrouvés étaient *S. Livingstone* (1/3), *S. Lille* (1/3) et *S. Bareilly* (1/3). Sur l'ensemble, *S. Livingstone* était présente dans 35 % des échantillons positifs (6/17).

Aucun variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé au cours de cette enquête.

3.1.7 Prévalence de *Salmonella* sur les produits de dindes de chair à la distribution

Les prélèvements ont concerné différents types d'échantillons : dindes entières, produits de découpe sans peau (escalopes, blanquettes), produits de découpe avec peau (cuisses) et rôtis. Au total, 323 échantillons ont été analysés en 2010. Les analyses ont été réalisées suivant la norme NF EN ISO 6579:2002.

24 échantillons étaient contaminés par *Salmonella* sur un total de 323 soit 7,43% des échantillons de dindes analysés. La catégorie ayant la prévalence la plus forte est la catégorie des produits de découpe avec peau, les cuisses (14,50%) suivi des carcasses (5,88%) (Tableau 13).

Tableau 13 : Estimation de la prévalence de *Salmonella* spp. dans les échantillons de dinde prélevés au niveau de la distribution entre janvier et décembre 2010 (n=323).

Catégorie	Nombre d'échantillons	Echantillons contaminés	Prévalence (%)
Cuisse	131	19	14,5
Escalope	94	1	1,1
Rôti	81	3	3,7
Carcasse	17	1	5,9
Total	323	24	7,4

Les sérovars retrouvés sur les produits de dindes sont consignés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Répartition des sérovars dans les différentes catégories de viande de dinde.

Catégorie	Sérovars
Carcasses	S. Indiana
Cuisses	S. Ferruch
	S. Indiana
	S. Typhimurium
	S. Hadar
	S. Derby
	S. Anatum
	S. Saintpaul
S. Brandenburg	
Escalopes	S. Derby
Rôtis	S. Agona
	S. Indiana
	S. Saintpaul

Aucun variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé au cours de cette enquête.

3.2 Bilan de la surveillance dans la filière porcine

Les données sont issues des enquêtes communautaires et des plans de surveillance pour lesquelles l'Unité HQPAP a réalisé les analyses bactériologiques et le sérotypage.

3.2.1 Prévalence de *Salmonella* dans les élevages de porcs

3.2.1.1 Chez les reproducteurs

L'enquête communautaire réalisée en 2008 a porté pour la France sur 346 élevages dont 158 élevages de reproduction (sélection, multiplication) et 188 élevages de production (naisseurs, naisseurs-engraisseurs).

Les prélèvements, réalisés sur le sol des bâtiments, consistaient en 10 pools de fèces d'au moins 25g/pool, représentant chacun la présence d'au moins 10 porcs reproducteurs. Ces 10 prélèvements étaient répartis aléatoirement dans l'élevage de façon à représenter les différents stades d'élevage (troues en gestation, troues allaitantes à la maternité, troues en verrateries). Un total de 3460 échantillons a donc ainsi été analysé selon la méthode NF EN ISO 6579-A1 (annexe D) (pré-enrichissement en EPT suivi d'un dépôt de 3 gouttes sur milieu semi-gélosé MSR/V pour enrichissement et isolement de l'halo de migration si halo sur XLD et Rambach).

Un élevage était considéré contaminé par *Salmonella* (ou dit positif) quand au moins 1 échantillon (ou pool) sur les 10 était positif.

La prévalence observée était de 43,93% sur l'ensemble des exploitations ; 50,0% pour les élevages de reproduction et 38,83% pour les élevages de Production (tableau 15).

Tableau 15 : Répartition des élevages porcins contaminés ou non par *Salmonella*, en fonction du type d'exploitation.

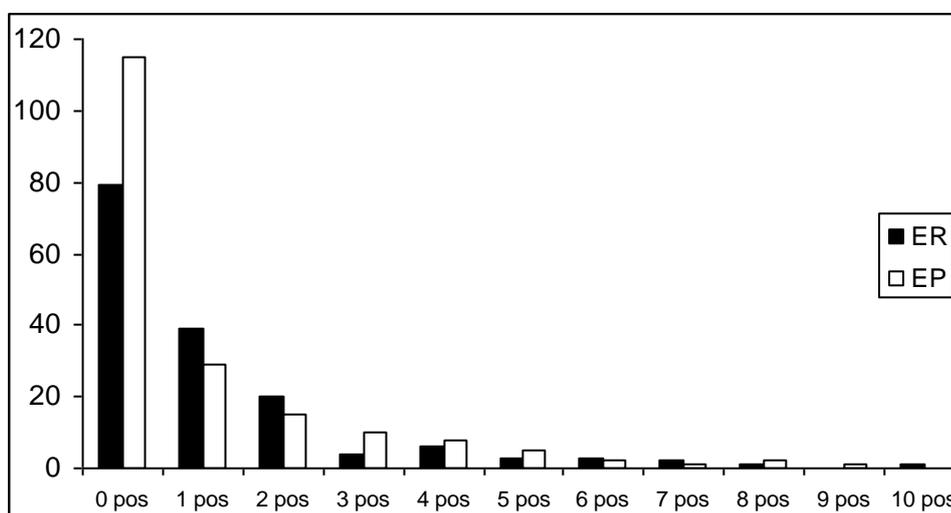
Résultat en salmonelles	Négatif	Positif	Total	% de positifs	IC 95%
Exploitation de reproduction	79	79	158	50,00	43,46%-56,54%
Exploitation de production	115	73	188	38,83	32,98%-44,68%
Total	194	152	346	43,93	39,54%-48,32%

Sur les 3460 échantillons qui ont été analysés (10 par élevage), 370 étaient positifs, dont 180 pour les élevages de reproduction (11,39%) et 190 pour les élevages de production (10,10%) (tableau 16).

Tableau 16 : Répartition des échantillons contaminés ou non par *Salmonella*, en fonction du type d'exploitation.

Nombre échantillons	Négatif	Positif	Total	% de positifs	IC 95%
Exploitation de reproduction	1400	180	1580	11,39	10,08%-12,71%
Exploitation de production	1690	190	1880	10,10	8,96%-11,25%
Total	3090	370	3460	10,69	9,83%-11,56%

La majorité des élevages contaminés par *Salmonella* était plutôt caractérisée par un faible nombre de prélèvements positifs (figure 1).

**Figure 1 : Répartition des élevages ER et EP en fonction du nombre d'échantillons positifs dans l'élevage [ER : élevages de reproduction, EP : élevages de production].**

Pour chaque échantillon analysé et avéré positif (n=370), une colonie a été prélevée par milieu d'isolement (XLD et Rambach). Pour 8 échantillons, seule une colonie caractéristique a été détectée sur milieu XLD et pas sur milieu Rambach. Dans tous les cas, un seul sérovar a été identifié par échantillon.

Les 732 isolats récupérés étaient répartis en 34 sérovars (dont des souches non-agglutinables) (tableau 17). *S. Derby* et *S. Typhimurium* ont été retrouvés respectivement dans 78 et 28 élevages sur les 152 élevages qui se sont avérés contaminés par *Salmonella*.

Aucun variant monophasique caractérisé par la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2 n'a été isolé lors de cette enquête communautaire. La méthode utilisée étant basée sur la mobilité des salmonelles en milieu MSR_V, il n'était pas possible d'isoler des variants immobiles (S.I 1,4,[5],12:-:-).

Tableau 17 : Répartition des sérovars, selon les géloses et le nombre d'élevages concernés.

Sérovar	XLD	Rambach	Total	%	Nbre élevage avec ce sérovar
S. Derby	158	154	312	42,62	78
S. Infantis	48	50	98	13,39	28
S. Typhimurium	30	32	62	8,47	16
S. Livingstone	13	12	25	3,42	6
S. Anatum	12	13	25	3,42	5
S. Kedougou	9	14	23	3,14	5
S. Agona	5	5	10	1,37	5
S. Panama	6	6	12	1,64	4
S. Bredeney	11	11	22	3,01	4
S. London	21	21	42	5,74	4
S. Mbandaka	4	4	8	1,09	3
S. Muenster	2	2	4	0,55	2
S. Virchow	2	2	4	0,55	2
S. Goldcoast	6	6	12	1,64	2
Non agglutinable	3	3	6	0,82	2
S. Cubana	1	1	2	0,27	1
S. Dublin	1	1	2	0,27	1
S. Lindenburg	1	1	2	0,27	1
S. Montevideo	1	1	2	0,27	1
S. Muenchen	1	1	2	0,27	1
S. Rissen	1	1	2	0,27	1
S. Rubislaw	1	1	2	0,27	1
S. Senftenberg	1	1	2	0,27	1
S. Tennessee	1	1	2	0,27	1
S. Worthington	1	1	2	0,27	1
S. Westhampton	1	0	1	0,14	1
S. Brandenburg	2	2	4	0,55	1
S. Gaminara	2	2	4	0,55	1
S. II 47:d :1,5	2	2	4	0,55	1
S. I 41:r:-	3	3	6	0,82	1
S. Bovismorbificans	4	4	8	1,09	1
S. Give	4	4	8	1,09	2
S. Meleagridis	5	5	10	1,37	1
S. Coeln	1	1	2	0,27	1
Total isolats	364	368	732		

3.2.1.2 Chez les porcs charcutiers

En parallèle de l'enquête communautaire, la DGAL a demandé le prélèvement de 4 échantillons (pools de fèces prélevés au sol et représentatifs de la présence d'au moins 10 individus) dans 4 salles d'élevage dans les élevages naisseurs-engraisseurs) afin d'avoir une prévalence observée pour les porcs charcutiers à l'élevage.

Ces prélèvements ont été réalisés dans 109 élevages ce qui a engendré 436 (109 x 4) analyses d'échantillons. La prévalence d'élevages de porcs charcutiers contaminés par *Salmonella* était de 22,02%. La prévalence d'échantillons contaminés par *Salmonella* pour ces porcs charcutiers était de 9,63% (tableau 18).

Onze sérovars ont été identifiés avec comme sérovars majeurs, *S. Derby* (39,6% des isolats) et *S. Typhimurium* (30,6% des isolats). Aucun variant monophasique (variants S.I 1,4,[5],12:i:- ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2) n'a été isolé lors de cette enquête communautaire. La méthode utilisée étant basée sur la mobilité des salmonelles en milieu MSR/V, il n'était pas possible d'isoler des variants immobiles (S.I 1,4,[5],12:-:-).

Tableau 18 : Prévalence en salmonelle chez les charcutiers à l'élevage.

Porcs charcutiers	Négatif	Positif	Total	% de positifs	IC 95%
Elevage	85	24	109	22,02	15,49%-28,55%
Echantillon	394	42	436	9,63	7,31%-11,96%

3.2.2 Prévalence de *Salmonella* sur les carcasses de porcs charcutiers à l'abattoir

L'enquête communautaire réalisée en 2006-2007 a porté, en France, sur 1166 porcs charcutiers répartis sur 21 abattoirs abattant 80% de la production nationale.

Pour chaque carcasse sélectionnée, un prélèvement de ganglions lymphatiques mésentériques d'au moins 25g a été réalisé. Sur 413 de ces carcasses, un prélèvement d'une surface totale de 400 cm² par une seule éponge, sur 4 sites différents de la carcasse, a été effectué.

Un total de 1581 échantillons a donc ainsi été analysé et ce selon la méthode NF EN ISO 6579-A1 (annexe D) (pré-enrichissement en EPT suivi d'un dépôt de 3 gouttes sur MSR/V pour enrichissement et isolement de l'halo de migration si halo sur XLD et Rambach).

Salmonella a été retrouvée dans les ganglions de 215 des 1166 porcs prélevés, soit une prévalence individuelle de 18,4% (IC_{95%} [15,6-21,3]). *Salmonella* a été retrouvée sur 77 carcasses parmi les 413 porcs prélevés, soit une prévalence individuelle de 18,6% (IC_{95%} [13,7-23,4]). Il n'a pas été observé de concordance dans la détection de *Salmonella* à partir des ganglions et des carcasses (Kappa=0,1) (tableau 19).

Tableau 19 : Tableau de concordance de la détection des *Salmonella* selon le type de prélèvements analysés (ganglions ou carcasses de porcs charcutiers à l'abattoir), enquête communautaire 2006-2007 [négatif : non détection de *Salmonella*, positif : détection de *Salmonella*].

		Ganglions		
		Négatif	Positif	Total
carcasses	Négatif	281	55	336
	Positif	57	20	77
	total	338	75	413

Un total de 27 sérovars différents a été isolé au cours de cette enquête (tableau 20).

Les 2 sérovars les plus fréquemment isolés sont S. Typhimurium (41% ; IC_{95%} [34,4-47,8] des ganglions positifs, 43% ; IC_{95%} [31,7-54,0] des surfaces de carcasses positives) et S. Derby (35% ; IC_{95%} [28,8-42,2] des ganglions positifs, 36% ; IC_{95%} [25,2-47,5] des surfaces de carcasses positives).

Le variant monophasique de formule antigénique S.I 1,4,12:-:1,2 a été isolé dans 5 ganglions et sur 1 surface de carcasse. Ces résultats correspondent à une prévalence de contamination par ce variant monophasique de 0,43% (IC_{95%} [0,14-1,00]) pour l'ensemble des porcs de l'enquête (1166 porcs) au niveau des ganglions.

Tableau 20 : Répartition des sérovars issus des ganglions et des surfaces de carcasse.

Sérovar « ganglion »	Total isolat sur XLD	Sérovar "carcasse"	Total isolat sur XLD
Typhimurium	88	Typhimurium	33
Derby	76	Derby	28
Infantis	5	Infantis	5
S.I 4,12:-:1,2	5	Bredeney	3
Agona	5	Brandenburg	2
Schwarzengrund	4	Goldcoast	2
Brandenburg	4	S.I 4,12 :-:1,2	1
Bredeney	3	Schwarzengrund	1
S.IIIa 48:z4,z23:-	3	Bradford	1
Anatum	2	S.IIIb 38:r:z	1
Newport	2	Agona	1
Enteritidis	2		
Kedougou	2		
Saintpaul	1		
Indiana	1		
Mbandaka	1		
Tennessee	1		
Coeln	1		
Hadar	1		
Veneziana	1		
Bradford	1		
Montevideo	1		
Goldcoast	1		
Stourbridge	1		
Bovismorbificans	1		

3.2.3 Prévalence de *Salmonella* sur les produits de porcs à la distribution

L'unité HQPAP a été sollicitée par la DGAL en 2010 et en 2012 pour assurer les recherches de *Salmonella* dans des viandes fraîches de porcs prélevées au stade de la distribution (Viandes hachées, produits de découpe issus de la longe (côtes, rôtis, filets mignons) et autres morceaux (rouelles, jarrets, escalopes)).

Un total de 697 échantillons a été analysé selon la méthode de référence (NF EN ISO 6579:2002) prévu pour les aliments (pré-enrichissement en EPT suivi d'un enrichissement en RVS et MKTTn puis isolement sur XLD et Rambach). Cette méthode permet de détecter les souches immobiles.

Pour 2010, 8 échantillons étaient positifs en Salmonelles (2,45% ; IC_{95%} [1,06 - 4,76]) sur les 327 analysés.

27 isolats ont été récupérés et sérotypés, sachant que 1 à 4 isolats peuvent être isolés à partir d'un même échantillon puisque la méthode met en œuvre deux milieux d'enrichissement et deux milieux d'isolement. Les sérovars se répartissaient comme suit : *S. Derby* (n=14), *S. Typhimurium* (n=6), *S. Infantis* (n=3), *S. Anatum* (n=1). Trois isolats correspondaient à des variants monophasiques de formule antigénique S.I 4,5,12:i:-. Ces 3 isolats proviennent d'un seul échantillon, ce qui donne une prévalence pour ce variant de 0,30% (IC_{95%} [0,01 – 1,69]).

