



SPF Santé publique, Sécurité de  
la Chaîne alimentaire et  
Environnement  
Division Recherche  
contractuelle



Ministère de la Région wallonne  
Division Générale de l'Agriculture

**STRATEGIE DE PREVENTION ET DE SURVEILLANCE DE  
SALMONELLA DANS LA FILIERE PORCINE :**

**2. guide destiné aux laboratoires et aux personnes en charge des  
prélèvements.**

J.-N. Degeye, N. Korsak, G. Etienne et G. Daube

Service de Microbiologie des denrées alimentaires  
Faculté de Médecine vétérinaire  
Université de Liège

Avril 2003

Université de Liège  
Faculté de Médecine vétérinaire  
Département des Sciences des Denrées Alimentaires  
d'Origine Animale  
Service de Microbiologie des Denrées Alimentaires  
(Professeur G. Daube)  
Sart-Tilman B43bis – B-4000 Liège  
Tél : 32-4-366 40 15 (40 40)  
Fax : 32-4-366 40 44  
E-mail : Georges.Daube@ulg.ac.be

L'utilisation des données de cette publication à des fins personnelles est autorisée moyennant indication de la référence. Tout autre usage incombe aux droits d'auteurs et nécessite l'autorisation explicite de ces derniers.

# Table des matières

<b>Préface</b>	<b>7</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>9</b>
1. Objectifs de ce guide	10
2. Rappels sur <i>Salmonella</i>	12
<b>II. Stratégie de surveillance de <i>Salmonella</i> dans la filière porcine</b>	<b>15</b>
1. Echantillonnage aux différents stades	15
2. Stratégie globale de surveillance de <i>Salmonella</i>	17
3. Méthodes d'analyse préconisées	18
4. Critères relatifs aux salmonelles	21
<b>III. Échantillonnage : matériel et méthodes</b>	<b>25</b>
1. En exploitation	25
2. A l'abattoir	34
<b>IV. Transport des échantillons au laboratoire</b>	<b>47</b>
<b>V. Méthodes d'analyse</b>	<b>49</b>
1. Méthodes bactériologiques pour la recherche de <i>Salmonella</i>	49
2. Méthode de détection par amplification génique	53
3. Test immuno-enzymatique VIDAS SLM	59
4. Sérologie	62
<b>VI. Caractérisation des souches</b>	<b>65</b>
1. Évaluation de la résistance des souches aux antibiotiques	65
2. Sérotypage conventionnel	66
3. Lysotypage	67
4. Typage moléculaire par « Random Amplified Polymorphism DNA »	67
5. Typage moléculaire par « Pulse Field Gel Electrophoresis »	70
<b>VII. Perspectives</b>	<b>73</b>
<b>VIII. Samenvatting</b>	<b>75</b>
<b>IX. Références et adresses utiles</b>	<b>77</b>
<b>Annexes</b>	<b>79</b>



# Préface

Pendant quatre années, le Ministère fédéral des Classes Moyennes et de l'Agriculture et le Ministère de la Région Wallonne ont financé un projet de recherche auprès du Service de Microbiologie des denrées alimentaires de l'Université de Liège sur la mise en place d'un système de surveillance de la contamination par *Salmonella* d'une filière intégrée de production de viande porcine.

Au cours de la première biennale, les chercheurs ont élaboré une méthode de surveillance efficace de *Salmonella* dans toute une filière de production de viande porcine. Elle a permis de suivre le statut en salmonelles des filières multi-site et mono-site et de constater une différence importante en prévalence suivant la filière étudiée. Des méthodes de screening micro-biologique et de typage ont été mises au point permettant l'application immédiate de mesures correctives en cas de contamination d'un des maillons de la chaîne.

L'objectif de la deuxième biennale était de réduire autant que possible la pression de contamination des salmonelles tout au long des filières étudiées. Pour atteindre ce but, des mesures simples de bonnes pratiques hygiéniques ont été conseillées aux différents intervenants de ces filières. L'efficacité de ces mesures a été évaluée à moyen terme. L'importance d'une bonne hygiène dans la conduite d'une exploitation a été démontrée. Au cours de ce deuxième mandat, les méthodes de détection de *Salmonella* (amplification génique en temps réel, test immuno-enzymatique) dans diverses matrices - dont les matières fécales - ont été sensiblement améliorées. La complémentarité de la sérologie aux méthodes bactériologiques pour évaluer le statut des lots de porcs a également été démontrée.

Les enseignements recueillis tout au long de ce projet ont conduit à l'élaboration de deux guides de bonnes pratiques en matière de *Salmonella*. Le premier guide est destiné aux différents intervenants

de la filière porcine ; ils y trouveront des renseignements importants pour lutter contre les salmonelles dès le premier maillon de la chaîne. Le deuxième guide est destiné aux laboratoires et aux responsables des contrôles et comprend des informations pratiques pour élaborer un plan de surveillance.

Ces deux brochures représentent, sans aucun doute, une aide utile à chaque personne concernée par la lutte contre la salmonellose dans le secteur porcin.

Dr. X. VAN HUFFEL, PhD  
Conseiller scientifique  
SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et  
Environnement  
Direction générale Animaux, Végétaux et Alimentation  
Division Recherche contractuelle  
Bruxelles

## **I. Introduction**

Depuis le 1<sup>er</sup> août 2001, la Commission européenne travaille sur deux projets de révision de la législation actuelle en matière de zoonoses liées à la sécurité alimentaire : d'une part, la proposition de directive du Parlement européen et du Conseil portant sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil, et d'autre part, la proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil relatif au contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques présents dans la chaîne alimentaire, et modifiant les directives 64/432/CEE, 72/462/CEE et 90/539/CEE du Conseil. Ces deux projets de révision s'inscrivent dans le cadre du suivi du Livre blanc sur la sécurité alimentaire.

La proposition de directive prévoit la mise en place de systèmes de surveillance coordonnés de certains agents zoonotiques tout au long des chaînes alimentaires à la fois humaine et animale. Les nouvelles dispositions traitent également de la collecte des données sur l'incidence et la prévalence des maladies zoonotiques chez l'homme, sur les foyers des zoonoses d'origine alimentaire et sur l'apparition de résistances antimicrobiennes chez certains agents zoonotiques.