Pour 2012 (plan de surveillance en cours), sur la période de janvier à septembre, 370 échantillons de viandes fraîches de porcs ont été analysés. Treize échantillons (8 viandes hachées, 2 découpes et 3 autres morceaux) se sont révélés contaminés par *Salmonella* (3,51% ; IC_{95%} [1,06 - 4,76]). 101 isolats ont été récupérés et les sérovars suivants ont été trouvés : *S. Typhimurium* (3 échantillons), *S. Derby* (4), *S. Livingstone* (1), *S. Rissen* (1), *S. non agglutinable* (2). 8 isolats monophasiques S.I 4,5,12:i:- et 8 isolats monophasiques S.I 4,12:i:- ont été retrouvés respectivement dans deux échantillons soit une prévalence de ces variants monophasiques de 0,54% (IC_{95%} [0,07 – 1,94]).

Aucune souche immobile (S.I 1,4,[5],12:-:-) n'a été détectée à partir des échantillons analysés lors de ces enquêtes de 2010 et 2012 .

3.3 Bilan de la surveillance assurée par le réseau *Salmonella*

Le fonctionnement et les objectifs poursuivis par le réseau *Salmonella* ont déjà fait l'objet de plusieurs publications [Afssa, 2009 ; Danan, 2009 ; David 2011 ; Lailler *et al.*, 2012]. Cependant, il est important de rappeler certains points clés avant de présenter les données collectées.

3.3.1 Le réseau *Salmonella* : objectifs et fonctionnement

Ce réseau créé en 1997 poursuit deux objectifs : (1) Apporter aux laboratoires d'analyses alimentaires et vétérinaires une expertise technique pour le sérotypage des isolats de *Salmonella* ; (2) Développer une activité de vigilance dans la surveillance des *Salmonella* isolées de la chaîne agro-alimentaire et de détection de signaux concernant l'augmentation inhabituelle d'un sérovar.

Les *Salmonella* sont isolées de prélèvements réalisés tout au long de la chaîne alimentaire, par de nombreux laboratoires qui assurent à ce jour une bonne couverture nationale d'analyses de première intention. La quasi-totalité (97%) des laboratoires publics départementaux sont adhérents au réseau. Chaque année environ 140 laboratoires sont abonnés au réseau et transmettent des souches à sérotyper au LSAI de l'Anses et/ou des résultats de sérotypage, ainsi que différents renseignements (contexte d'isolement, type et origine du prélèvement, etc.).

Ces informations sont collectées dans trois secteurs: (i) en santé et production animales (animaux malades, porteurs sains ou environnement d'élevage) ; (ii) en hygiène des aliments (destinés à la consommation humaine ou animale, environnement d'abattoirs, ateliers de découpe et de transformation) ; (iii) dans l'écosystème naturel.

3.3.2 La qualité des données collectées

Les données collectées ne peuvent pas être assimilées à des données de prévalence car le réseau *Salmonella* ne reçoit aucune indication sur le nombre total d'analyses réalisées par les laboratoires partenaires. La réglementation européenne sur les zoonoses, qui cible certaines filières d'élevage et certains sérovars, constitue une pression sélective qui peut avoir un impact sur la remontée des informations.

Cependant, la relative stabilité des données du réseau et les similitudes observées dans le passé concernant l'évolution de certains sérovars isolés à la fois chez l'Homme (CNR) et dans les aliments (LNR), soulignent l'intérêt du réseau dans le dispositif national de surveillance des *Salmonella*.

Un essai interlaboratoires d'aptitude (EILA) au sérotypage conventionnel des *Salmonella* est organisé chaque année depuis 2002, par l'équipe CEB en charge de l'animation du réseau *Salmonella*. Plus de 70 laboratoires participent chaque année à cet EILA, soit environ 50% des laboratoires partenaires dont une large majorité sont des laboratoires qui adressent leurs résultats de sérotypage de *Salmonella* au réseau (tableau 21). Chaque année, un panel de six cultures pures différentes de *Salmonella* de sérovar particulier est adressé aux participants.

Vu l'émergence des variants monophasiques de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- depuis 2008 parmi les isolats collectés au sein de la base de données du réseau, il a été décidé d'intégrer une souche variant monophasique de Typhimurium S.I 1,4,[5],12:i:-, dans le panel des 6 souches destinées à être sérotypées lors de l'organisation de l'EILA en 2011. Cette souche a été convenablement sérotypée par 63 des 75 laboratoires participants. Dix laboratoires ont déterminé sans erreur les antigènes somatiques et flagellaire de 1^{ère} phase mais ont identifié, à tort, une seconde phase flagellaire. Deux laboratoires ont rendu un résultat inexact ou incomplet du fait d'une inversion de rendu de résultat entre deux souches.

Les résultats des précédents EILA concernant les souches appartenant à des sérovars potentiellement à l'origine des variants sont détaillés ci-dessous :

- S. Agama en 2012 : 73 concordances exactes et complètes / 75 ; pas d'erreur d'interprétation mais un manque de sérums individuels pour finaliser le sérotypage complet (n=2 laboratoires) ;
- S. Lagos en 2010 : 74 concordances exactes et complètes / 76 ; trop faible agglutination avec H:i faussement négatif et manque de sérums individuels (n=2) ;
- S. Bochum en 2009 : 58 concordances exactes et complètes / 77 ; erreurs d'agglutination avec H:i faussement positif (n=15), manque de sérums (n=4) ;
- S. Schwarzengrund en 2008 : 65 concordances exactes et complètes / 69 ; les laboratoires participants n'ont pas tous les sérums conseillés (n=4) ;
- S. Gloucester en 2007 : 57 concordances exactes et complètes / 70 ; mauvaise détermination des antigènes somatiques et/ ou flagellaires (n=13) ;
- S. Coeln en 2006 : 55 concordances exactes et complètes / 64 ; mauvaise détermination des antigènes flagellaires (n=9) ;
- S. Typhimurium en 2004 : 61 concordances exactes et complètes / 62 ; non détermination de la 2^{nde} phase flagellaire (n=1) ;

- *S. Saintpaul* en 2004 : 60 concordances exactes et complètes / 62 ; mauvaise détermination d'une des deux phases flagellaires (n=2) ;
- *S. Heidelberg* et *S. Bredeney* en 2004 : 62 concordances exactes et complètes / 62 ;

L'aptitude des laboratoires à réaliser un sérotypage complet de *Salmonella* est globalement très satisfaisante. Cependant, il ressort des récents EILA organisés, un manque de disponibilité de sérums individuels pour pouvoir garantir le sérotypage complet des souches adressées par l'équipe organisatrice de l'EILA et animatrice du réseau *Salmonella*. Une réflexion doit être menée conjointement avec la DGAL, début 2013, pour définir les critères de performance du prochain EILA.

La participation à l'EILA qui sera organisé en 2013 sera très certainement rendue obligatoire par la DGAL pour tous les laboratoires agréés et reconnus. Actuellement, le taux de participation à l'EILA annuel de ces laboratoires agréés et reconnus est très élevé, au regard des listes dressées par l'administration respectivement à la date du 01/03/2012 et du 25/04/2012.

En 2012, 94% (n=48) des laboratoires qui étaient agréés ont participé à l'EILA. Tous les laboratoires agréés pour le dépistage bactériologique de *Salmonella enteritica* subsp. *enterica* et sérotypage des souches isolées dans les prélèvements d'environnement d'élevages et de couvoirs, les organes de volailles (agrément 1, n=43) ont participé. Tous les laboratoires agréés pour le dépistage bactériologique de *Salmonella enteritica* subsp. *enterica* et sérotypage des souches isolées dans les œufs, muscles et aliments pour animaux (agrément 2, n=46) ont participé, à l'exception de trois d'entre-eux.

Par ailleurs, 91% (n=23) des laboratoires qui étaient autorisés à réaliser les analyses de dépistage des salmonelles en élevage, dans le cadre des autocontrôles obligatoires, ont participé à l'EILA de 2012.

Concernant les laboratoires qui adressent leurs propres résultats de sérotypage au réseau, les trois plus importants fournisseurs représentent à eux trois, chaque année, environ 50% de ces récapitulatifs, sachant également que ces derniers représentent eux-mêmes environ les 2/3 de l'ensemble des résultats de sérotypages collectés (l'autre tiers correspond aux souches sérotypées au LSAI de l'Anses). Ces trois laboratoires, habitués du réseau *Salmonella*, ont correctement déterminé la formule détaillée du variant monophasique de Typhimurium (S.I 1,4,[5],12:i:-) lors de l'EILA de 2011.

Le LNR participe chaque année à un EILA sérotypage de *Salmonella*, organisé par le LR-UE-*Salmonella* et qui comprend un panel de 20 souches à tester. Les résultats obtenus ces dernières années sont très satisfaisants.

En conclusion, ces informations sont de nature à conforter l'évaluateur du risque sur l'aptitude des laboratoires du réseau *Salmonella* à sérotyper les salmonelles d'origine non humaine et sur la qualité des données collectées, concernant notamment les souches S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:-.

Les laboratoires adhérents au réseau, qui ne peuvent pas aboutir à un sérotypage complet par manque de sérums, adressent généralement leurs isolats pour confirmation au LNR. Néanmoins, une sous-estimation de la fréquence d'isolement des souches S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:- ne peut pas être totalement exclue du fait du statut de ces souches à être considérées comme des *S. Typhimurium* selon l'actuelle réglementation nationale.

Tableau 21 : Participation des laboratoires adhérents au réseau *Salmonella* à l'essai interlaboratoires annuel d'aptitude au sérotypage des *Salmonella* depuis 2004 [pas d'EILA en 2005 pour cause de déménagement du laboratoire organisateur].

	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nb. de laboratoires adhérents	157	160	147	139	148	145	128	En cours
Nb. de laboratoires participant à l'EILA	62	64	70	69	77	76	75	75
6 sérovars testés* chaque année	Typhimurium (<u>1</u> ,4,[5],12:i:1,2)	Coeln (<u>1</u> ,4,[5],12:y:1,2)	Gloucester (<u>1</u> ,4,12, <u>27</u> :i:l,w)	Infantis	Bochum (<u>1</u> ,4,[5],12:r:l,w)	Lagos (<u>1</u> ,4,[5],12:i:1,5)	Variant de Typhimurium S.I <u>1</u> ,4,[5],12:i:-	Agama (4,12 : i :1,6)
	Saintpaul (<u>1</u> ,4,[5],12:e,h:1,2)	Thompson	Liverpool	Schwarzengrund (<u>1</u> ,4,12, <u>27</u> :d:1,7)	Braenderup	Ngor	Carno	Emek
	Heidelberg (<u>1</u> ,4,[5],12:r:1,2)	Livingstone	Zanzibar	Meleagridis	London	Falkensee	Ohlstedt	Cannstatt
	Bredeney (<u>1</u> ,4,12, <u>27</u> :l,v:1,7)	Goettingen	Virchow	Tilburg	Gnesta	Glostrup	Bergedorf	Blegdam
	Panama	Muenster	Manchester	Eboko	Enteritidis	Enteritidis	Moscow	Hadar
	Anatum	Broughton	Kapemba	Haifa (<u>1</u> ,4,[5],12:z ₁₀ :1,2)	Hadar	Virchow	Infantis	Virchow
6 souches exactes et complètes/ 6 (%)	82	47	64	64	49	61	51	78
5 souches exactes et complètes / 5 (%)	97	72	87	84	78	83	87	89

* : Les formules des sérovars n'appartenant pas au groupe O:4, ne correspondant donc pas à des sérovars potentiellement à l'origine des variants (tableau 2), ne sont pas détaillées par souci de synthèse.

3.3.3 Données descriptives des isoléments de souches enregistrées dans la base de données du réseau *Salmonella*

Depuis de nombreuses années, le réseau *Salmonella* collecte un très grand nombre de résultats de sérotypage de salmonelles et de données associées. Ce rapport présente les éléments disponibles dans la base de données du réseau *Salmonella* depuis 2007, date de l'émergence du variant monophasique S.I 1,4,[5],12:i:- du sérovar Typhimurium en clinique humaine. Ces données doivent permettre de juger de l'importance relative des différents types de variants et des sérovars potentiellement à l'origine de ces variants.

3.3.3.1 Données générales disponibles

Globalement, sur cette période, le nombre de résultats de sérotypage collectés par le réseau a augmenté d'environ 13 500 souches en 2007 pour atteindre presque 19 000 souches en 2011. Cette augmentation résulte d'une collecte plus importante de souches dans le secteur de la santé et production animales et principalement concernant celles sérotypées par les laboratoires partenaires du réseau (tableau 22). L'importance relative des souches issues du secteur santé et production animales n'a cessé d'augmenter par rapport à celles isolées en hygiène des aliments, pour passer respectivement de 2/3-1/3 en 2007 à 3/4-1/4 en 2011, du fait notamment du dépistage obligatoire des salmonelles dans les troupeaux de poulets de chair avant abattage.

Les principaux sérovars isolés durant cette période sont, toutes origines confondues, Typhimurium et Senftenberg. Le tableau 23 montre bien également la forte progression depuis 2007 du nombre de souches S.I 1,4,[5],12:i:- : 84 souches en 2007 versus 513 souches en 2011, toutes origines confondues.

Une très large majorité des données collectées par le réseau concerne les salmonelles isolées de la filière avicole, du fait notamment du dépistage obligatoire des salmonelles dans les troupeaux de poulets de chair avant abattage, et plus particulièrement celles provenant du secteur santé et production animales (tableau 24). Dans ce secteur, les souches isolées des filières *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo* et de la filière porcine représentent respectivement chaque année environ 40%, 15% et 3% de l'ensemble des souches collectées.

Le tableau 25 souligne une stabilité de la part relative des certaines catégories d'aliments (ovoproduits, viandes bovines, produits de charcuterie, aliments pour animaux) recensées dans la base de données du réseau, entre 2007 et 2011 et au contraire une évolution pour d'autres (viandes de volailles en diminution et viandes de porcs et produits laitiers en augmentation).

Les tableaux 26, 27 et 28 présentent, le nombre et la proportion relative des sérovars potentiellement à l'origine des variants observés entre 2007 et 2011 dans le secteur de la santé et des productions animales respectivement pour les filières des espèces *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo* et porcine. Concernant les variants, ces données soulignent surtout l'augmentation constante des variants monophasiques S.I 1,4,[5],12:i:- durant cette période, en élevage de *Gallus gallus*. L'identification des souches correspondant aux deux autres types de variants demeure extrêmement rare en élevage dans ces filières.

Concernant les sérovars potentiellement à l'origine des variants, principalement isolés dans ces filières, il faut surtout noter :

- pour *Gallus gallus* : Typhimurium, Indiana, Derby, Saintpaul, Agona et Heidelberg;
- pour *Meleagris gallopavo* : Typhimurium, Indiana, Derby, Saintpaul, Agona et Bredeney;
- pour la filière porcine : Typhimurium et Derby.

Ces données révèlent une tendance à l'augmentation entre 2007 et 2011, du nombre de souches isolées en élevages de *Gallus gallus* et appartenant aux sérovars Typhimurium, Saintpaul et Agona. Cette observation s'applique également aux souches de sérovar Typhimurium provenant d'élevage de *Meleagris gallopavo*. Il n'est pas observé de tendance particulière pour ces sérovars au sein des élevages porcins.

Tableau 22 : Nombre de résultats de sérotypage collectés, chaque année, dans le cadre du réseau *Salmonella* entre 2007 et 2011, selon le secteur d'isolement et l'origine du sérotypage.