La proposition de règlement s'attache à la politique de réduction des agents pathogènes pour réduire la prévalence des agents zoonotiques en fixant des objectifs communautaires de réduction des agents zoonotiques, en premier lieu au sein de certaines populations animales. Les salmonelles sont considérées comme prioritaires, particulièrement pour les produits issus du secteur avicole.

Les objectifs, fixés progressivement sur base d'avis scientifiques, seront d'application à compter de 2008 pour les porcs reproducteurs.

Des dispositions sur le contrôle des zoonoses et des agents zoonotiques à divers niveaux font déjà l'objet de plusieurs directives.

La Commission semble néanmoins déterminée à durcir sa politique alimentaire, en établissant un ensemble cohérent et uniforme de règles d'hygiène fondées sur une approche intégrée couvrant la totalité de la chaîne alimentaire, "de l'étable à la table".

La mise en place de contrôles à tous les stades de la chaîne alimentaire, de la production primaire au commerce et à la distribution, en passant par la production de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux et l'abattage, permettra par exemple d'organiser les journées d'abattage en fonction de la qualité sanitaire des porcs avant abattage.

Dès lors, cette refonte de la législation, visant une surveillance accrue et coordonnée ainsi qu'une réduction des agents zoonotiques dans les chaînes alimentaires humaine et animale, nécessitera notamment l'organisation d'analyses à chacun des stades de la filière porcine. Parallèlement aux programmes de contrôle nationaux, une collaboration avec le secteur privé sera également sollicitée de la part des États membres.

## **1. Objectifs de ce guide**

Ce guide est la finalisation d'un programme de recherche co-financé par le Ministère de l'Agriculture de la Région Wallonne et le Ministère fédéral des Classes Moyennes et de l'Agriculture intitulé « Recherche d'une méthodologie pour la mise en place et la surveillance d'une filière intégrée de production de viande porcine *Salmonella*-free ».

Ce projet a été scindé en deux phases distinctes. La première visait à élaborer une méthode de surveillance efficace de *Salmonella* dans toute la filière de production de viande porcine ainsi qu'à mettre au point et à standardiser des méthodes de screening microbiologique et de typage permettant de réagir « en temps réel ». La seconde phase avait pour but de réduire au maximum la pression de contamination par *Salmonella* à tous les stades de la production de viande porcine.



L'objectif de ce guide est de proposer une stratégie complète de surveillance de la filière porcine aux laboratoires et aux personnes en charge de la gestion et du contrôle de cette spéculation.

Tout d'abord, une approche globale de la méthodologie de surveillance établie suite aux résultats de l'étude, sera présentée. Celle-ci sera ensuite développée d'un point de vue technique afin de pouvoir la mettre en œuvre par les acteurs de terrain.

Concernant l'échantillonnage proprement dit, seules les techniques de prélèvement en ferme et à l'abattoir seront détaillées dans cet ouvrage. L'échantillonnage au niveau des autres unités de la filière (ex. : moulin de fabrication d'aliments pour animaux) fait déjà l'objet de normes particulières (ex. : normes AFNOR).

*Tableau 1 : Exemples de normes AFNOR relatives à l'échantillonnage des matières premières et aliments dans les moulins de fabrication.*

<b>Norme</b>	<b>Produits</b>
N F V 03-600	Amidons et féculés
N F V 03-700	Céréales
N F V 03-740	Céréales et légumineuses (produits de mouture)
N F V 03-770	Légumineuses
NF EN ISO 5555	Corps gras d'origine animale et végétale
NF EN ISO 542	Graines oléagineuses
NF EN ISO 664	Graines oléagineuses
NF ISO 5500	Tourteaux de graines oléagineuses

Seules les techniques d'analyses jugées les plus performantes seront présentées. Parmi celles-ci, citons les méthodes bactériologiques, immuno-enzymatiques, génétiques ou encore les tests sérologiques de type ELISA.

Enfin, en vue de réaliser des études épidémiologiques, les techniques de caractérisation des souches isolées sont incontournables. Il s'agit du sérotypage classique (basé sur le schéma de Kauffmann-White),

de l'étude de la résistance aux antibiotiques, du lysotypage ou encore du typage moléculaire par des techniques génétiques.

## 2. Rappels sur *Salmonella*

Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, les salmonelles répondent à la définition suivante :

- bacilles à Gram négatif ;
- aéro-anaérobies ;
- mobiles ou immobiles ;
- facilement cultivables ;
- fermentant le glucose ;
- réduisant les nitrates en nitrites ;
- dépourvus d'oxydase.

En outre, les salmonelles présentent les caractéristiques suivantes :

- réduisent les nitrates en nitrites ;
- dégradent les glucides par métabolisme fermentatif ;
- utilisent le citrate comme seule source de carbone ;
- se multiplient sur milieux usuels sans facteurs de croissance ;
- fermentent du glucose avec gaz : la plupart des souches sont gazogènes et produisent du H<sub>2</sub>S, mais certains sérovars ne produisent jamais de gaz, tels Typhi et Pullorum-Gallinarum. Des variants agazogènes de sérovars normalement gazogènes, peuvent être rencontrés. Il en va de même pour ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>S (Paratyphi A...) ;
- produisent du H<sub>2</sub>S ;
- n'utilisent pas de lactose, sauf cas particulier (*Arizonae*) et souches atypiques.
- n'utilisent pas de saccharose, sauf cas particulier (*Arizonae*) et souches atypiques.

- possèdent certaines enzymes :
  - décarboxylase de la lysine et de l'ornithine ;
  - dihydrolase de l'arginine ;
  - tétrathionate-réductase.
- sont dépourvues des activités enzymatiques suivantes :
  - pas de bêta-galactosidase, sauf cas particulier (*Arizonae* et souches atypiques) ;
  - pas d'uréase ;
- aucune culture en présence d'inhibiteur (KCN), sauf exceptions ;
- autres caractéristiques :
  - fermentation du mannitol ;
  - activité catalase.

L'annexe 1 reprend le tableau d'interprétation des essais biochimiques proposé par la norme ISO 6579.

On distingue généralement trois groupes de salmonelles sur base de leur épidémiologie. Le premier groupe comprend les salmonelles qui n'infectent que l'homme (ex : *Salmonella* Typhi). Le second groupe rassemble les salmonelles spécifiquement adaptées à des espèces particulières de vertébrés (ex : *Salmonella* Choleraesuis chez le porc). Enfin, la majorité des salmonelles, constituant le troisième groupe, est qualifiée d'ubiquiste, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas d'hôte préférentiel particulier (ex : *Salmonella* Typhimurium). Ce sont ces dernières qui présentent le plus de problèmes en terme de santé publique dans les pays développés.



## **II. Stratégie de surveillance de *Salmonella* dans la filière porcine**

Ce chapitre s'attache à décrire la stratégie de surveillance de *Salmonella* aux différents stades de la production de viande porcine. L'alimentation animale, l'élevage et l'engraissement, l'abattage et enfin la découpe et la distribution de viande fourniront un ensemble d'échantillons destinés au suivi de *Salmonella*. Les méthodes d'analyses préconisées sont également définies pour chacun des échantillons. Les méthodologies proposées sont celles qui ont permis la meilleure détection des contaminations à chaque stade.

### **1. Echantillonnage aux différents stades**

#### **1.1. Alimentation animale**

Au moulin de fabrication d'aliments pour porcs, 50 g minimum des différentes matières premières et des différents aliments finis sont prélevés, respectivement lors du déchargement au moulin et lors du chargement précédant la livraison aux exploitations. La personne en charge de ces prélèvements doit veiller à obtenir un échantillon le plus représentatif possible du lot analysé.

#### **1.2. Production porcine**

Dans les sites d'élevage et d'engraissement, 4 types d'échantillons sont prélevés dans chaque compartiment :

- a) pool de 50 g minimum d'**aliment** prélevé dans les auges ;
- b) pool de 50 g minimum de **matières fécales** collectées dans les différentes loges ;

- c) 1 paire de **surchaussures** portée lors du prélèvement des échantillons précédents ;
- d) prises de **sang** réalisées sur 5 à 10 % des porcs du lot avant leur conduite à l'abattoir (à coupler au suivi de la maladie d'Aujeszky).

Pour les échantillons de matières fécales et les surchaussures, un suivi régulier est préférable, à savoir aux stades suivants :

- gestation ;
- maternité ;
- post-sevrage ;
- après 2 mois d'engraissement ;
- après 4 mois d'engraissement.

Des prélèvements de lisier peuvent également être réalisés. Ceci permet de vérifier le statut global d'une exploitation donnée. Selon le dispositif de l'exploitation, ils concerneront soit chacun des compartiments, soit la cuve centrale de collecte du lisier.

### **1.3. Abattoir**

A l'abattoir, le prélèvement aseptique d'au moins 5 g de contenu du cæcum ainsi que d'un morceau de muscle du pilier du diaphragme sur 10 porcs du lot permettra de confirmer les résultats précédemment obtenu en fermes.

D'autre part, l'écouvillonnage des carcasses de 5 porcs du lot donnera une idée de la prévalence des carcasses destinées à la vente. Les 4 zones d'écouvillonnage identifiées par l'arrêté royal du 28 août 2002 correspondent à une surface totale de 600 cm<sup>2</sup> (figure 1, page 45). Cet arrêté précise également d'autres contrôles de l'hygiène dans les abattoirs (ex. : échantillonnage bactériologique pour les contrôles du nettoyage et de la désinfection). Ces mesures permettent

de prévenir la contamination fécale mais ne suffisent pas pour prédire le statut en *Salmonella*.

#### **1.4. Découpe et distribution**

Le plan d'échantillonnage doit également concerner les ateliers de découpe de l'abattoir ainsi que les boucheries situées en aval. Précisons qu'au-delà du « stade carcasse », la traçabilité individuelle devient difficile. L'analyse de ces échantillons traduit au mieux le risque direct pour les consommateurs.

## **2. Stratégie globale de surveillance de *Salmonella***

La finalité de ce guide est d'obtenir, à terme, une filière de production de viande porcine indemne de salmonelles. Il s'agira donc de déterminer le statut de chaque exploitation afin d'organiser, *in fine*, les journées d'abattage, en abattant les porcs les moins contaminés en début de journée pour terminer par les porcs provenant des sites à haute prévalence. La procédure recommandée est la suivante :

- a) en élevage (reproducteurs et porcelets) : prélèvement d'échantillons de façon aléatoire afin de s'assurer de l'absence de *Salmonella* ;
- b) en engraissement :
  - échantillonnage avant abattage : matières fécales et surchausses (complétées éventuellement de prises de sang). Une fiche reprenant les résultats d'analyse de ces échantillons doit accompagner le lot à l'abattoir ;

- échantillonnage à l'abattoir de contenu du cæcum et de muscle du pilier du diaphragme pour confirmation des résultats précédemment obtenus en exploitation ;
  - certification d'exploitation *Salmonella*-free après 3 lots successifs indemnes de salmonelles. Dans ce cas, seuls les prélèvements effectués à l'abattoir (cæcum et diaphragme) sont maintenus.
- c) à l'abattoir : le contrôle de la chaîne d'abattage portera sur l'écouvillonnage de carcasses de porcs pour la recherche de *Salmonella* et d'*Escherichia coli* (Arrêté royal du 28 août 2002).