Année	2007	2008	2009	2010	2011
Secteur d'isolement <i>Origine du résultat de sérotypage</i>					
Santé et production animales	8608	8177	10348	11456	13955
<i>Anses, LSAI</i>	2042	1318	1696	1507	1573
<i>Laboratoires partenaires du réseau</i>	6566	6359	8652	9949	12382
Hygiène des aliments	5036	4831	4254	5173	3893
<i>Anses, LSAI</i>	3909	3140	2671	3227	2404
<i>Laboratoires partenaires du réseau</i>	1127	1691	1583	1946	1489
Ecosystème naturel	335	339	235	221	331
<i>Anses, LSAI</i>	213	227	143	177	269
<i>Laboratoires partenaires du réseau</i>	122	112	92	44	62
Total Secteurs	13979	13347	14837	16850	18808
<i>Total Anses, LSAI</i>	6164	4685	4510	4911	4770
<i>Total Laboratoires partenaires du réseau</i>	7815	8662	10327	11939	14038
Nombre de sérovars identifiés	258	258	246	278	287

Tableau 23 : Principaux sérovars isolés entre 2007 et 2011, dans le cadre du réseau *Salmonella*, toute origine confondue.

SEROVARS	2007	2008	2009	2010	2011
SENFTEMBERG	1827	2151	2796	2362	3756
TYPHIMURIUM	2003	1513	1480	2449	2349
INDIANA	1409	1139	1123	1281	1375
MONTEVIDEO	750	970	1054	1038	1213
MBANDAKA	328	483	860	800	1141
DERBY	1524	887	918	976	906
REGENT	122	143	305	447	857
KOTTBUS	855	504	364	520	703
ENTERITIDIS	884	832	661	570	530
S.I 1,4,[5],12:i:-	84	100	188	315	513
DUBLIN	194	332	551	618	496
SAINTPAUL	236	177	131	181	412
NAPOLI	196	165	200	290	411
LIVINGSTONE	100	249	281	491	346
NEWPORT	121	73	99	186	323
AGONA	161	231	221	255	212
ANATUM	168	208	220	408	205
VENEZIANA	90	81	90	171	179
RISSEN	122	59	100	145	176
INFANTIS	247	185	208	203	169
BREDENEY	208	152	166	144	131
VIRCHOW	78	36	67	128	67
HADAR	264	120	219	119	70
Sous-total	12152	10902	12547	14476	16540
AUTRES SEROVARS	1827	2445	2290	2374	2268
Nombre total de souches inventoriées	13979	13347	14837	16850	18808

Tableau 24 : Proportion relative (%) annuelle des différentes filières animales, au sein de la base de données du réseau *Salmonella* (secteur santé et production animales), entre 2007 et 2011.

Filières animales	Années				
	2007	2008	2009	2010	2011
Avicole	89	89	89	92	93
<i>dont... Gallus gallus(poule et poulet)</i>	34	37	45	43	40
<i>...Meleagris gallopavo (dinde)</i>	9	10	13	16	17
<i>....Canard</i>	35	37	26	30	31
Bovine	6	7	5	5	5
Porcine	3	2	3	1	1
Autres filières	2	2	3	2	1

Tableau 25 : Proportion relative (%) annuelle des différentes catégories d'aliments au sein de la base de données du réseau *Salmonella* (secteur hygiène des aliments), entre 2007 et 2011.

Catégories d'aliments	Années				
	2007	2008	2009	2010	2011
Viandes de volailles	24	18	17	12	15
Ovoproduits	2	1	1	1	1
Viandes bovines	3	2	2	3	4
Produits laitiers	7	13	15	16	17
Viandes porcines	14	11	15	22	21
Produits de charcuterie	13	11	10	10	12
Aliments pour Animaux	17	30	21	21	14
Autres catégories	20	14	19	15	16

Tableau 26 : Représentativité, au sein des filières de productions de l'espèce *Gallus gallus*, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2), entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle).

Année	2007		2008		2009		2010		2011	
	N	%	N	%	N	N	%	%	N	%
S.I 1,4,[5],12:i:-	6	0,2	20	0,7	40	1,0	52	1,1	66	1,3
S.I 1,4,[5],12:-:1,2	1	0,0	-	-	-	-	1	0,0	1	0,0
S.I 1,4,[5],12:-:-	11	0,4	1	0,0	12	0,3	1	0,0	2	0,0
Typhimurium	148	5,7	146	5,5	200	4,8	316	6,9	308	6,0
Indiana	161	6,2	40	1,5	135	3,2	161	3,5	111	2,2
Derby	26	1,0	18	0,7	45	1,1	32	0,7	40	0,8
Saintpaul	9	0,3	18	0,7	26	0,6	39	0,9	45	0,9
Agona	30	1,1	32	1,2	49	1,2	68	1,5	83	1,6
Bredeney	6	0,2	15	0,6	9	0,2	8	0,2	10	0,2
Paratyphi B	1	0,0	1	0,0	8	0,2	9	0,2	6	0,1
Abony	-	-	1	0,0	-	-	1	0,0	1	0,0
Agama	-	-	-	-	-	-	16	0,4	1	0,0
Brandenburg	1	0,0	1	0,0	4	0,1	3	0,1	1	0,0
Coeln	12	0,5	7	0,3	30	0,7	21	0,5	10	0,2
Farsta	-	-	-	-	1	0,0	-	-	-	-
Haifa	1	0,0	1	0,0	-	-	-	-	1	0,0
Heidelberg	15	0,6	36	1,3	42	1,0	7	0,2	25	0,5
Kingston	2	0,1	1	0,0	-	-	-	-	3	0,1
Kisangani	3	0,1	1	0,0	1	0,0	-	-	-	-
Schwarzengrund	20	0,8	14	0,5	28	0,7	21	0,5	3	0,1
Total	2616	100	2669	100	4190	100	4568	100	5107	100

Nb : Les autres sérovars présentés dans le tableau 2, mais qui ne figurent pas dans ce tableau, ne sont pas présents dans la base de données du réseau *Salmonella* entre 2007 et 2011.

Tableau 27 : Représentativité, au sein des filières de productions de l'espèce *Meleagridis gallopavo*, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2), entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle].

Année	2007		2008		2009		2010		2011	
	N	%	N	%	N	N	%	%	N	%
S.I 1,4,[5],12:i:-	3	0,4	4	0,5	4	0,3	62	3,7	15	0,7
S.I 1,4,[5],12:-:1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,0
S.I 1,4,[5],12:-:-	-	-	1	0,1	-	-	-	-	-	-
Typhimurium	41	6,0	24	3,2	41	3,5	72	4,3	75	3,3
Indiana	46	6,8	31	4,1	57	4,8	92	5,5	49	2,2
Derby	163	24,0	214	28,2	168	14,2	198	11,8	146	6,5
Saintpaul	23	3,4	20	2,6	10	0,8	26	1,5	25	1,1
Agona	37	5,5	23	3,0	23	1,9	45	2,7	35	1,6
Bredeney	32	4,7	3	0,4	14	1,2	42	2,5	55	2,4
Paratyphi B	1	0,1	-	-	1	0,1	1	0,1	1	0,0
Brandenburg	4	0,6	1	0,1	1	0,1	1	0,1	-	-
Coeln	7	1,0	-	-	7	0,6	9	0,5	4	0,2
Heidelberg	4	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
Lagos	-	-	-	-	-	-	2	0,1	-	-
Schwarzengrund	-	-	1	0,1	-	-	1	0,1	-	-
Total	678	100	759	100	1183	100	1684	100	2255	100

Nb : Les autres sérovars présentés dans le tableau 2, mais qui ne figurent pas dans ce tableau, ne sont pas présents dans la base de données du réseau *Salmonella* entre 2007 et 2011.

Tableau 28 : Représentativité, au sein de la filière porcine, secteur santé et production animales, des principaux sérovars de *Salmonella* potentiellement à l'origine des variants (cf. tableau 2) entre 2007 et 2011 dans le cadre du réseau *Salmonella* [N : nombre, % : part relative annuelle].

Année	2007		2008		2009		2010		2011	
	N	%	N	%	N	N	%	%	N	%
S.I 1,4,[5],12:i:-	3	1,1	2	1,4	6	1,9	7	6,3	1	0,6
S.I 1,4,[5],12:-:1,2	2	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
S.I 1,4,[5],12:-:-	-	-	-	-	1	0,3	-	-	-	-
Typhimurium	116	43,1	37	26,6	41	13,1	40	35,7	31	19,6
Indiana	1	0,4	-	-	-	-	4	3,6	-	-
Derby	91	33,8	36	25,9	150	47,8	28	25,0	90	57,0
Saintpaul	1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Agona	6	2,2	6	4,3	1	0,3	1	0,9	-	-
Bredeney	5	1,9	2	1,4	3	1,0	-	-	-	-
Brandenburg	5	1,9	1	0,7	-	-	-	-	-	-
Coeln	1	0,4	1	0,7	-	-	-	-	-	-
Schwarzengrund	4	1,5	1	0,7	1	0,3	-	-	-	-
Total	269	100	139	100	314	100	112	100	158	100

Nb : Les autres sérovars potentiellement à l'origine des variants, présentés dans le tableau 2, mais qui ne figurent pas dans ce tableau, ne sont pas présents dans la base de données du réseau *Salmonella* entre 2007 et 2011.

3.3.3.1 Données concernant plus spécifiquement les variants

Les données disponibles, dans la base de données, montrent une forte augmentation, depuis 2007, du nombre d'isolats collectés par le réseau *Salmonella*, correspondant aux variants monophasiques de formule S.I 1,4,[5],12:i:- (tableau 29). Cette observation est en cohérence avec les observations plus largement décrites en Europe [EFSA, 2010].

La description détaillée des effectifs annuels, comptabilisés depuis 2007 pour ces souches monophasiques S.I 1,4,[5],12:i:- (tableau 30), selon l'origine des prélèvements, montre une grande dispersion de ces variants dans les filières et catégories d'aliments recensées. Dès 2007, ces variants étaient déjà plus largement isolés d'élevages de volaille et d'aliments issus de la filière porcine (viandes de porc et produits de charcuterie).

L'augmentation récente de l'effectif de ces souches est plus marquée dans le secteur de l'hygiène des aliments que dans celui de la santé et production animales (SPA). Il est cependant important de rappeler ici, la très faible proportion relative des données collectées par le réseau au sein du secteur SPA, dans d'autres filières que la filière avicole. Par ailleurs, la collecte de ces souches isolées d'hygiène des aliments peut avoir été renforcée suite à la survenue de plusieurs foyers de toxi-infections alimentaires collectives en France en 2010 et 2011.

Ces données montrent également une implication croissante de la filière bovine (élevages et viandes), beaucoup plus marquée depuis 2010. Cette tendance ne peut être imputée à un biais de surveillance généré par la mise en œuvre de la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 du 4 mars 2010 car celle-ci ne concernait pas la filière bovine. Ces variants sont également présents dans le secteur de l'hygiène des aliments destinés aux animaux (Aa, tableau 30).

Toutes origines confondues, l'effectif du nombre de souches collectées correspondant aux deux autres formules antigéniques, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:-, est bien moins élevé. Les données du réseau *Salmonella* montrent des effectifs si faible qu'il n'est pas possible de conclure sur l'existence de tendances mais ces données permettent de conclure à l'absence d'émergence de ces souches, contrairement aux souches S.I 1,4,[5],12:i:- (tableaux 29 et 31).

Les souches isolées du secteur dit « écosystème naturel » sont issues de prélèvements d'émissaires côtiers, boues de station d'épuration, eau de fleuve ou de rivière, etc.

Ces éléments permettent d'actualiser les données présentées dans l'avis de l'Afssa du 16 octobre 2009 et confortent les conclusions qui ont été précédemment émises : parmi ces variants, « le sérovar monophasique S.I 1,4,[5],12:i:- est de loin le plus isolé, [...] » [Afssa, 2009].

Tableau 29 : Nombre d'isolats collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon la formule antigénique de variant identifiée par sérotypage conventionnel (sources : inventaires des *Salmonella* d'origine non humaine disponibles en ligne. [* : les données présentées pour 2012 sont partielles et n'incluent pas les résultats de sérotypage des laboratoires partenaires mais concernent uniquement les résultats de sérotypage des souches adressées à l'unité CEB].

Type de variant	2007	2008	2009	2010	2011	2012*
1,4,5,12:i:-	0	51	125	315	389	220
1,4,12:i:-	84	49	63	76	124	91
Total 1,4,[5],12:i:-	84	100	188	391	513	311
1,4,5,12:-:1,2	0	0	0	5	1	5
1,4,12:-:1,2	17	3	5	2	7	1
Total 1,4,[5],12:-:1,2	17	3	5	7	8	6
1,4,5,12:-:-	1	0	12	7	2	2
1,4,12:-:-	19	10	12	5	5	1
Total 1,4,[5],12:-:-	20	10	24	12	7	3

Tableau 30 : Nombre d'isolats présentant la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-, collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon les secteurs et principales espèces animales ou catégories d'aliments [SPA : secteur Santé et production animales ; H : secteur Hygiène des aliments ; E : Ecosystème naturel ; Aa : alimentation animale ; ND : origine de l'espèce non déterminée]

Secteur / filière	2007	2008	2009	2010	2011
SPA	23	32	65	191	167
Poules et Poulets de chair					66
Dindes					15
Autres volailles					19
Volailles - non précisées	14	25	49	156	10
Porcs	3	2	6	7	1
Bovins	5	5	9	26	44
Caprins/Ovins	-	-	-	1	10
Autres	1	-	1	1	2
H	57	66	116	191	333
Viandes de poulets					2
Viandes de dindes					3
Autres Viandes de volailles					11
Viandes de volailles ND	4	1	24	23	2
Viandes de porcs	12	10	29	65	95
Produits de charcuterie	28	18	35	53	86
Viandes ovines et caprines	-	-	1	-	4
Viandes de bovins	1	13	3	17	21
Produits laitiers	9	7	1	11	81
Autres (plats cuisinés, Aa)	3	17	23	22	28
E	4	2	7	9	13
Total	84	100	193	391	513

Tableau 31 : Nombre d'isolats présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:, collectés par le réseau *Salmonella* de 2007 à 2011, selon les secteurs et principales espèces animales ou catégories d'aliments [SPA : secteur Santé et production animales ; H : secteur Hygiène des aliments ; E : Ecosystème naturel ; Aa : alimentation animale]

Formule antigénique	S.I 1,4,[5],12:-:1,2					S.I 1,4,[5],12:-:				
	2007	2008	2009	2010	2011	2007	2008	2009	2010	2011
Secteur / filière										
SPA	4	1	3	2	4	14	5	19	2	4
Volaille	1	1	1	2	4	11	2	13	2	2
Porc	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Bovin	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Caprins/Ovins	-	-	-	-	-	2	3	3	-	2
Autres	1		2		-	-	-	2	-	-
H	12	2	2	2	0	3	2	4	10	3
Viandes de volaille	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1
Viandes de porc	10	2	-	1	-	-	1	-	-	-
Produits de charcuterie	-	-	-	-	-	-	-	1	6	-
Viandes ovin caprin	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Viandes de bovin	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Produits laitiers	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-
Autres (plats cuisinés, Aa)	2	-	-	1	-	1	-	2	3	1
E	1	0	0	3	4	3	3	1	0	0
Total	17	3	5	7	8	20	10	24	12	7

4 Disponibilité des méthodes analytiques

La DGAL a exprimé, dans la saisine, le besoin de dresser le bilan des méthodes disponibles pour détecter et caractériser les salmonelles, isolées en hygiène des aliments ou en santé et production animales. L'objectif final poursuivi dans le cadre de cette réflexion, est d'évaluer la faisabilité analytique de distinguer les « vrais variants » et « faux variants », tels que définis au chapitre 2 de ce présent rapport.

La DGAL précise également, dans sa demande, avoir connaissance que certains laboratoires, travaillant à petite échelle, éprouveraient des difficultés dans la mise en évidence des deux variants monophasiques, mobiles, à partir de la méthode NF EN ISO 6579/A1.

4.1 Concernant la détection de ces variants

4.1.1 Etat des lieux des méthodes officielles

4.1.1.1 Qu'est ce qu'une méthode officielle ?

Une méthode officielle est une méthode prescrite par les services de l'Etat, dont la DGAL (ou par un texte réglementaire européen), pour effectuer les analyses de contrôle officiel (RÈGLEMENT (CE) No 882/2004, article 11). La DGAL a défini deux types de méthodes d'analyse qui peuvent être utilisés pour les contrôles microbiologiques officiels et d'autocontrôle des aliments (cf. Note de Service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14/01/2008, modifiée par la NS DGAL/SDSSA/N2010-8245 du 23/08/2010, paragraphe 4.1) :

- des méthodes normalisées par l'ISO, le CEN, ou l'AFNOR le cas échéant,
- des méthodes alternatives validées conformément au protocole défini dans la norme NF EN ISO 16140.

Plus précisément, cette Note de Service indique que :

*« Les **méthodes d'analyse de référence** sont précisées en annexe I du règlement (CE) n°2073/2005, pour chaque analyte objet d'un critère microbiologique. Il est néanmoins prévu une certaine flexibilité, précisée dans l'article 5, point 5 (cf. annexe II). Le recours à d'autres méthodes d'analyse est autorisé lorsque les méthodes sont validées **par rapport à la méthode de référence** définie à l'annexe I du règlement, et, dans le cas de méthodes commercialisées, si elles sont **certifiées par une tierce partie, conformément au protocole défini dans la norme EN/ISO 16140** ou à d'autres protocoles analogues reconnus au niveau international.*

*Pour les **méthodes alternatives commerciales**, la certification délivrée par AFNOR Certification sous la marque « AFNOR Validation » satisfait aux exigences de l'article 5 du règlement (CE) n°2073/2005, dans la mesure où la validation est réalisée par rapport à la méthode de référence NF/EN/ISO, **sans aucune restriction**. Il convient en effet d'être vigilant sur l'existence d'éventuelles restrictions d'emploi, précisées sur l'attestation de validation AFNOR correspondante. Ce cas concerne en particulier la non-détection des salmonelles immobiles lorsque le principe de la méthode alternative est fondé sur la mobilité des souches, alors que la méthode de référence NF EN ISO 6579 détecte à la fois les souches mobiles et immobiles. Le choix d'une telle méthode pour les analyses d'autocontrôle reste sous la responsabilité du professionnel mais sort du cadre d'application du règlement 2073/2005. La liste des méthodes certifiées AFNOR Validation est régulièrement mise à jour.*

Des méthodes validées par d'autres organismes, européens ou internationaux, peuvent également être conformes aux exigences réglementaires. Il convient cependant que l'exploitant s'assure que ces méthodes ont été validées par rapport aux méthodes de référence citées en annexe I du règlement (CE) n°2073/2005, et qu'elles ont été certifiées par une tierce partie conformément au protocole défini dans la norme NF EN ISO 16140. »

Pour les analyses des échantillons prélevés en productions primaires, les arrêtés ministériels fixent la méthode officielle (norme NF U 47-100) avec le cas particulier des troupeaux de poulets de chair (étage production de la filière Chair) et de dindes d'engraissement (étage production de la filière Chair). Dans ces cas, la norme NF EN ISO 6579/A1 (annexe D) ou le protocole modifié de la norme NF U 47-100 (enrichissement avec un seul milieu d'enrichissement, le MSRV) peuvent être choisis.

4.1.1.2 Liste des méthodes alternatives validées NF pour la détection des *Salmonella*

Le tableau 32 liste l'ensemble des méthodes alternatives validées et certifiées par Afnor Certification, à la date du 4 décembre 2012.

A ce jour, seules les méthodes « Simple Method for *Salmonella* (SMS) », « Oxoid *Salmonella* rapid test (OSRT) » et « SESAME *Salmonella* Test » prévoient une restriction de leur domaine d'application, excluant la détection des variants immobiles S.I 1,4,[5],12:-:-.

Depuis le mois de juillet 2011, toutes les méthodes qui font l'objet d'une étude de spécificité pour validation, extension ou reconduction dans leur domaine d'application, sont testées vis-à-vis des variants du sérovar Typhimurium.

Tableau 32 : Liste des kits rapides d'analyse validés par Afnor Certification (NF Validation) pour la détection des *Salmonella* [tableau établi à partir de l'information disponible sur le site <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-methodes-validees/salmonella.html> consulté le 10 déc. 2012, mise à jour du 4 décembre 2012] [MC : Milieu de culture ; TI : Tests immunologiques ; TIE : Tests immuno-enzymatiques ; THM : Tests d'hybridation moléculaire ; Ah+Aa : tous produits d'alimentation humaine et animale ; All : tous produits d'alimentation humaine et animale et prélèvements d'environnement de production].

Kits	Type de méthode	Titulaire NF Validation	Domaine d'application	Date de validation/extension /reconduction	Variants inclus dans l'étude de spécificité (O/N)	Restriction recherche immobiles indiquée (O/N)	Utilise le milieu MSR/V (O/N)
HQS <i>Salmonella</i>	PCR	ADNucleis	Ah (hors lait cru) + protocole spécifique laits crus	02.04.2010	N	N	N
Simple Method for <i>Salmonella</i> (SMS)	MC	AES Chemunex	All - sauf environnement de production primaire	22.03.2012	O	O	N
ADIAFOOD <i>Salmonella</i>	PCR	AES Chemunex	All - sauf environnement de production primaire	12.05.2011	N	N	N
IBISA	MC	AES Chemunex	All - sauf environnement de production primaire	01.07.2011	O	N	N
TAQMAN <i>Salmonella</i>	PCR	Applied Biosystems S.A.	AH+Aa	01.07.2011	O	N	N
MicroSEQ <i>Salmonella spp</i>	PCR	Applied Biosystems S.A.	All – dont mat. fécales et envt prod I	11.05.2012	O	N	N
Transia Plate <i>Salmonella</i> Gold	TIE	BioControl Systems	All - sauf environnement de production primaire	29.11.2012	O	N	N
TAG 24 <i>Salmonella</i>	TIE	BioControl Systems	Ah+Aa	01.12.2011	O	N	N
Assurance GDS <i>Salmonella</i>	PCR	BioControl Systems	All - sauf environnement de production primaire	29.11.2012	O	N	N
VIDAS <i>Salmonella</i> Xpress	TIE	BIOMERIEUX	Viandes crues de bœuf	30.06.2011	N	N	N

			et de veau et ovoproduits				
Vidas <i>Salmonella</i> double voie	TIE	BIOMERIEUX	Ah+Aa (animaux de compagnie)	30.06.2011	N	N	N
Vidas <i>Salmonella</i> simple voie	TIE	BIOMERIEUX	Ah+Aa (animaux de compagnie)	30.06.2011	N	N	N
Vidas ICS2-SLM	TIE	BIOMERIEUX	Ah (hors lait cru) + Aa (animaux de compagnie)	30.06.2011	N	N	N
Vidas ICS2-Boîte	TIE	BIOMERIEUX	Ah (hors lait cru) + Aa	12.05.2011	N	N	N
Vidas Easy <i>Salmonella</i>	TIE	BIOMERIEUX	All - sauf environnement de production primaire	30.06.2011	N	N	N
VIDAS Up <i>Salmonella</i>	TIE	BIOMERIEUX	All – dont mat. fécales et envt prod I	06.07.2012	O	N	N
Rapid <i>Salmonella</i>	MC	BIO-RAD	All - sauf environnement de production primaire	04.10.2012	O	N	N
IQ-Check <i>Salmonella</i> II	PCR	BIO-RAD	All – dont mat. fécales et envt prod I	10.05.2012	O	N	N
Lumiprobe 24 <i>Salmonella</i>	THM	EUROPROBE SA	AH+Aa	29.11.2012	O	N	N
GeneDisc <i>Salmonella</i> spp	PCR	Pall GeneDisc Technologies	Viandes, produits laitiers et végétaux	29.11.2012	O	N	N
Reveal <i>Salmonella</i> 2.0	TI	NEOGEN Europe, Ltd	AH+Aa	07.10.2011	O	N	N
Oxoid <i>Salmonella</i> rapid test (OSRT)	TI	OXOID Thermofisher Scientific	All - sauf environnement de production primaire	01.07.2011	O	O	N
<i>Salmonella</i> PRECIS	MC	OXOID Thermofisher Scientific	All - sauf environnement de production primaire	06.10.2011	O	N	N
Systeme BAX <i>Salmonella</i> automatisé	PCR	DuPont Qualicon	All - sauf environnement de production primaire	24.09.2010	N	N	N

RAYAL <i>Salmonella</i> OPTIMA	TIE	RAYAL	All - sauf environnement d'élevage	05.07.2012	O	N	N
RIDASCREEN® <i>Salmonella</i>	TIE	R-Biopharm	All - sauf environnement de production primaire	11.05.2012	O	N	N
RapidChek SELECT <i>Salmonella</i>	TI	SDIX	All - sauf environnement de production primaire	02.04.2010	N	N	N
IRIS <i>Salmonella</i>	MC	SOLABIA S.A.S.	All - sauf environnement de production primaire	07.10.2011	O	N	N
SESAME <i>Salmonella</i> Test	MC	SOLABIA S.A.S.	All - sauf environnement de production primaire	07.10.2011	O	O	O
Tecra Unique <i>Salmonella</i>	TIE	TECRA INTERNATIONAL Pty Ltd	AH+Aa	10.05.2012	O	N	N

4.1.2 Retour d'expérience du terrain concernant la détection des variants

4.1.2.1 Retour d'expérience du LNR

Des tests de performance réalisés au LNR en novembre 2011, selon un protocole modifié de la norme NF EN ISO 6579/A1, montrent que le variant monophasique de *Typhimurium* S.I 1,4,[5],12:i:- présente une culture et une migration sur la gélose MSR/V identique aux souches de formule antigénique complète avec les deux phases flagellaires quand l'inoculum déposé est de 30 *Salmonella* ou moins (avec les 4 dilutions au 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16^{ème}). Il est important, lors de la préparation de la gélose MSR/V, de ne pas prolonger le chauffage au delà du temps strictement nécessaire, car ce milieu est sensible au surchauffage. De précédents résultats d'EILA, organisé par le LNR avec le réseau de laboratoire d'analyse vétérinaire en santé et production animales, avaient montré des différences entre les milieux MSR/V et MKTTn. Après analyse des résultats non satisfaisants, il s'est avéré que les différences provenaient d'une mauvaise préparation des milieux MSR/V.

4.1.2.2 Questionnaire du LNR adressé aux réseaux de laboratoires agréés et aux laboratoires reconnus

Un questionnaire a été rédigé par le LNR (Annexe 2) et diffusé le 10 décembre 2012, à destination des réseaux de laboratoires officiels de Santé Animale et d'Hygiène des aliments. Ce sondage a pour objectif de faire le bilan des méthodes utilisées par les laboratoires agréés (A) et de faire l'état des lieux des éventuelles difficultés rencontrées pour la détection des variants immobiles et monophasiques. Les réponses seront anonymisées par le LNR.

Les réponses des laboratoires sollicités sont attendues pour le 14 janvier 2013. Les informations collectées dans le cadre de ce sondage seront transmises à la Direction d'évaluation des risques de l'Anses dans les meilleurs délais et si possible avant fin janvier.

4.1.2.3 Etude du SCL de Rennes

Il existe, à ce jour, très peu de données sur les performances des méthodes utilisées pour détecter les souches monophasiques ou immobiles de *Salmonella*. Une étude comparative de quatre kits rapides d'analyse, validés NF Validation, a été réalisée au laboratoire SCL de Rennes afin d'évaluer leur performances pour détecter les souches variants monophasiques et immobiles du sérovar *Salmonella* Typhimurium dans les matrices alimentaires humaine et animale (travaux non publiés de Bescond Marilyn - Jardy Nelly - Taco Ingrid, SCL Rennes). Différentes matrices alimentaires humaines (bouchée à la reine, camembert, saucisse, pâté, saumon, aiguillette de canard, poulet) et animales (tourteaux de soja et colza, aliment complet pour poules pondeuses, aliment pour poulets) ont été testées.

Les quatre méthodes microbiologiques testées ont été certifiées NF Validation selon le protocole décrit dans la norme NF EN ISO 16140, il s'agit de :

1. *Sésame Salmonella test*[®] : BOKAR – Bouillon Sésame *Salmonella* Enrichissement - gélose Sésame *Salmonella* Détection ;

2. *S.M.STM* : AES – EPT classique - gélose semi-solide *S.M.STM* ;
3. *Salmonella PreciSTM* : OXOID - Bouillon ONE BROTH - gélose Brillance TM ;
4. Rapid *Salmonella* : BIORAD - Eau peptonée tamponnée supplémentée Rapid *Salmonella* - milieu chromogénique Rapid *Salmonella*.

Le principe de détection des méthodes 1 et 2 est basé sur la mobilité des *Salmonella* (avec en plus la décarboxylation de la lysine pour la méthode 2). Le principe des méthodes 3 et 4 est basé sur l'expression de réactions enzymatiques (C8 estérase et glucosidases). Les *Salmonella* se présentent de manière caractéristique sur chaque milieu gélosé (Figure 2).



BLOKAR Sesame
Salmonella test[®]



AES gélose semi-
solide *S.M.S. TM*



OXOID gélose
Brillance TM



BIORAD : Rapid
Salmonella

Figure 2 : Illustration de l'apparence caractéristique de quatre milieux gélosés, utilisés pour la détection de *Salmonella*.

Onze souches de *Salmonella* ont été utilisées pour réaliser les différents tests (tableau 33).

Tableau 33 : Souches de *Salmonella* utilisées par le SCL de Rennes pour comparer les performances de quatre méthodes de détection, certifiées NF Validation.

Type de <i>Salmonella</i>	Formule antigénique	origine
Souches immobiles	S.I 6,7:-:-	Tourteau de soja (SCL, 1996)
	S.I 9,12:-:-	Moka (SCL,1999)
	S.I 4,5,12:- :-	Aliment pour poules pondeuses (transmise par l'ANSES en 2009)
	S.I 4,5,12:- :-	Tiramisu (transmise par l'ANSES en 2009)
Souches monophasiques	S.I 4,12:i:-	Salade composée avec museau (SCL, 2001)
	S. Dublin (S 1,9,12,[Vi]:g,p:-)	? (transmise par le LDA35)
	S.I 4,12:i :-	Émincé de poulets aux amandes (transmise par l'ANSES en 2009)
	S.I 4,12:i:-	Canapé frais (transmise par l'ANSES en 2009)
Souche Autoagglutinable	/	Tourteau de tournesol (SCL, 2003)
Souches témoins	S. Typhimurium (S.I 1,4,[5],12:i:1,2)	sauté de dindes (SCL, 1990)
Souches témoins	S. Salford (S.I 16:l,v:e,n,x)	EIL QM (2008)

Pour chaque souche testée, trois types d'essais ont été pratiqués : en cultures pures, en bouillons d'enrichissement contaminés et en contamination artificielle. C'est ainsi que onze échantillons d'alimentation humaine et onze échantillons d'alimentation animale ont été artificiellement contaminés à un niveau suffisamment important pour pouvoir comparer l'exactitude des résultats.

Les résultats obtenus lors des trois phases d'essais sont identiques quelque soit la souche testée. Douze échantillons artificiellement contaminés sur 22 ont montré une concordance totale entre les quatre méthodes. Pour les résultats discordants sur les quatre méthodes :

- quelque soit la matrice et le type d'essai, les quatre souches immobiles n'ont pas été détectées, ni par la méthode S.M.S™, ni par la méthode Sésame *Salmonella* Test®, méthodes utilisant la mobilité comme principe de caractérisation.