### **3. Méthodes d'analyse préconisées**

Lors de l'étude, les différents prélèvements ont été soumis à diverses méthodes d'analyse ; il en ressort que :

- a) le protocole adapté de la méthode immuno-enzymatique VIDAS *Salmonella* semble le plus performant. Il est significativement meilleur que la méthode « Diassalm » basée sur un enrichissement en milieu semi-solide pour les échantillons fortement chargés en micro-organismes d'origine intestinale. Il permet en effet la détection des souches mobiles et immobiles, et ce, pour chacune des matrices analysées. De plus, il s'apparente davantage au nouveau protocole de la norme de référence ISO 6579 puisqu'il utilise le bouillon Muller-Kauffmann ;
- b) la détection par amplification génique à l'aide du kit iQ-Check (Bio-Rad) offre un gain de temps appréciable par rapport aux autres méthodes traditionnelles. De plus, il permet, après ajout de lysozyme (Muramidase, Roche) préalablement à la réaction PCR et dilution au dixième du produit d'amplification, de réduire considérablement les inhibitions engendrées par les échantillons de nature fécale ;



- c) la comparaison des statuts obtenus par méthode bactériologique avec ceux obtenus sur base de la sérologie montre la complémentarité de ces deux méthodes pour la détection des lots de porcs contaminés par les salmonelles (tableau 2).

Tableau 2. concordance sérologie abattoir-bactériologie ferme.

	Bactériologie ferme	
	+	-
Sérologie abattoir		
	+	24
	-	4
		27
		43
Kappa	0,38	
Valeur prédictive +	47,06 ± 13,7	
Valeur prédictive -	91,49 ± 7,98	
Sensibilité	85,71 ± 12,96	
Spécificité	61,43 ± 11,4	
Indice de Youden	0,47 ± 0,18	

La concordance entre les deux méthodes de diagnostic est de 68,4 % (67 sur 98). Un grand nombre de lots (27 sur 98, soit 27,6 %) se sont révélés séropositifs à l'abattoir (jus de décongélation) alors qu'aucune présence de salmonelles n'avait pu être détectée en ferme (matières fécales et surchaussures). Ceci est explicable par le fait que des porcs contaminés n'excrétaient pas de salmonelles lors des prélèvements en ferme ou encore par un manque de spécificité (61 %) du test sérologique (faux positifs dus à une réaction croisée pour d'autres entérobactéries).

Inversement, très peu de lots ont été diagnostiqués positifs en fermes mais négatifs en sérologie (4 %).

Dans tous les cas, la valeur prédictive négative du test sérologique est supérieure à 90 %. Il y a donc plus de 90 % de probabilité qu'un

porc diagnostiqué négatif en sérologie le soit également en bactériologie.

La sérologie à l'abattoir semble un bon test prédictif de la situation en ferme, même si on ne voit pas ici les faux positifs résultant d'un manque de sensibilité de la réaction bactériologique ou d'un manque de spécificité de la sérologie.

La détermination du statut en *Salmonella* des exploitations porcines devra donc faire appel à la fois aux méthodes bactériologique traditionnelles par culture (ISO 6579), immuno-enzymatique (VIDAS SLM) ou PCR (iQ-Check) ainsi qu'au test sérologique (par exemple Salmotype).

En ce qui concerne les aliments pour porcs, les carcasses et les viandes, d'autres méthodes bactériologiques sont efficaces, comme la méthode « Diassalm ».

## 4. Critères relatifs aux salmonelles

Concernant les critères relatifs à *Salmonella* dans les produits destinés à l'alimentation animale, ils sont définis dans le guide GMP rédigé par l'organisme OVOCOM. On peut cependant douter de leur pertinence en regard des faibles quantités échantillonnées par rapport au lot analysé.

Tableau 3 : Quantité à prélever en fonction de la production (source : OVOCOM).

Production annuelle, par unité de production, d'aliments composés ne subissant pas de traitement	Nombre d'échantillons à prélever par trimestre
Jusqu'à 2.000 tonnes	2
De 2.000 à 4.000 tonnes	2
De 4.000 à 6.000 tonnes	3
De 6.000 à 8.000 tonnes	4
De 8.000 à 10.000 tonnes	5
De 10.000 à 20.000 tonnes	10
De 20.000 à 30.000 tonnes	15
De 30.000 à 40.000 tonnes	20
Plus de 40.000 tonnes	25

Quant aux viandes hâchées et aux préparations de viande, la directive européenne 94/65/CEE fixe les limites acceptables en termes de salmonelles.

Par contre, aucun critère relatif à l'écouvillonnage des carcasses de porcs n'est disponible, que ce soit dans les textes de loi ou dans les recueils émanant d'acteurs de la filière porcine. L'étude a montré qu'il était possible de réduire le taux de contamination des carcasses pour *Salmonella* à une valeur de l'ordre de 10 % sur base de pools de 5 carcasses, ce qui correspond à un taux de contamination individuelle compris entre 2 % et 10 %.

Enfin, on peut recommander, sur base du projet, de mettre en place un plan de lutte drastique en cas de contamination au sein des exploitations porcines. Les règles élémentaires d'hygiène (lave-bottes, pédiluves, accès contrôlé, ...) devront être rigoureusement respectées, les points critiques devront être identifiés et contrôlés et un plan de surveillance renforcé des lots suivants devra être appliqué.

Les tableaux 4 et 5 donnent la synthèse des différents prélèvements et méthodes d'analyse correspondantes conseillés ainsi que les critères tant légaux que ceux dressés sur base du projet.

Tableau 4 : protocole de prélèvement, méthodes de détection de *Salmonella* et critères au moulin et en exploitation

Protocole de prélèvement et méthodes de détection recommandés				Critères	
Lieu de prélèvement	Echantillon	Quantité analysée	Méthode de détection	GMP ou légaux	Définis sur base du projet
Au moulin	Matières premières et aliments finis	25 g**	Diasalm, ISO 6579***, VIDAS SLM, Probelia/iQ-Check	Absence dans 25 g (guide GMP disponible via l'organisme OYOCOM)	
			Diasalm, ISO 6579***, VIDAS SLM, Probelia/iQ-Check		
En ferme*	Aliments finis	25 g (pool) par compartiment**	ISO 6579***, VIDAS SLM, iQ-Check		
	Matière fécale	25 g (pool) par compartiment**			
	Surchaussures	1 paire par compartiment	ISO 6579***, VIDAS SLM, iQ-Check		Si contamination d'un lot, en informer le vétérinaire, dresser un plan de lutte contre <i>Salmonella</i> et appliquer un screening plus poussé
	Lisier	25 g (par compartiment ou par exploitation selon les possibilités)**			
	Prise de sang	Prélèvement sur 10 porcs du lot	Sérologie (Salmotype)		

\* pour 1 lot (correspondant à 1 compartiment)

\*\* les analyses portent sur 25 g ; on conseille donc de prélever au minimum 50 g de la façon la plus représentative possible

\*\*\* la norme NF EN ISO 6579 n'a pas été testée dans le cadre du projet *Salmonella*-free

Tableau 5 : protocole de prélèvement, méthodes de détection de *Salmonella* et critères à l'abattoir et en distribution

Protocole de prélèvement et méthodes de détection recommandés				Critères	
Lieu de prélèvement	Echantillon	Quantité analysée	Méthode de détection	GMP ou légaux	Définis sur base du projet
A l'abattoir *	Contenu du caecum	5 g (10 porcs du lot)	ISO 6579***, VIDAS SLM, iQ-Check		Si contamination d'un lot, en informer le vétérinaire, dresser un plan de lutte contre <i>Salmonella</i> et appliquer un screening plus poussé.
	Pilier du diaphragme	Prélèvement sur 10 porcs du lot	Sérologie (Salmotype)		
	Carcasses (écouvillons)	Ecouvillonnage de 5 pools par semaine	Diasalm, ISO 6579***, VIDAS SLM, Probelia/iQ-Check		
Distribution	Morceau de découpe (épaule, filet, jambon,...)	25 g de différents morceaux**	Diasalm, ISO 6579***, VIDAS SLM, Probelia/iQ-Check		Viandes hachées : absence dans 10 g (n=5 et c=0)**** Préparations de viande : absence dans 1 g (n=5 et c=0)****
	Jambon, épaule, filet, lard, haché	25 g de différents morceaux**	Diasalm, ISO 6579***, VIDAS SLM, Probelia/iQ-Check		

\* pour 1 lot (correspondant à 1 compartiment)

\*\* Les analyses portent sur 25 g ; on conseille donc de prélever au minimum 50 g de la façon la plus représentative possible

\*\*\* la norme NF EN ISO 6579 n'a pas été testée dans le cadre du projet *Salmonella*-free

\*\*\*\* n=nombre d'unités composant l'échantillon et c = nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs positives (directive 94/65/CEE)

### III. Échantillonnage : matériel et méthodes

#### 1. En exploitation

##### 1.1. Matériel à prévoir

1. combinaison à usage unique;
2. bottes propres ;
3. sur-bottes en plastique à usage unique ;
4. gants à usage unique (latex, nitrile, ...);
5. surchaussures en polypropylène non tissé ;
6. sachets de prélèvements ;
7. marqueur ;
8. pissette d'alcool ;
9. frigo-box avec glaçons (transport).

*Photo 1 : Matériel à prévoir pour l'échantillonnage en exploitation.*



## 1.2. Règles d'hygiène

1. pénétrer dans l'exploitation via le sas d'entrée ;
2. se laver soigneusement les mains à l'aide de savon bactéricide ;
3. se vêtir d'une combinaison à usage unique;
4. se chausser de bottes propres (lave-bottes) recouvertes de sur-bottes en plastique à usage unique. Les sur-bottes doivent être changées avant de pénétrer dans chaque nouveau compartiment (un compartiment étant défini comme un ensemble fermé de loges).



*Photo 2 : Lave-bottes disposé à l'entrée du compartiment.*



*Photo 3 : Du bon usage du lave-bottes.*



*Photo 4 : Se chauffer de sur-bottes avant de pénétrer dans un compartiment.*



*Photo 5 : Tremper ses bottes dans le pédiluve prévu à cet effet avant d'entrer dans un compartiment.*



### 1.3. Mode opératoire

1. identifier clairement les sachets de prélèvements ;
2. mettre des gants ;
3. prélever un échantillon d'aliment dans plusieurs auge ;
4. changer de gants ;
5. chausser des surchaussures en entrant dans un compartiment, ;
6. collecter sur le sol des matières fécales fraîches dans 5 loges différentes ;
7. changer de gants ;
8. disposer les surchaussures dans un autre sachet de prélèvement.

*Photo 6 : Identification précise des sachets de prélèvements.*



*Photo 7 : Chausser les surchaussures par dessus les sur-bottes.*



*Photo 8 : Se promener dans les différentes loges afin de prélever un échantillon de matière fécale.*



*Photo 9 : Collecter sur le sol des matières fécales fraîches dans 5 loges différentes.*



*Photo 10 : Placer les matières fécales dans le sachet toujours avec le même gant.*



*Photo 11 : Changer de gants pour enlever les surchaussures.*



*Photo 12 : Disposer les surchaussures dans un autre sachet avec une seconde paire de gants.*



Il est très important de respecter les mesures d'hygiène en vigueur dans les porcheries afin de ne pas propager d'éventuels agents pathogènes. Il faut donc se laver et se désinfecter les mains entre chaque prélèvement, changer de surbottes et passer par le pédiluve avant d'entrer dans un nouveau compartiment. Si la salopette est souillée par des matières fécales, il est nécessaire d'en revêtir une neuve avant de poursuivre dans un autre compartiment.

## **2. A l'abattoir**

### **2.1. Matériel à prévoir**

1. Gants ;
2. Pissette d'alcool ;
3. Outils stériles : 1 scalpel et des lames, 2 pinces ;
4. Colliers colson ;
5. Cuillères en plastique stériles ;
6. Récipients ou sachets de prélèvement stériles ;
7. 1 couteau ;
8. Tubes pour morceau de diaphragme ;
9. Matériel d'écouvillonnage (cotons stériles dépourvus de substances inhibitrices, sac stomacher, peptone-sel en flacons, bec bunsen, briquet, pince, alcool et gants à usage unique, marqueur indélébile).



*Photo 13 : Matériel nécessaire pour les prélèvements de contenu de caecum et de muscle du pilier du diaphragme.*



*Photo 14 : Matériel nécessaire à l'écouvillonnage des carcasses de porcs.*



## **2.2. Règles d'hygiène**

Respecter les règles en vigueur dans chaque abattoir. Prévoir une tenue spécifique blanche : salopette, bottes et un casque de protection recouvrant une charlotte couvrant complètement les cheveux.