- trois des quatre sérovars monophasiques ont été détectés par les quatre méthodes. La souche non détectée est *Salmonella* Dublin ; celle-ci est apparue comme non caractéristique sur gélose Brillance™ (couleur mauve très clair) et sur Rapid *Salmonella* (couleur marron et/ou violacée pâle). La non détection de cette souche de S. Dublin (1,9,12,[Vi]:g,p:-) est due à une activité estérasique faible, qui, par conséquent, peut être difficilement détectée sur des milieux chromogéniques basées sur cette activité enzymatique, donnant alors une coloration plus pâle voire incolore des colonies. Lors d'essais complémentaires sur cinq souches de S. Dublin testées (transmises par l'ADRIA), deux de ces souches se sont révélées caractéristiques et trois, non caractéristiques. Ces trois souches n'auraient pas été sélectionnées pour confirmation en routine. Ce sérovar est plus spécifiquement retrouvé dans les produits laitiers.

En conclusion, les quatre méthodes testées ont présenté des performances identiques pour la détection des trois souches variants monophasiques du sérovar Typhimurium et ont détecté ces variants de la même façon que les souches témoins ; les deux méthodes basées sur la mobilité n'ont pas permis la détection des 4 souches immobiles (dont les variants du sérovar Typhimurium).

4.1.2.1 Groupes de travail du LR-UE *Salmonella*

Le 19 et 20 mai 2011, le Laboratoire de référence européen pour *Salmonella*, a organisé son atelier de travail annuel à Zandvoort (Pays-Bas). Sur deux jours, les représentants des Laboratoires nationaux de référence pour *Salmonella* (NRLs-*Salmonella*) étaient présents ainsi que des représentants de la commission européenne, de la DGSanco (Directorate-General for Health and Consumer Protection) et de l'EFSA (European Food Safety Authority) [EURL-*Salmonella*, 2011].

A l'occasion de cette rencontre, l'avis de l'EFSA [EFSA, 2010] a été présenté. Comme le mentionne cet avis, l'amendement de la norme NF EN ISO 6579/A1 permet d'isoler le variant monophasique : *“With regard to the analytical methods currently used and their appropriateness for identifying these strains, the current standard methods (ISO 6579 and Annex D of ISO 6579) were considered suitable for isolation of monophasic Salmonella Typhimurium strains. Moreover, for identification of the monophasic S.I 1,4,[5],12:i:- variant, it is advisable to proceed with serotyping until a first negative result of agglutination after flagellar phase inversion, and then apply a PCR protocol in order to confirm the lack of the second phase antigen.”*

Par ailleurs, la question du référentiel à utiliser pour la validation de méthode alternative à la méthode conventionnelle de sérotypage a été abordée. Il est envisagé par le groupe ad hoc que soit défini une méthode de référence pour le sérotypage basée sur la méthode « classique » (White-Kauffmann-Le Minor scheme), à partir de laquelle les méthodes alternatives devraient être validées. A ce jour, il n'existe donc pas de protocole pour la validation d'une méthode de confirmation ou de caractérisation, s'appuyant sur la norme NF EN ISO 16140.

4.2 Concernant la caractérisation de ces variants

Après détection et identification, par sérotypage conventionnel, d'une souche susceptible de correspondre à un variant monophasique (S.I 1,4,[5],12:i:-) de *Salmonella* Typhimurium, une confirmation moléculaire fondée au minimum sur la détection de la région intergénique *fliA-fliB* et du gène *fljB* est recommandée par l'EFSA. Ce contrôle doit permettre :

- de différencier les variants monophasiques du sérovar Typhimurium des variants correspondant à d'autres sérovares ;
- de confirmer l'absence du gène *fljB* dans le génome de la bactérie et d'exclure ainsi l'hypothèse d'une simple perte d'expression de ce gène codant pour la seconde phase flagellaire et persistant dans le génome, i.e variant monophasique de Typhimurium dit « incohérent » [EFSA, 2010].

Sur la base de ces recommandations et de travaux de recherche menés au laboratoire de l'Anses – site de Maisons-Alfort, dans le cadre de la thèse de Marie Bugarel, une méthode interne a été développée et est actuellement appliquée.

4.2.1 Méthode mise en œuvre par le LNR associé

La méthode interne mise en œuvre par le LNR associé pour la confirmation des variants du sérovar Typhimurium s'appuie d'une part, sur le document EFSA [EFSA, 2010] qui concerne uniquement la confirmation du variant émergent monophasique et d'autre part, sur l'article de Bugarel et *al.* concernant des travaux effectués dans l'unité CEB [Bugarel, 2012b]. Par ailleurs, la réglementation française concerne l'ensemble des variants monophasiques et immobiles, par conséquent des marqueurs supplémentaires ont été ajoutés dans cette méthode interne pour couvrir l'ensemble de ces variants.

La méthode interne (n°CEB21), intitulée « *Identification par PCR des variants monophasiques et immobiles de Salmonella sérovar Typhimurium selon les recommandations de l'EFSA (European Food Safety Authority)* », est basée sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Après détection par sérotypage conventionnel d'une souche présentant une des formules antigéniques suivantes, S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-, quatre gènes sont recherchés en utilisant deux PCR multiplexes. La première PCR cible le gène *fljB* ainsi que la région intergénique *fliA-fliB*. La seconde PCR cible le gène *mdh* marqueur du sérovar Typhimurium ainsi que le gène *fliC*. Les séquences des amorces utilisées pour la recherche de ces marqueurs sont listées dans le tableau 34.

Les souches utilisées comme témoin de l'expérience sont d'une part, la souche de référence *Salmonella* Typhimurium LT2 (témoin positif) et d'autre part, une souche de *Salmonella* Brandenburg (souche terrain et témoin négatif). Un témoin négatif par absence d'ADN est également réalisé à chaque expérience (tableau 35).

Tableau 34 : Séquences des amorces PCR utilisées pour la méthode interne du LNR (n°CEB21).

Gènes Ciblés	Nom des Amorces	Séquences (5'-3')	Références
<i>mdh</i>	MDH F	TGCCAACGGAAGTTGAAGTG	[Amavisit, 2005]
	MDH R	CGCATTCCACCACGCCCTTC	
<i>fliC</i>	Anti-sens-i	ATAGCCATCTTTACCAGTTCC	[Herrera-Leon, 2004]
	Sens-60	GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG	
<i>fliB</i>	Sens59	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG	[EFSA, 2010]
	Anti-sens-83	GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG	
<i>fliA-fliB</i>	FFLIB	CTGGCGACGATCTGTGCGATG	[EFSA, 2010]
	RFLIA	GCGGTATACAGTGAATTCAC	

Tableau 35 : Témoins PCR utilisés pour la méthode interne du LNR (n°CEB21).

Témoins	Marqueurs ciblés			
	Taille de l'amplicon attendu (en pb)			
	<i>mdh</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliC</i>	<i>fliB</i>
S. Typhimurium LT2	261	≈ 1000	≈ 600	1389
S. Brandenburg	0	≈250	0	0
Témoin négatif	0	0	0	0

Concernant l'interprétation des résultats (tableau 36) :

- si les amplicons correspondant au gène *mdh* et à la région intergénique *fliA-fliB* sont détectés, alors la souche analysée est confirmée comme étant un variant monophasique du sérovar Typhimurium ;
- si les amplicons correspondant au gène *mdh* et à la région intergénique *fliA-fliB* sont absents, alors la souche est confirmée comme étant un variant d'un sérovar autre que Typhimurium ;
- si les amplicons correspondant aux gènes *fliC* et/ou *fliB* sont absents, la souche est considérée comme étant un variant monophasique (absence d'un des 2 gènes codant pour les phases flagellaires), ou bien un variant immobile (absence des 2 gènes codant pour les phases flagellaires) ;
- si les deux gènes codant pour les phases flagellaires (*fliC* et *fliB*) sont présents mais non exprimés (non détection des antigènes par la méthode conventionnelle de sérotypage par agglutination), on parle de variant « incohérent » (dit « inconsistant » en anglais).

L'annexe 3 présente des résultats d'amplification par PCR par la méthode interne n°CEB21 du LNR pour la confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium.

Tableau 36 : Interprétations des résultats obtenus par la méthode interne du LNR (n°CEB21) [+ : détection de l'amplicon spécifique du marqueur présentant la taille attendue ; - : absence de détection de l'amplicon spécifique du marqueur ; pb : paires de bases d'ADN]

Sérovar par agglutination	Marqueurs ciblés				Interprétation
	<i>fliC</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliJ</i>	<i>mdh</i>	
S.I 1,4,[5],12:i:-	+	1000 pb	-	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit "incohérent"
	+	250 pb	-	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S.I 1,4,[5],12:-:1,2	-	1000 pb	+	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit "incohérent"
	-	250 pb	+	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S.I 1,4,[5],12:-:-	-	1000 pb	-	+	Variant immobile de Typhimurium
	+	1000 pb	+	+	Variant immobile de Typhimurium dit "incohérent"
	-	250 pb	-	-	Variant immobile d'un autre sérovar que Typhimurium
S.I 1,4,[5],12:i:1,2	+	1000 pb	+	+	Typhimurium

4.2.2 Reconnaissance officielle de la méthode interne

Le principe de la méthode interne repose sur la PCR, la validation de celle-ci doit donc s'inscrire dans une démarche générale en cohérence avec :

- dans le domaine de l'hygiène des aliments, les exigences de la norme NF EN ISO 16140 complétées par celles de la norme NF EN ISO 22118 intitulée « *Microbiologie des aliments -- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection et la quantification des micro-organismes pathogènes dans les aliments -- Caractéristiques de performance* » (paragraphe 4.4) ;

- dans le domaine de la santé animale et de l'élevage, les critères des normes XP U47-600-1 et U47-600-2 de juin 2011, intitulées respectivement « *méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 1 exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale* » et « *méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) – Partie 2 exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale* ».

La méthode interne du LNR (n°CEB21) est une méthode qualitative (absence / présence de l'amplicon de taille attendue) de type méthode PCR en multiplex pour génotypage tel que décrit dans le chapitre 8 de la norme U47-600-2. Cette norme ainsi que la norme NF EN ISO 22118, stipulent que la validation d'une telle méthode nécessite la réalisation de tests d'inclusivité et d'exclusivité.

Ces termes se définissent ainsi :

- Inclusivité : capacité de la méthode alternative à détecter l'analyte cible à partir d'un large éventail de souches ;
L'inclusivité de la méthode doit être évaluée à partir d'un panel de souches de salmonelles aussi représentatif que possible de la diversité génétique existant au sein du genre *Salmonella*.
- Exclusivité : absence d'interférences par un éventail approprié de souches non cibles de la méthode alternative ;

Les mesures de l'inclusivité et de l'exclusivité de la méthode sont réalisées en analysant au moins 50 souches pures du micro-organisme cible et 30 souches pures du microorganisme non cible connues pour être interférentes avec les souches cibles (pouvant donner des résultats faussement positifs). Chaque analyse est réalisée sur souche pure en réalisant le protocole complet de la méthode.

4.2.3 Résultats et performances de la méthode interne

Les travaux menés par Bugarel et collaborateurs [Bugarel, 2012b] ont permis de tester trois marqueurs différents connus pour être spécifiques du sérovar Typhimurium, il s'agit de la séquence intergénique *fliA-fliB* proposée dans les recommandations de l'EFSA, du gène *mdh* et de la séquence STM2757.

Deux cent cinquante six souches de terrain de sérovar Typhimurium (N=124), variants monophasiques S.I 1,4,[5],12:i:- (N=90), variants monophasiques S.I 1,4,[5],12:-:1,2 (N=25) et immobiles (S.I 1,4,[5],12:-:-) (N=17) ont été testées pour ces 3 marqueurs. D'autre part, la souche de référence LT2 de sérovar Typhimurium ainsi qu'une souche respectivement des sérovares Farsta, Gloucester et Lagos de formules antigéniques proches ont également été testées. Les 3 marqueurs ciblés n'ont pas été détectés dans ces 3 derniers sérovares.

La région intergénique *fliA-fliB* correspondant à un amplicon de 1000 pb pour le sérovar Typhimurium a été détectée parmi toutes les souches testées de sérovar Typhimurium ou variants excepté pour une souche de sérovar Typhimurium. Le marqueur *mdh* a été détecté systématiquement parmi toutes les souches testées de sérovar Typhimurium et variants. La séquence STM2757 a été détectée pour toutes les souches de sérovar Typhimurium et toutes les souches immobiles, mais elle n'a été retrouvée que dans 92% des souches S.I 1,4,[5],12:i:- et dans 92% des souches S.I 1,4,[5],12:-:1,2. Parmi les sept souches S.I 1,4,[5],12:i:-, pour lesquelles le marqueur STM2757 n'a pas été détecté, six d'entre elles provenaient de produits de porcs et une de la filière volailles. Les deux souches S.I 1,4,[5],12:-:1,2, négatives pour STM2757, avaient été isolées d'effluents.

Au final, le seul marqueur détecté systématiquement dans toutes les souches de sérovar Typhimurium et variants, a été le gène *mdh* alors que les taux de détection étaient de 96,5% et de 99,6% respectivement pour les deux autres marqueurs (STM2757 et *fliA-fliB*). Le marqueur *mdh* a donc été considéré comme le plus performant en termes de spécificité intrinsèque. Ce même marqueur, réputé pour être présent dans de nombreuses souches de *Salmonella*, a également été recherché parmi une collection de 937 souches de sérovares variés (plus de 230 sérovares différents) permettant ainsi de mesurer sa spécificité extrinsèque ; aucune réaction croisée n'a été détectée hormis pour une souche de sérovar Kibusi (S.I 28:r:e,n,x) et une autre de sérovar Newmexico (S.I 9,12:g,z₅₁:1,5). Ces deux sérovares n'appartiennent pas au groupe O:4 dans lequel se trouve Typhimurium et ses variants.

Concernant sa praticabilité, cette méthode requiert idéalement une organisation classique des locaux pour la réalisation de PCR conventionnelles c'est-à-dire permettant de séparer les étapes critiques du protocole (extraction, préparation de la PCR, amplification et dépôts sur gel d'agarose). L'opérateur devra être formé aux techniques PCR. Les points critiques de la méthode

interne sont d'une part, la préparation des réactifs et du mix PCR en utilisant les amorces indiquées aux concentrations définies dans le mode opératoire (MO) du LNR et d'autre part, l'amplification des ADN cibles en respectant les cycles également définis dans ce MO.

Le protocole se déroule au LNR Associé sur 24 heures, depuis la prise de la colonie caractéristique isolée sur un milieu gélosé pour l'extraction d'ADN (J0), jusqu'à l'interprétation du résultat le lendemain après migration sur gel des amplicons et révélation au BET (J1). Concernant la flexibilité de la technique, le LNR Associé peut réaliser par jour un à deux panels de 15 souches, si l'on considère également la gestion de la mise en collection de ces souches.

4.2.4 Autres méthodes

D'autres méthodes que la méthode interne n°CEB21 du LNR existent ou sont en développement et peuvent être mise en œuvre en complément du sérotypage conventionnel des souches de *Salmonella* pour déterminer l'appartenance ou non au sérovar Typhimurium de souches de formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-.

- méthode PCR en temps réel

Une méthode PCR en temps réel basée sur la détermination de la séquence intergénique *fliA-fliB* a été développée au laboratoire départemental de la Sarthe en collaboration avec l'université du Maine et est en cours d'évaluation [Lebrun et al., 2012]. La séquence cible se trouve dans une zone spécifique du génome, qui a été définie après alignement de différentes séquences de souches de sérovar Typhimurium. Les amorces et sondes ont été définies en fonction de cette séquence cible. La méthode a été optimisée pour éviter l'obtention de signaux tardifs d'amplification et la calibration de la suspension bactérienne testée permet de standardiser le signal attendu. L'observation d'une amplification va conforter le laboratoire dans son identification présomptive d'un variant du sérovar Typhimurium. Un résultat négatif avec cette méthode n'entraîne pas de conséquence autre que de laisser le laboratoire dans l'incertitude sur le sérovar de la souche testée.