Avant d'entrer dans le secteur propre et les frigos de l'abattoir :

- se laver et se désinfecter convenablement les mains au moyen d'un savon bactéricide ;
- passer les bottes au lave-bottes.

Il est vivement recommandé de circuler uniquement dans le secteur propre de l'abattoir. Si toutefois, le passage par le secteur sale ne peut être évité, une procédure de désinfection des mains et des bottes doit être opérée avant de pénétrer dans le secteur propre.

Changer de salopette entre les prélèvements sur la chaîne d'abattage (contenu caecal et diaphragme) et les écouvillonnages dans les frigos.

## **2.3. Mode opératoire**

### ***1. Identification des porcs***

En vue de faciliter les prélèvements successifs sur un même porc, il est nécessaire de bien l'identifier. Pour plus de facilité, il est conseillé de prendre note du numéro d'abattage. En outre, la pose d'un collier colson à une des pattes postérieures dès l'entrée du porc dans le secteur propre permettra de le suivre jusque dans le frigo.

*Photo 15 : Identification des porcs à l'aide d'un colson.*



## ***2. Prélèvement du contenu du cæcum***

Tous les abats blancs sont déposés dans un sac ou dans un bac propre. On veillera avant tout à identifier clairement les bacs avant d'y déposer les abats blancs.

*Photo 16 : Récupération des abats blancs (viscères digestifs).*



Le cæcum est individualisé du reste de la masse du tractus gastro-intestinal. Une incision médiane est pratiquée et les bords de celle-ci maintenus écartés à l'aide de pinces.

*Photo 17 : Individualiser le caecum du reste du tractus gastro-intestinal.*



*Photo 18 : Pratiquer une incision médiane en veillant à maintenir écartées les parois.*



Le contenu cæcal doit être prélevé à l'aide d'une cuillère stérile à usage unique, en évitant de toucher les bords de l'incision. Le contenu cæcal ayant débordé du cæcum ne devra faire l'objet d'aucun prélèvement. Au moins 5 grammes de contenu seront enfin déversés dans un tube stérile préalablement identifié.

*Photo 19 : Prélever le contenu cæcal à l'aide d'une cuillère stérile en évitant d'entrer en contact avec les parois.*



*Photo 20 : Déverser au moins 5 g de contenu cæcal dans un tube stérile prévu à cet effet.*



Entre chaque prélèvement :

- changer de gants ;
- nettoyer et désinfecter les ustensiles ;
- se laver et se désinfecter correctement les mains.

### ***3. Prélèvement du pilier du diaphragme***

En vue de doser les anticorps anti-*Salmonella*, le plus facile est de prélever un morceau de pilier du diaphragme. Toutefois, des prélèvements de sang peuvent être réalisés si les infrastructures s'y prêtent (ex : saignée horizontale des porcs sur une table de saignée). Il est préférable d'établir des comparaisons entre lots en se basant sur les mêmes prélèvements.

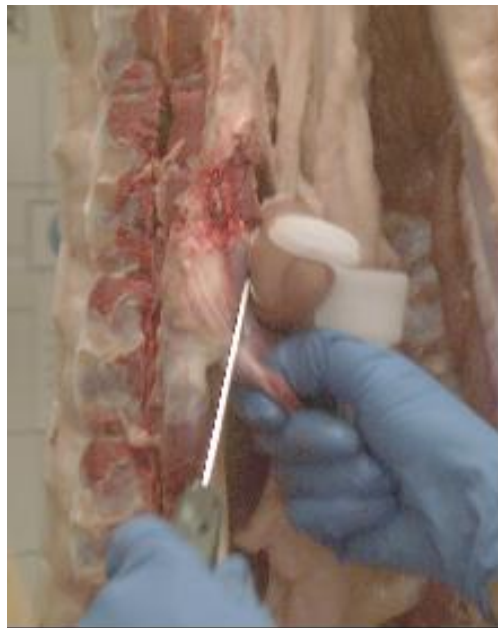
Un morceau de muscle du pilier du diaphragme sera excisé au moyen d'un couteau stérile et disposé dans un tube muni d'un système de collection du jus de décongélation. Ne pas inclure de gras ni d'aponévrose dans le prélèvement.

Nettoyer et désinfecter le couteau et les mains entre chaque prise.

*Photo 21 : Identifier le muscle du pilier du diaphragme sur la carcasse.*



*Photo 22 : Prélever un échantillon de muscle du pilier du diaphragme.*





*Photo 23 : Disposer l'échantillon dans un tube avec système de récupération du jus de décongélation.*



Les tubes sont ensuite placés au congélateur. C'est le jus de décongélation qui servira à réaliser le test sérologique de type Elisa.

#### ***4. Ecouvillonnage des carcasses***

Chaque semaine, 5 pools de 5 carcasses de porcs appartenant à un même lot doivent être échantillonnées sur une seule journée. La fréquence peut être réduite à un test tous les quinze jours si des résultats satisfaisants sont obtenus pendant six semaines consécutives. Le jour de l'échantillonnage doit être modifié chaque semaine de manière à couvrir chaque jour de la semaine. Les

échantillons doivent être prélevés entre 2 et 4 heures après l'abattage et doivent être représentatifs de la production de la journée avec au minimum un échantillon prélevé à la mi-journée.

Il faut prévoir quatre écouvillons en coton par carcasse correspondant aux quatre zones d'écouvillonnage, soit une surface totale d'approximativement 600 cm<sup>2</sup> :

- **zone A** : face interne musculaire du jambon en débordant sur la couenne ( $\pm 100$  cm<sup>2</sup>) ;
- **zone B** : partie postérieure de l'intérieur du bassin ( $\pm 100$  cm<sup>2</sup>) ;
- **zone C** : sternum et muscles sternocéphaliques ( $\pm 300$  cm<sup>2</sup>), et
- **zone D** : face postérieure du membre antérieur ( $\pm 100$  cm<sup>2</sup>).

Une paire de gants à usage unique servira à l'écouvillonnage d'une seule carcasse.

Chaque écouvillon en coton doit être sorti de façon stérile du bocal au moyen d'une pince qui sera ensuite systématiquement stérilisée (alcool à brûler + flamme).

L'écouvillon doit ensuite être humidifié avec une solution stérile de diluant (solution de peptone-sel). La face humide de l'écouvillon doit être frottée sur la surface de la carcasse d'abord verticalement, puis horizontalement et, enfin, en diagonale. La même procédure doit être répétée avec la surface sèche du coton.

Figure 1 : Zones d'écouvillonnage des carcasses de porcs telles que définies par l'arrêté royal du 28 août 2002

Photo 24 : Jambon et bassin à écouvillonner

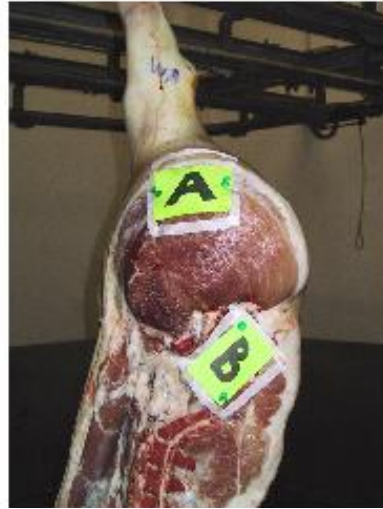
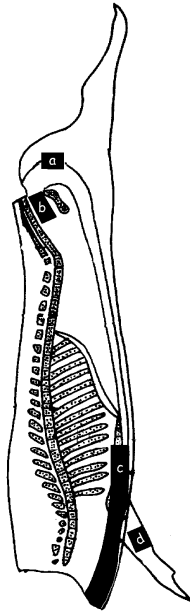


Photo 25 : Trace de saignée et face postérieure de la patte antérieure à écouvillonner.





## IV. Transport des échantillons au laboratoire

Nous attirons l'attention sur le fait que le transport des échantillons prélevés en ferme et à l'abattoir doit se faire au plus vite et dans les meilleures conditions, c'est-à-dire en les disposant dans un frigo box maintenu au froid au moyen de glaçons. L'emploi de film isolant permet d'éviter le contact direct des échantillons avec la glace. Une fois au laboratoire, les échantillons devront être analysés dans les 24 heures.

*Photo 26 : Transport des échantillons à l'aide d'un frigo-box maintenu au froid.*





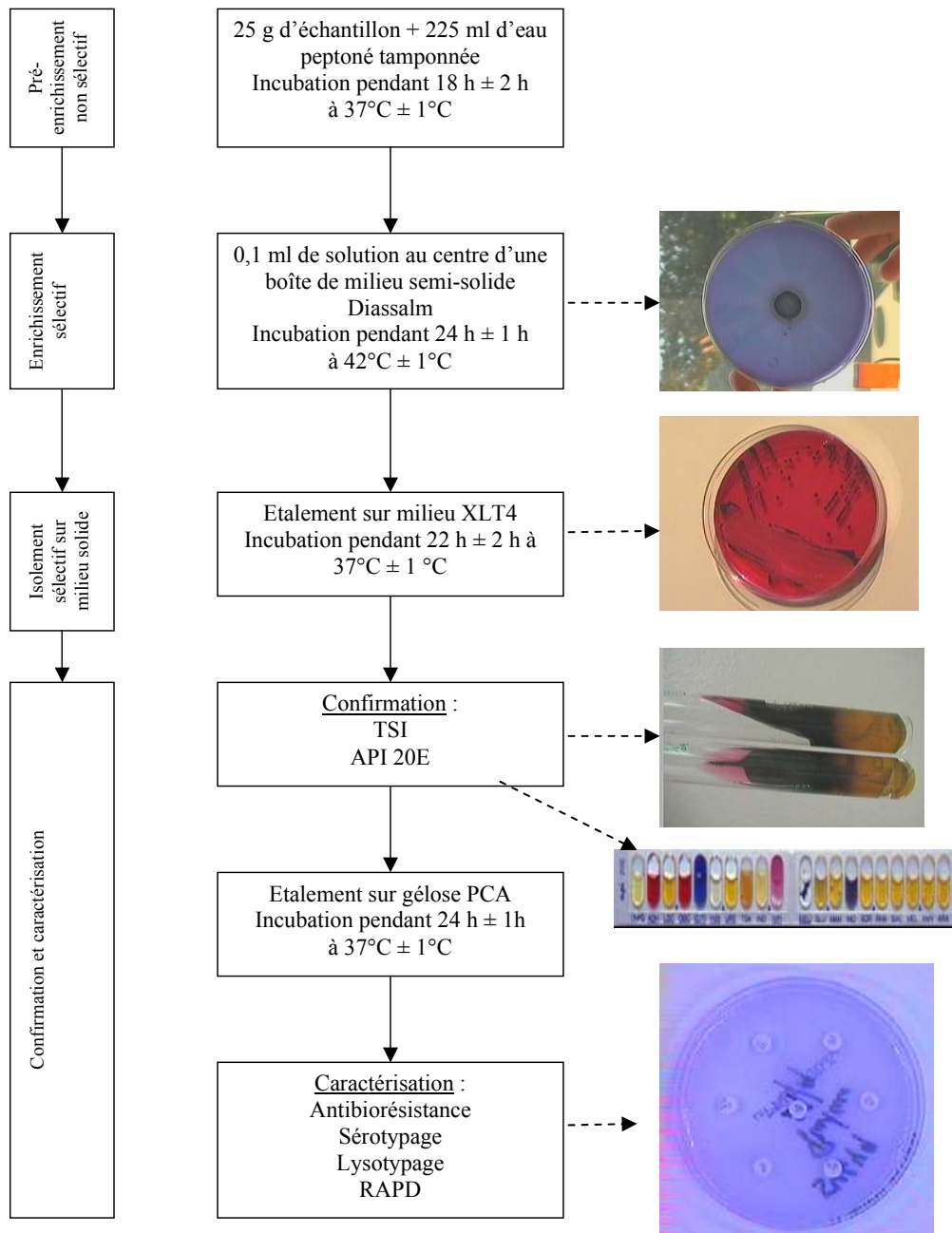
## V. Méthodes d'analyse

### 1. Méthodes bactériologiques pour la recherche de *Salmonella*

Le protocole d'analyse bactériologique « Diassalm » est basé sur la méthode SP-VG-M002 reconnue officiellement par le Ministère Belge de la Santé Publique pour la détection de *Salmonella* dans les viandes et les produits de viande. Cette méthode a validé l'utilisation du milieu semi-solide « Diassalm » (Lab M) apparenté au milieu semi-solide Rappaport-Vassiliadis modifié (MSRV). Le « Diassalm » est composé d'agents sélectifs comme le vert de malachite et la novobiocine et permet la détection des salmonelles sur base de leur mobilité et de la température d'incubation. L'avantage du « Diassalm » repose sur la rapidité de lecture des boîtes négatives après enrichissement. Par contre, cette méthode demande davantage de temps pour la confirmation des résultats et ne permet pas la détection des *Salmonella* non mobiles ; ces dernières sont cependant très peu fréquentes.

La prise d'essai (matière fécale, aliment, viande), en général de 25 g à l'exception des surchaussures et des écouvillons, est diluée au dixième dans de l'eau peptonnée tamponnée (BPW). Après un enrichissement non sélectif en BPW de  $18 \pm 2$  heures à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 100  $\mu\text{l}$  de la suspension mère sont déposés au centre d'une boîte « Diassalm », dont la composition standard (décrite à l'annexe 2) est supplémentée par de la novobiocine. Les boîtes de « Diassalm » sont alors incubées à  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant  $24 \pm 1$  heures. Les isolements à partir des boîtes suspectes ont lieu sur milieu XLT4 (annexe 2), composé de xylose, de lysine et de tergitol 4 (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France). Après une incubation de  $22 \pm 2$  heures à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , les colonies suspectes apparaissant rose-rouges et pourvues d'un centre noir sont repiquées sur une pente et en profondeur de Triple Sugar Iron (TSI). L'identification définitive se fait enfin au moyen d'une galerie API 20E comprenant une vingtaine de tests biochimiques.

*Figure 2 : méthode bactériologique « Diassalm ».*

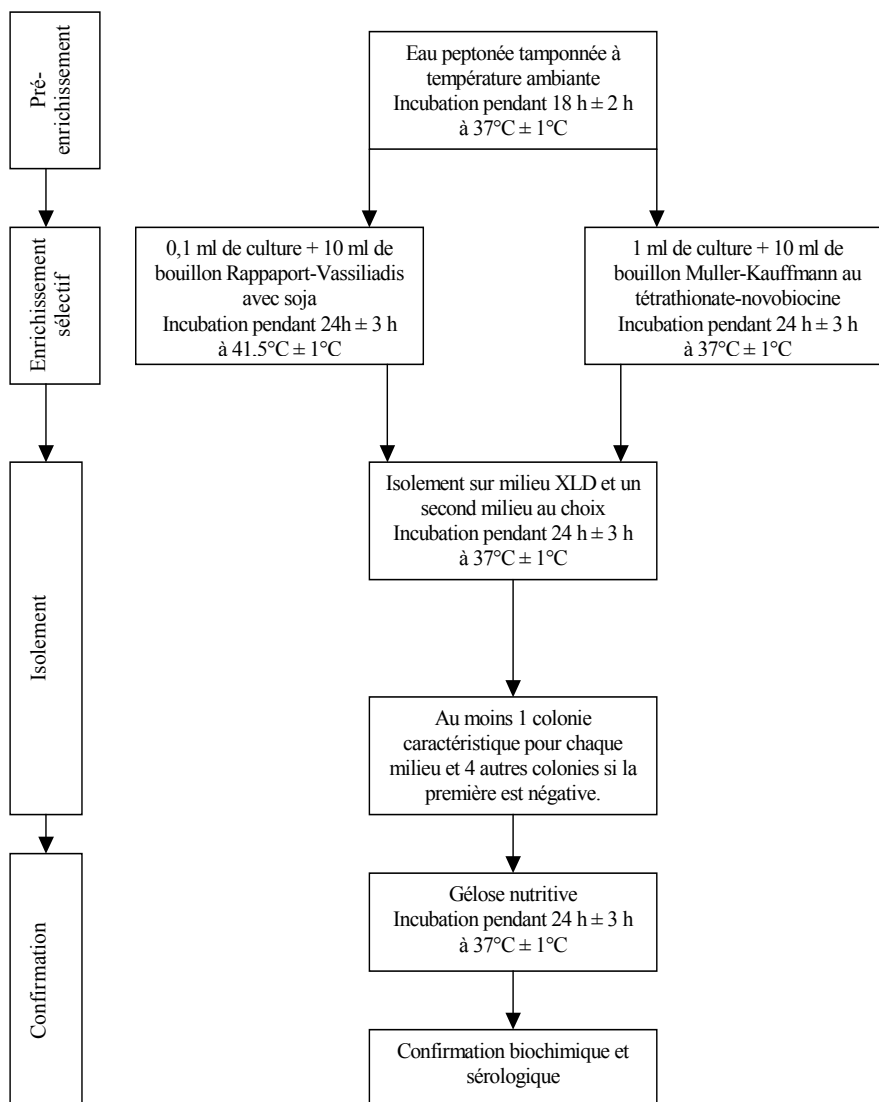




D'autre part, une nouvelle version de la norme ISO 6579 a été validée pour la détection de *Salmonella spp.* N'étant disponible que depuis décembre 2002, elle n'a malheureusement pas pu être testée lors de l'étude *Salmonella-free*. La figure 3 reprend le schéma du mode opératoire. Ses similitudes avec le protocole VIDAS SLM, validé avec succès lors du programme de recherche, laissent présager de bonnes performances pour les échantillons de la filière.

Après ensemencement de la prise d'essai de 25 g dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée à température ambiante, le sac à stomacher est incubé à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 18 heures  $\pm 2$  heures. L'enrichissement en milieux sélectifs liquides fait appel aux bouillons Rappaport-Vassiliadis (RVS) avec soja et Muller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