- méthode Check&Trace *Salmonella* (CheckPoint)

Il existe une méthode alternative commerciale de sérotypage moléculaire des *Salmonella* capable de distinguer les isolats variants monophasiques S.I 1,4,[5],12:i:- confirmés du sérovar Typhimurium (« vrai variant », *fliB* négatif) des variants monophasiques dits incohérents, présentant la même formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:- mais possédant le gène *fliB*. Les performances de cette méthode, dénommée initialement Premi®Test *Salmonella* (DSM) puis Check&Trace *Salmonella* (Check-Points) ont été évaluées dans l'unité CEB globalement, pour le sérotypage moléculaire [Brisabois, 2010 ; Wattiau et al., 2008a, 2008b ; OIE, 2011].

Le principe de la méthode est basé sur une amplification de l'ADN cible de *Salmonella* en trois étapes selon la technique LDR (Ligation-Détection-Réaction). Les fragments amplifiés ainsi générés sont ensuite détectés sur un format de biopuce fixée sur un support qui est un tube (AT ou array tube) sur lequel vont se fixer les fragments, par simple hybridation. L'hybridation entre l'amplicon et les sondes greffées sur le support biopuce correspond à la présence d'un marqueur spécifique. La détermination d'un sérovar est basée sur la présence ou l'absence des différents marqueurs présents sur la biopuce. Cette combinaison de marqueurs aboutit finalement à un code « génovar », lui-même associé dans une base de données à un nom de sérovar. Cette base de données permet aujourd'hui l'identification d'environ une centaine de sérovares et s'enrichit progressivement. De plus, certains spots permettent de contrôler la qualité de l'amplification et de l'hybridation pour vérifier la qualité de chaque test.

A ce jour, il existe un code « génovar » précis permettant de reconnaître le « *vrai variant* » monophasique du sérovar Typhimurium (génovar 2717). Les variants monophasiques incohérents du sérovar Typhimurium sont identifiés comme appartenant au sérovar Typhimurium (génovar 10909). Les variants monophasiques dérivés d'un autre sérovar que Typhimurium seront identifiés soit par un code génovar permettant d'identifier le sérovar associé au variant, soit par un code génovar non répertorié actuellement dans la base de données. Dans ces deux derniers cas, la méthode de sérotypage moléculaire décrite ne permet pas d'identifier qu'il s'agit d'une formule antigénique de type variant monophasique car elle attribue directement un nom de sérovar.

Par rapport à la méthode de référence, la méthode Check&Trace *Salmonella* permet à la fois une simplification et une standardisation. Elle permet de s'affranchir de l'utilisation des sérums agglutinants de qualité parfois variable (et périssable), pour la détermination des sérovats ciblés. Elle apporte ainsi un gain de temps considérable dans le résultat avec une bonne fiabilité. En effet, la méthode conventionnelle de détermination complète et certaine de la formule antigénique nécessite de faire successivement trois essais d'inversion de phase (1 jour / test d'inversion) avant de rendre le résultat « absence d'expression de la phase flagellaire considérée ». La méthode Check&Trace *Salmonella*, quant à elle, donnera une réponse en un ou 2 jours maximum.

De plus, cette méthode a l'avantage d'identifier un résultat de génovar correspondant à un nom de sérovar pour les souches non agglutinables, dites « Rough ». Néanmoins, cette méthode ne permet pas, pour l'instant, la détection de tous les sérovats et le recours à la méthode classique d'agglutination est nécessaire pour les résultats rendus « *Salmonella* ». Les avantages que présente cette méthode en comparaison avec la méthode de référence (rapidité, objectivité du résultat, reproductibilité, coût) soulignent l'intérêt de compléter la base de données des génovars afin de la rendre définitivement intéressante à mettre en œuvre en première intention.

- Autres méthodes pour l'étude génomique des variants monophasiques et immobiles

Comme l'indique l'avis de l'Afssa de 2009, « *de nombreuses études de caractérisation génotypique des souches de sérotype S.I 1,4,[5],12:i:-, ont été réalisées, faisant appel à différentes techniques telles que l'électrophorèse en champ pulsé (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), le multilocus sequence typing (MLST), les puces à ADN et le séquençage. L'ensemble des résultats publiés montre très clairement que les souches de sérotype S.I 1,4,[5],12:i:- sont très fortement apparentées aux souches de sérotype Typhimurium ; [...]* ».

D'autres méthodes de caractérisation moléculaire, basées sur l'analyse partielle du génome des souches, telles que les méthodes « *Multilocus variable number tandem repeat analysis* » (MLVA) [Lindstedt *et al.*, 2004] et « *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* » (CRISPOL) [Fabre *et al.*, 2012] sont mises en œuvre par le CNR et le LNR pour la surveillance, l'étude de la diffusion clonale des variants de sérovar Typhimurium mais également dans le cadre d'investigations menées en situation d'alerte sanitaire. Ces méthodes permettent un sous-typage précis au sein de souches de même formule antigénique et par conséquent de différencier un clone épidémique des autres clones circulants. La sensibilité aux antibiotiques de ces isolats est également testée par ces deux laboratoires de référence.

De nombreuses études publiées caractérisent ce sérovar monophasique par PFGE, par lysotypie (phage-typing), par leur profil d'antibiorésistance ou encore leur profil MLVA [Hopkins *et al.*, 2010; Amavisit *et al.*, 2005; Dionisi *et al.*, 2009; Hauser *et al.*, 2010]. Ainsi, trois clones différents ont été récemment mis en évidence parmi les souches de sérovar S.I 1,4,[5],12:i:-. Ces clones ont émergé suite à des événements génétiques indépendants [Bugarel, 2012a]:

- un clone « espagnol », *fljB* négatif, dérivé d'un clone *S. Typhimurium* de lysotype U302, présentant un profil de résistance de type AM C S SSS SXT G TE ;
- un clone européen, associé au lysotype DT193 et présentant un profil de résistance de type AM S SSS TE ;
- un clone américain dit « sauvage », sensible aux antibiotiques.

Bugarel et collaborateurs [2012a] ont montré, en France, une prépondérance du clone espagnol parmi les souches d'origine non humaine collectées dans le cadre du réseau *Salmonella* entre 2001 et 2009. Ils ont également mis en évidence, dans une moindre mesure, la présence de variants « incohérents » S.I 1,4,[5],12:i:- avec un profil de résistance typique : AM S SSS TE.

Le LNR poursuit actuellement ses travaux de développement de méthode afin de disposer à court terme d'une méthode PCR complémentaire permettant de différencier également les variants sur la base de leur sensibilité aux antibiotiques et donc de distinguer les trois clones précités.

4.2.5 Résultats des travaux de confirmation des variants par le LNR

Comme le recommandait l'Afssa dans son avis du 16 octobre 2009, les isolats suspectés d'être des variants de formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:1,2, ont été largement adressés par les laboratoires agréés et reconnus, au LNR, pour caractérisation approfondie (confirmation de sérotypage conventionnel, recherche du gène *fljB*, PFGE, résistance aux antibiotiques, MLVA, etc.).

La méthode interne n°CEB21 pour la confirmation des variants du sérovar *Typhimurium* a été mise en œuvre par le LNR, en routine, à partir de l'année 2011 pour confirmer les souches collectées dans le cadre du réseau *Salmonella* qui présentaient les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:1,2 après sérotypage conventionnel.

Parmi les 689 souches S.I 1,4,[5],12:i:- collectées en 2011 et 2012, 649 souches (94,2%) étaient des variants confirmés du sérovar *Typhimurium* et 38 souches (5,5%) des variants incohérents. Seulement 2 souches soit 0,2% de ces souches étaient des variants d'un autre sérovar que *Typhimurium*.

Toutes les souches S.I 1,4,[5],12:-:1,2 collectées en 2011 et 2012 (n=8), étaient des variants du sérovar *Typhimurium* (confirmés ou incohérents). Par contre, cinq des 9 souches immobiles S.I 1,4,[5],12:-:1,2 collectées sur cette même période étaient des souches dérivées d'un autre sérovar que *Typhimurium*.

Cette méthode a également été utilisée pour caractériser les souches variants détectées lors des enquêtes communautaires et des plans de surveillance en filière avicole et porcine (n=15). Toutes ces souches se sont avérées être des variants confirmés du sérovar *Typhimurium* ou des variants incohérents.

Le tableau 35 présente les résultats obtenus sur un même panel de souches, par la méthode interne CEB N°21 et par la méthode Check&Trace *Salmonella*. Ces résultats montrent une concordance parfaite entre les deux méthodes. Par ailleurs, des résultats complémentaires sur une partie de ce panel de souche montrent également une concordance des résultats obtenus par la méthode interne avec ceux d'autres méthodes moléculaires (PFGE et MLVA) (données non présentées).

L'inclusivité de la méthode interne n° CEB21 peut être considérée satisfaisante. La méthode a également fait ses preuves du point de vue de la répétabilité et de la reproductibilité interne.

D'après les discussions qui ont eu lieu lors d'un précédent atelier de travail organisé par le LR-UE,

- "In UK the PCR was, for instance, used to show that a breeder layer flock was infected with an STM-like strain which was related to *Salmonella* Typhimurium. With this knowledge it was possible that the farmer obtained compensation for culling of the flock. [...] Of the monophasic *S. Typhimurium* strains which were tested, 99,5% were related to *Salmonella* Typhimurium. However, the PCR method may still be needed for legal purposes, as specific measures ;
- (Lisa Barco, NRL-Salmonella, Legnaro, Italy) [...] there is not a general agreement on how many times the phase inversion should be repeated in order to ensure that the strain is truly monophasic, and that the inability to detect phase-2 antigen was not due to low-level expression of the antigen. The entire procedure for the identification of monophasic isolated based on traditional serotyping takes many days, hampering the timely application of consumers' protection measures. Therefore, a method that combines traditional serotyping and a multiplex PCR has been proposed and it could represent an appealing alternative to identify these strains, since phase inversion to detect phase-2 flagellar antigen is not necessary at the genetic level. In the presentation this alternative method has been illustrated. The targets of the multiplex PCR have been considered, the protocol fully described, the tests performed and presented and the results discussed, paying particular attention to the cases where some discrepancies between the results of traditional serotyping and molecular analysis were evidenced. » [EURL-Salmonella, 2010]

Les résultats obtenus à partir des isolats français sont cohérents avec les observations rapportées par UK au LR-UE des *Salmonella*. La proportion de variants monophasiques confirmés comme dérivant du sérovar Typhimurium est très largement majoritaire.

Tableau 37 : Résultats obtenus par la méthode interne n°CEB21 et par la méthode Check&Trace *Salmonella*, en fonction de l'année, sur le panel de souches collectées par le réseau *Salmonella* au 18 décembre 2012 ou dans le cadre des enquêtes communautaires. [codes de la méthode Check&Trace *Salmonella* 2570 : non défini, 2717 : S.I 1,4,[5],12:i:-, 10909 : Typhimurium, 14622 : Coeln, 14909 : Schwarzengrund (S.I 1,4,12,27:d:1,7) ou Grumpensis (S.I 1,13,23:d:1,7)]

contexte	Sérotypage conventionnel	2005 (n=1) 2007 (n=7), 2010 (n=3)			2011			2012		
		Variant d'un autre sérovar	Variant incohérent	Variant confirmé de STM	Variant d'un autre sérovar	Variant incohérent	Variant confirmé de STM	Variant d'un autre sérovar	Variant incohérent	Variant confirmé de STM
Réseau <i>Salmonella</i>	S.I 1,4,12:i:-				2 2(2570)	7 2(10909)	71		15	84
	S.I 1,4,5,12:i:-					3 1(10909)	235 23 (2717)		13	259
	S.I 1,4,12:-:1,2					1 1(10909)			7	
	S.I 1,4,5,12:-:1,2									
	S.I 1,4,12:-:-				1 1(14909)	2 2(10909)	1	3 1 (14622)		
	S.I 1,4,5,12:-:-				1	1 1(10909)				
Enq. CE	S.I 1,4,12:i:-		1							1
	S.I 1,4,5,12:i:-			3						3
	S.I 1,4,12:-:1,2		7							
	S.I 1,4,5,12:-:1,2									
	S.I 1,4,12:-:-									
	S.I 1,4,5,12:-:-									

5 Conclusion

Le LNR dispose de plusieurs outils complémentaires permettant la confirmation des variants du sérovar *Typhimurium*, la différenciation des « vrais variants » et des variants « incohérents », la différenciation des clones européen, américain et espagnol au sein du panel de souches du variant monophasique S.I 1,4,[5],12:i:- émergent, ou encore permettant le sous-typage précis de clones circulants.

5.1 Concernant la synthèse des données issues de la surveillance

Un grand nombre d'élevages sont testés chaque année dans le cadre des plans de surveillance nationaux réalisés dans les filières avicole et porcine. Le nombre d'élevages dans lesquels *Salmonella* a pu être détecté demeure très faible et *a fortiori* pour les salmonelles dites variants monophasiques ou immobiles de *Typhimurium*.

Malgré la qualité des résultats de sérotypage collectés par le réseau *Salmonella*, une sous-estimation de la fréquence d'isolement des souches S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:- ne peut pas être totalement exclu du fait du statut de ces souches à être considérées comme des *S. Typhimurium* selon l'actuelle réglementation nationale.

L'analyse descriptive de l'ensemble des données collectées dans le cadre du réseau *Salmonella* révèle une augmentation relative du nombre de souches isolées de viandes de porc et produits laitiers dans le secteur de l'hygiène des aliments entre 2007 et 2011. Cette augmentation, plus marquée en 2010 et 2011, résulte vraisemblablement en partie de l'isolement accru de variants monophasiques S.I 1,4,[5],12:i:- du sérovar *Typhimurium*, suite à la survenue de foyers de cas humains de salmonelloses.

L'analyse des données détaillées concernant les souches S.I 1,4,[5],12:i:- montre une augmentation constante de ces variants monophasiques entre 2007 et 2011, en élevage de volaille. Elle révèle également une augmentation de ces souches dans la filière bovine en santé et production animales et en hygiène des aliments issus de la filière porcine.

Toutes origines confondues, l'effectif du nombre de souches collectées correspondant aux deux autres formules antigéniques, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:-, est si faible qu'il est possible de conclure à l'absence d'émergence de ces souches.

5.2 Concernant les performances des méthodes de détection des variants

Les expériences menées par le LNR, le SCL de Rennes et les conclusions émanant des ateliers de travail du LR-UE *Salmonella* de 2010 et 2011 rejoignent les conclusions figurant dans les récents avis des agences d'évaluation [EFSA, 2010 ; AFSSA, 2009] : les variants monophasiques sont détectables par les méthodes normalisées et les variants immobiles également, excepté par les méthodes basées sur la mobilité des souches. Les méthodes alternatives validées peuvent être utilisées à condition que l'étude de validation ait inclus les variants considérés.

5.3 Concernant la sous-estimation analytique éventuelle de certains variants

Comme le précisait déjà en 2009 l'avis de l'Afssa du 16 octobre, il est essentiel de distinguer les souches variants monophasiques ou immobiles présentant les formules antigéniques S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 et S.I 1,4,[5],12:-:- des souches de sérovar Typhimurium. Un sérotypage complet de ces souches, incluant l'étape d'inversion de phase, est donc demandé par la DGAL depuis le 4 mars 2010 dans la Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059.

Aujourd'hui une sous-estimation des souches de formule S.I 1,4,[5],12:i:- semble pouvoir exister même si la capacité des laboratoires agréés et reconnus à détecter ces variants, évaluer par EILA, est satisfaisante et que la performance des méthodes utilisées ne semble pas remise en cause en l'état actuel des connaissances. Cette sous-estimation s'avère difficile à estimer et une amélioration de la qualité des résultats rendus peut encore être obtenue en accentuant les efforts de communication sur l'intérêt de détailler la formule antigénique obtenue par sérotypage complet.

Au regard des données collectées par les enquêtes réalisées en élevages en utilisant la méthode de référence (LNR) qui permet de détecter toutes les souches de *Salmonella* spp., la fréquence d'isolement des souches de variants immobiles en filière *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo* est bien plus faible que celle des variants monophasiques. Cependant, il n'apparaît pas opportun de se restreindre uniquement aux méthodes permettant la détection des souches monophasiques en filière avicole, car même si la part des variants immobiles en clinique humaine semble faible, elle peut être sous estimée. Maintenir par des méthodes analytiques adaptées la détection des variants immobiles permet également de collecter des données de surveillance, démarche dont l'intérêt a été souligné en atelier de travail organisé par le LR-UE.

5.4 Concernant la disponibilité d'une méthode de caractérisation des variants S.I 1,4,[5],12:i:-, S.I 1,4,[5],12:-:1,2 ou S.I 1,4,[5],12:-:-, reconnue comme méthode officielle pour différencier les variants des différents sérovares

Une méthode a été développée par le LNR pour différencier les variants de sérovar Typhimurium (confirmés ou incohérents) des variants de sérovares autres que Typhimurium, dans le respect des recommandations émises par l'EFSA dans son avis du 16 octobre 2010.

A ce jour, il n'existe pas de protocole pour la validation d'une méthode de confirmation ou de caractérisation applicable dans le domaine de l'hygiène des aliments, s'appuyant sur la méthode NF EN ISO 16140 complétée pour les méthodes PCR par la norme NF EN ISO 22118. Concernant le domaine de la santé animale, la norme NF U47-600 décrit les exigences applicables à la validation d'une méthode PCR.

Les travaux menés par le LNR permettent aujourd'hui d'avoir des garanties suffisantes de performance de cette méthode interne, en termes d'inclusivité et d'exclusivité et au regard des résultats qui peuvent être obtenus par d'autres méthodes, testées en absence de méthode de référence. La corrélation des résultats obtenus en comparaison avec la méthode Check&Trace *Salmonella* et les autres données de caractérisation moléculaire (PFGE, MLVA, etc.) conforte sur les performances de la méthode interne du LNR.

Parmi les 689 souches collectées en 2011 et 2012 par le réseau *Salmonella* et présentant la formule antigénique S.I 1,4,[5],12:i:-, 99,8% de ces souches étaient des variants du sérovar Typhimurium (confirmés ou incohérents).

Toutes les souches S.I 1,4,[5],12:-:1,2 collectées en 2011 et 2012 (n=8), étaient des variants du sérovar Typhimurium (confirmés ou incohérents). Par contre, cinq des neuf souches immobiles

S.I 1,4,[5],12:-:- collectées sur cette même période étaient des souches dérivées d'un autre sérovar que Typhimurium.

Si le gestionnaire du risque estime nécessaire de caractériser systématiquement tous les isolats présentant une formule antigénique de type variant alors plusieurs méthodes pourront à terme permettre de le faire mais à ce jour, la méthode interne développée par le LNR est la méthode la plus complète pour répondre à l'objectif recherché, en l'état actuel des connaissances.

5.5 Concernant la mise en place de la méthode interne du LNR par les laboratoires agréés et reconnus

La praticabilité de cette méthode est propice à la mise en place rapide et aisée de la méthode au sein d'un laboratoire agréé ou reconnu, surtout si celui-ci pratique déjà des analyses par PCR conventionnelle. Cependant, quelque soit l'expérience du laboratoire, celui-ci devra avoir préalablement évalué la reproductibilité intra-laboratoire de la méthode avant de rendre des résultats officiels d'analyse.

Si cette méthode venait à être mise en œuvre dans les laboratoires agréés ou reconnus, le LNR pourrait également organiser un essai inter-laboratoires d'aptitude à la mise en œuvre de cette méthode. Des souches témoins pourraient également être fournies aux laboratoires agréés et reconnus pour faciliter le transfert de méthode du LNR vers ces laboratoires. Si besoin, des formations dispensées par le LNR pourraient être envisagées, à la charge des laboratoires agréés ou reconnus. Cependant, l'ensemble de ces interventions seront conditionnées à la disponibilité des ressources par le LNR.

Si le gestionnaire décide d'officialiser la méthode développée par le LNR et de demander sa mise en œuvre par les laboratoires agréés et reconnus, le LNR pourrait étudier la possibilité de réaliser durant la période transitoire l'ensemble des analyses nécessaires de confirmation des variants par PCR, sous réserve d'une prise en charge financière restant à discuter entre l'Anses et la DGAL, et de la disponibilité en ressources humaines du LNR.

Date de validation du rapport par les Directeurs des deux laboratoires : 14 Janvier 2013

6 Bibliographie

6.1 Publications

Afssa, Agence française de sécurité sanitaire des aliments, (2008). Contamination microbienne des préparations lactées en poudres destinées aux nourrissons et personnes âgées. Available online : <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Ra-PoudresLait.pdf>

Afssa, Agence française de sécurité sanitaire des aliments, (2009). Avis de la saisine n°2009-SA-0182, relatif à une demande d'avis sur deux projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus*. Available online : <http://www.anses.fr/Documents/SANT2009sa0182.pdf>

Amavisit P., Boonyawiwat W., Bangtrakulnont A. (2005). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 2736–2740.

Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail (2011). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments – *Salmonella* spp. <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Salmonellaspp.pdf>

Brisabois A. (2010). Interlaboratory study of a DNA Microarray for *Salmonella* Molecular Serotyping in comparison to the conventional serotyping method. i3S, International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, 28, 29 and 30th of June 2010, Saint-Malo – France.

Bugarel M., Granier S.A., Bonin E., Vignaud M.L., Roussel S., Fach P., Brisabois A. (2012a). Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. Food Research International. 2012. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.057.

Bugarel M., Vignaud M.L., Moury F., Fach P., Brisabois A. (2012b). Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology Open. doi:10.1002/mbo3.39. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.39/pdf>

Danan C., Fremy S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A. (2009). Détermination du sérovar de souches de *Salmonella* isolées dans le secteur vétérinaire par la méthode d'agglutination rapide sur lame. EuroReference, No.2, CR2-09M01. <http://www.afssa.fr/euroreference/Documents/CR2-Meth-SeroSalmo.pdf>

David J.M., Danan C., Chauvin C., Chazel M., Souillard R., Brisabois A., Weill F.X., Jourdan-DaSilva N., Picherot M., Guillemot D., Sanders P. (2011) Structure of the French farm-to-table surveillance system for *Salmonella*. Revue Med. Vet. 2011, 162, 10: 489-500.

Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. (2009) Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and Monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. Foodborne Pathog Dis. 2009;6(6):711-7.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA Journal 2012; 10(3):2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. Available online : www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. EFSA Journal 2010;8(10):1826. [48 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1826. Available online : www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm

Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, et al. (2012) CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. PLoS ONE 7(5): e36995. doi:10.1371/journal.pone.0036995

Grimont PAD, Weill FX. 2007. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. Centre collaborateur OMS de référence et de recherches sur les *Salmonella* - Schéma de White-Kauffmann-Le Minor. Institut Pasteur, Paris, France. Available online: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-08a>

Hauser E., Tietze E., Helmuth R., Junker E., Blank K., Prager R., Rabsch W., Appel B., Fruth A., Malorny B. (2010). Pork Contaminated with *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:-, an Emerging Health Risk for Humans. Applied and Environmental Microbiology, July 2010 :4601–4610.

Herrera-Leon S., McQuiston J.R., Usera M.A., Fields P.I., Garaizar J., Echeita M.A. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. J. Clin. Microbiol. 42: 2581–2586.

Hopkins K.L., Kirchner M., Guerra B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczak A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],2:i:- in Europe: a new pandemic strain ? Euro Surveill. 2010;15(22):pii=19580. Disponible en ligne : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19580>

Lailler R., Moury F., Granier S.A., Brisabois A. (2012). The *Salmonella* Network, a tool for monitoring *Salmonella* “from farm to fork”. Euroreference, n°8, hiver 2012. Disponible en ligne : <http://www.anses.fr/euroreference/Documents/ER08-Reseaux-SalmonellaEN.pdf>, consulté le 18/12/2012.

Lebrun M., Caruso A., Marchand J., Leignel V., Chénais B., Poliak S. (2012). Confirmation par PCR en temps réel de l'appartenance au sérovar Typhimurium des souches de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* du groupe O/4 ayant perdu l'expression d'une ou deux phases flagellaires. Université du Maine et Laboratoire départemental de la Sarthe. 16^{ème} Journée du réseau *Salmonella*, 23 novembre 2012, Ploufragan, France.

Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. Journal of Microbiological Methods 2004, 59(2):163-172.

Wattiau P., Weijers T., Andreoli P., Schliker C., Veken H.V., Maas H.M.E., Verbruggen A.J., Heck M.E.O.C, Wannet W.J., Imberechts H., Vos P. Evaluation of the Premi®Test *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. International Journal of Food Microbiology, 2008a, 123 (3), pp. 293-298.

Wattiau P., Van Hessche M., Schlicker C., Vander Veken H., Imberechts H. Comparison of Classical Serotyping and PremiTest Assay for Routine Identification of Common *Salmonella enterica* Serovars. Journal of Clinical Microbiology, 2008b; 46, pp. 4037 - 4040.

6.2 Normes

NF EN ISO 6579 : décembre 2002. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp (indice de classement V 08-013)

NF EN ISO 6579/A1 : octobre 2007. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. – Amendement 1 : Annexe D : Recherche des *Salmonella* spp.

dans les matières fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire (indice de classement V 08-013/A1)

NF U 47-100 : juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale – Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales (indice de classement : U 47-100)

OIE (2011). OIE Procedure for validation and certification of diagnostic assays – Abstract sheet. Premi[®] Test *Salmonella*. Date of registration : may 2011. Disponible en ligne : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Abstract_sheet_OIERegister_PTS_09.2011.pdf , consulté le 18/12/2012

6.3 Ateliers de travail

EURL-*Salmonella* (2011). The sixteenth EURL-*Salmonella* workshop, 19 and 20 May 2011, Zandvoort, the Netherlands. K.A. Mooijman. RIVM report 330604022/2011. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330604022.pdf>

EURL-*Salmonella* (2011). The fifteenth EURL-*Salmonella* workshop, 27 June 2010, Saint Malo, France. K.A. Mooijman. RIVM report 330604019/2010. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330604019.pdf>

6.4 Législation et réglementation

Décret n° 2012-845 du 30 juin 2012 relatif aux dispositions générales organisant la prévention, la surveillance et la lutte contre les dangers sanitaires de première et deuxième catégorie. JORF n°0152 du 1 juillet 2012.

RÈGLEMENT (CE) No 882/2004 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux. JO L 338 du 28.05.2004.

RÈGLEMENT (CE) No 2160/2003 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire. Journal officiel de l'Union européenne du 12.12.2003

Règlement (CE) n°2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JO L 338 du 22.12.2005.

Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8029 du 4 mars 2010, modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 relative à la mise en œuvre des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux de volailles – mesures relatives aux laboratoires. <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN20108059Z.pdf>

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2012 -SA- 0 2 1 4



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

COURRIER ARRIVE

22 AOUT 2012

DIRECTION GENERALE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction Générale de l'Alimentation

Service de l'Alimentation

Sous-direction de la Sécurité
Sanitaire des AlimentsBureau des Zoonoses et de la Microbiologie
Alimentaires251 rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

Monsieur le Directeur Général
de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de
l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

27-31, avenue du Général Leclerc – B.P. 19

94701 MAISONS ALFORT CEDEX

Dossier suivi par : Corinne DANAN – François GUILLON

Tél. : 01 49 55 52 67 – 02 38 77 41 03

Fax : 01 49 55 56 80

Mél : bzma.sdssa.dgal@agriculture.gouv.frRéf. : SDSSA/BZMA 

Paris, le

20 AOUT 2012

Objet : Saisine de l'ANSES relative à l'identification de variants de *Salmonella* Typhimurium et à leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole.

Conformément à l'article L.1313-1 du code de la santé publique, j'ai l'honneur de consulter l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail sur la question de l'identification de souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium, dans le cadre des plans de lutte contre les salmonelles en aviculture.

Éléments de contexte et données utiles

Rappels réglementaires

Les arrêtés ministériels pris en application des règlements de l'UE sont :

- les deux arrêtés du 26 février 2008 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (en filière ponte et en filière chair),
- l'arrêté du 4 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de dindes de reproduction,
- l'arrêté du 22 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement.

Contexte épidémiologique

Depuis la fin des années 90, les données de surveillance sur les salmonelles indiquent, à l'échelle internationale, une augmentation de l'occurrence du sérovar 1,4,[5],12:i:-. Cette formule antigénique, très proche de celle de *Salmonella* Typhimurium (STm), se distingue par l'absence d'une phase flagellaire ; les souches de ce sérovar ont ainsi été identifiées comme des souches variants monophasiques du sérovar Typhimurium et sont dorénavant prises en compte par les règlements de la Commission européenne relatifs à la surveillance des salmonelles dans les filières avicoles des espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*.

En France, suite à la mise en cause de différents variants du sérovar STm dans plusieurs toxi-infections alimentaires (TIAC), le champ d'application des arrêtés ministériels ont été étendus au-delà de la réglementation européenne, en considérant trois variants existants (de formule antigénique 1,4,[5],12:i:- ou 1,4,[5],12:-:i ou 1,4,[5],12:-:-).

Ainsi, l'isolement d'un des 3 variants de STm en environnement d'élevage à partir de méthodes officielles, conduit aux mêmes mesures de police sanitaire que l'isolement d'un souche de STm. Suivant le type d'élevage concerné (poules pondeuses d'œufs de consommation, élevages reproducteurs, volailles d'engraissement), ces mesures se traduisent par l'abattage du troupeau contaminé, ou l'envoi des œufs vers des établissements fabriquant des ovoproduits, ou encore le traitement thermique des viandes positives après recherche sur muscle.

Méthodes d'analyses officielles

Pour les filières d'engraissement de poulets de chair et de dindes, la méthode que préconise la Commission européenne, soit la norme NF EN ISO 6579/A1 (annexe D), utilise le milieu MSR/V, basé sur le principe de migration. Cette méthode ne permet donc pas la détection du variant immobile « :-:- ». De plus, en France, certains laboratoires travaillant à petite échelle éprouveraient, d'après des remontées d'information, des difficultés dans la mise en évidence des deux autres variants monophasiques, mobiles, à partir de cette méthode.

Pour les filières ponte d'œufs de consommation et reproducteurs de la filière chair, la norme prescrite en France (norme NF U 47-100 recourant à deux milieux : MSR/V et tétra thionate) permet au contraire d'identifier le variant immobile, ainsi que les deux autres variants monophasiques mobiles.

Existence de faux variants de Typhimurium

L'Autorité européenne de sécurité des aliments, dans son avis de 2010¹ sur la surveillance et l'évaluation des risques liés au variant monophasique de Typhimurium « :i:- », recommande de vérifier l'absence de la deuxième phase flagellaire (en cas d'une identification par lysotypage), ou de confirmer le résultat sérologique (en cas d'une identification par sérotypage) par une approche moléculaire. En effet, certaines souches peuvent présenter l'une des trois formules antigéniques, variants de STm, sans être similaires au sérovar STm d'un point de vue génétique. L'identification précise des variants de STm est donc importante, dans la mesure où ces « faux » variants de STm ne font pas l'objet de distinction par la réglementation.

Dans ce contexte, le laboratoire de sécurité des aliments à Maisons-Alfort reçoit depuis 2010, conformément à la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8026 du 27 janvier 2010, toutes les souches variants de STm pour, d'une part confirmer le sérotype par la méthode de sérotypage classique, considérée comme méthode officielle, et d'autre part procéder à des tests complémentaires de typage dans le cadre des activités de surveillance épidémiologique de ces variants.

Les informations communiquées récemment par l'Anses (Source : comité de pilotage du réseau *Salmonella*) indiquent la présence de « faux » variants de STm à des taux variables selon le type de variant (environ 2/419 souches testées pour le variant monophasique « :i:- » et 5/7 souches testées pour le variant immobile « :-:- »). Par ailleurs, il est souligné que le faible nombre de souches immobiles rapporté (7 souches sur 450 souches étudiées) est peut-être dû à une sous-évaluation, liée à l'absence de détection par la méthode NF EN ISO 6579/A1 annexe D (cf infra) utilisée pour les contrôles officiels en filière chair (poulets de chair et dindes d'engraissement).

¹ Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of *Salmonella* Typhimurium-like strains

Aussi, je vous saurais gré de bien vouloir examiner les questions suivantes :

Questions

Compte tenu des éléments précités, il est demandé :

Question 1 : résultats de la surveillance nationale des variants de STm d'origine agro-alimentaire

- Afin d'apprécier la part des variants (vrais et « faux ») dans le secteur avicole et leur évolution temporelle, il est demandé un bilan des résultats de typage réalisé sur les souches collectées par l'Anses dans ce secteur, notamment conformément à la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8026 (souches isolées de prélèvements d'environnement ou d'organes ou, le cas échéant, dans les denrées issues de viandes de volailles). Autant que possible, ce bilan mettra en évidence les éventuels critères épidémiologiques de différenciation entre les vrais et les « faux » variants, en indiquant leur répartition au sein des 3 types de variants existants. Ceci permettra de confirmer, en particulier, la fréquence élevée apparente des « faux » variants au sein des souches immobiles.
- Compte tenu des discussions en cours au niveau européen sur la surveillance des salmonelles en filière porcine, il s'avérerait également intéressant d'avoir un bilan qualitatif de ce type de souches dans le secteur porcin (prélèvements en élevage, à l'abattoir ou sur les produits alimentaires d'origine porcine).

Question 2 : risques sanitaires pour la santé publique liés aux vrais et faux variants de STm

Dans une perspective visant à proportionner les mesures de gestion en élevage avicole au risque lié aux variants, il conviendrait d'évaluer leur impact sur la santé humaine, par exemple en appréciant leur mise en cause dans l'apparition de TIAC ou de salmonelloses humaines, comparativement aux sérovars définissant les MRC (Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Infantis et Virchow). La part des « faux » variants de STm dans les cas humains devra être distinguée.

Une attention particulière sera portée sur le variant immobile (ce variant ayant été pris en compte notamment suite à une TIAC en 2009, à Toulouse, liée à la consommation de Tiramisu et dont la source de contamination a été identifiée en filière ponte).

Une exclusion des « faux » variants de Typhimurium dans la réglementation en élevage avicole présenterait l'avantage de ne pas pénaliser les éleveurs concernés, notamment les élevages reproducteurs contraints à l'abattage en cas de détection de salmonelle d'intérêt pour la santé publique. Néanmoins, cette exclusion serait susceptible d'entraîner, à terme, une augmentation de leur présence dans les denrées issues de volailles.

La question de maintenir, ou non, les souches immobiles dans la réglementation nationale se pose aussi, compte tenu des préconisations européennes pour la détection des *Salmonella* en filière avicole, sous réserve de l'absence d'enjeu majeur en termes de santé publique.

Question 3 : Disponibilité de méthodes officielles

En l'absence de norme relative à la détection des « faux » variants STm, il est demandé à l'Anses, dans le cadre de ses activités de référence pour *Salmonella*, de préciser les protocoles analytiques qui pourraient être considérés comme méthode(s) officielle(s) dans ce domaine, ainsi que les délais de leur mise en œuvre pour une utilisation en routine dans les laboratoires agréés et reconnus.

De telle(s) méthode(s) ont en effet vocation à être utilisée(s) par les laboratoires agréés et reconnus dans le cadre des mesures obligatoires de dépistage en élevage et doivent répondre à des exigences en adéquation avec les mesures sanitaires de lutte associées.

En cas de délai de mise en œuvre long, de plusieurs années, le LNR pourrait être sollicité également pour confirmer à partir de ces protocoles analytiques les suspicions établies par les laboratoires de première intention.

DELAI JUSTIFIE

Trois mois, soit le 1^{er} novembre 2012, compte tenu des difficultés rencontrées par les laboratoires dans l'identification des variants du sérovar STm (notamment la forme immobile), des enjeux de santé publique et de contraintes sanitaires injustifiées (en cas de détection de « faux » variants).

Nature de l'expertise attendue :

- estimation de l'occurrence des variants (vrais et « faux ») de STm (en filière avicole, éventuellement en filière porcine) et appréciation du risque qu'ils présentent pour la santé publique (en prenant en compte, par exemple, les TIAC rapportées, peut-être abusivement, à des vrais variants STm ces dernières années : par exemple la TIAC due au Tiramisu attribuée à une souche immobile de STm en 2009 à Toulouse).
- proposition de protocoles analytiques en vue de la validation d'une (des) méthode(s) comme méthode de référence, visant à détecter les « faux » variants de STm, dans le cadre des mesures de lutte officielle. Cette évaluation doit conduire à une reconnaissance officielle.

Destinataires pour la réponse mail

Destinataire DGAL : boîte institutionnelle BZMA (bzma.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr) et chargés de mission (francois.guillon@agriculture.gouv.fr ; corinne.danan@agriculture.gouv.fr).

Mes services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

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

Le Directeur Général de l'Alimentation



Patrick DEHAUMONT

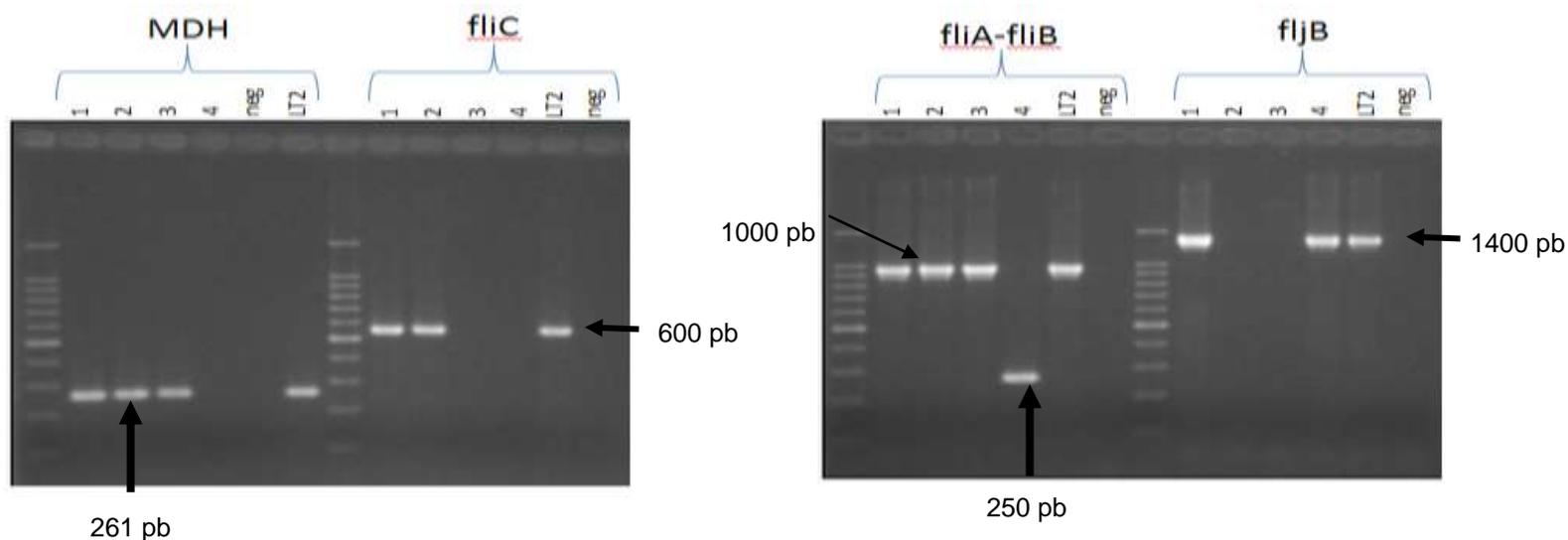
Annexe 2 : Questionnaire du LNR adressé aux laboratoires agréés / reconnus

Pour répondre à la Saisine « 2012-SA-0214 » de l'Anses par la DGAL, sur les variants de S.Typhimurium, nous voudrions faire le bilan des méthodes utilisées, et lister les éventuelles difficultés d'isolement des variants STM.
 Merci de répondre aux questions (écriture bleue), en complétant / modifiant les cases jaunes

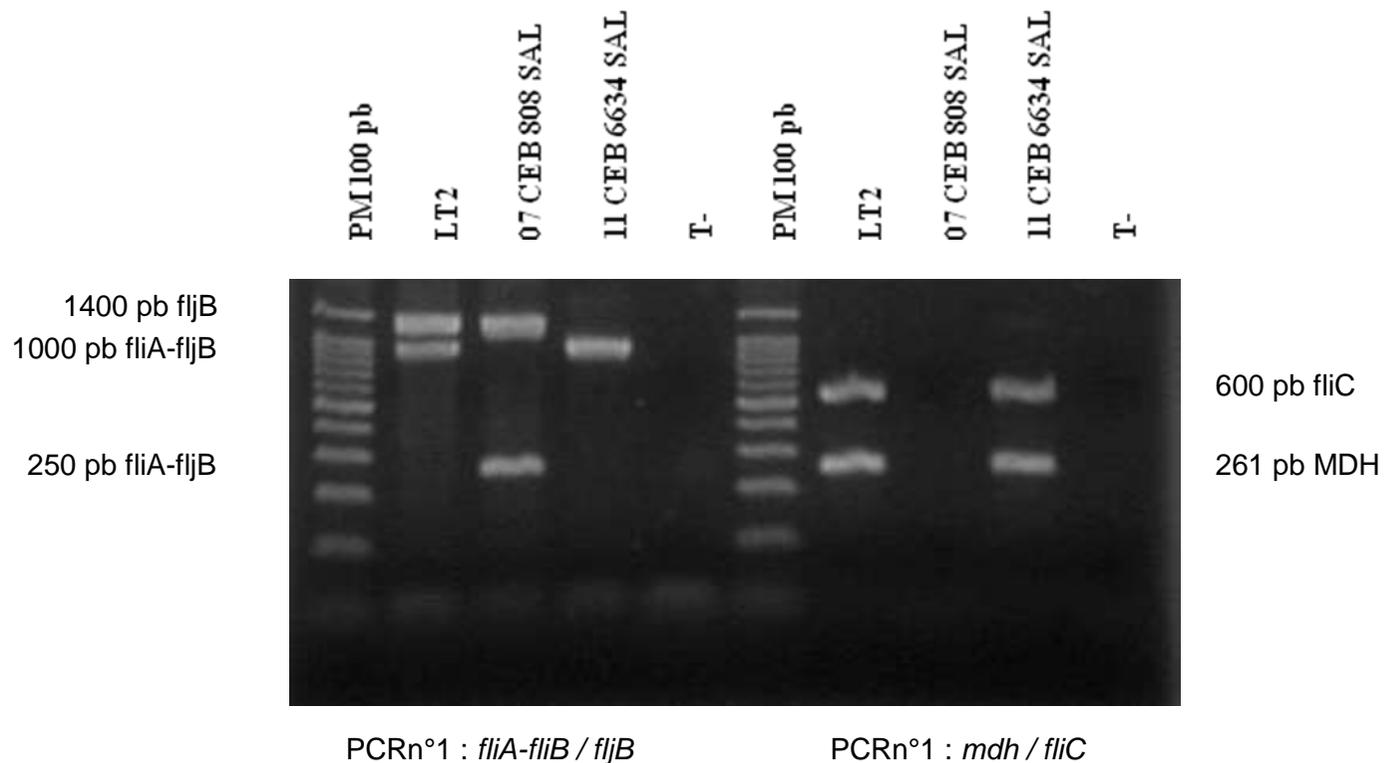
Réseaux des laboratoires agréés et reconnus					
code	thème pour l'agrément ; norme pour la reconnaissance	Les milieux et/ ou kits validés utilisés	Dans ce cadre d'agrément/Reconnaissance, Depuis 2010, Avez-vous isolé des <i>Salmonella</i>	1,4,[5],12:i:-	OUI / NON
Agrément 1 et Reconnaissance	dépistage bactériologique de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> et sérotypage des souches isolées dans les prélèvements d'environnement d'élevage et de couvoir, les poussins et organes de volailles.	Méthode imposée : NF U 47-100 avec l'exception: MSRV seul pour poulet et dinde d'engraissement		1,4,[5],12:-:1,2	OUI / NON
	reconnaissance pour la norme NF U 47-100 et NF U 47-100-adaptée	Les milieux utilisés pour les contrôles officiels et les contrôles obligatoires = voir L'EILA de 2013	si OUI, Quand les 2 voies d'enrichissement (MSRV et MKTT(n)) sont utilisées, avez-vous isolé ces variants avec la même fréquence sur MSRV ?	répondre en choisissant ci-après : MSRV identique au MKTT MSRV moins souvent que MKTT MSRV plus souvent que MKTT	si possible, quantifier votre réponse ici
Reconnaissance	reconnaissance pour la norme NF U 47-101				
Agrément 2 Reconnaissance	dépistage bactériologique de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> et sérotypage des souches isolées dans les œufs, les muscles et les aliments pour animaux.	Quelles méthodes utilisez-vous pour les contrôles?	Depuis 2010, Avez-vous isolé des <i>Salmonella</i>	1,4,[5],12:i:-	OUI / NON
	reconnaissance pour la norme NF EN ISO 6579 : microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des <i>Salmonella</i> spp.	NF EN ISO 6579 (à supprimer si c'est non)		1,4,[5],12:-:1,2	OUI / NON
		et kit validé: inscrire le nom		1,4,[5],12:-:	OUI / NON
Agrément A	Analyses officielles en Microbiologie Alimentaire (détection de <i>Salmonella</i> spp dans les aliments)	Quelles méthodes utilisez-vous pour les contrôles?	Depuis 2010, Avez-vous isolé des <i>Salmonella</i>	1,4,[5],12:i:-	OUI / NON
		NF EN ISO 6579 (à supprimer si c'est non)		1,4,[5],12:-:1,2	OUI / NON
		et kit : inscrire le nom et kit : inscrire le nom		1,4,[5],12:-:	OUI / NON

Annexe 3 : Illustrations des résultats d'amplification par PCR par la méthode interne n°CEB21 du LNR pour la confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium. [-A : résultats obtenus par PCR simple ; -B : résultats obtenus par les deux PCR multiplex].

Annexe 3-A [1 : Variant monophasique S.I 1,4,[5],12:i- de Typhimurium dit « incohérent » (*fljB*+); 2 : Variant monophasique S.I 1,4,[5],12:i- confirmé de Typhimurium ; 3 : Variant immobile S.I 1,4,[5],12:-:- de Typhimurium ; 4 : Variant monophasique S.I 1,4,[5],12:-:1,2 d'un sérovar autre que Typhimurium ; neg : témoin négatif ; LT2 : Sérovar Typhimurium]



Annexe 3-B [PM100pb : marqueur de poids moléculaires ; **LT2** : sérovar Typhimurium ; **07CEB808SAL** : *S. Brandenburg* ; **11CEB6634SAL** : Variant monophasique *S.l* 1,4,[5],12:i:- du sérovar Typhimurium ; **T-** : témoin négatif sans ADN]





Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
27-31 avenue du général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr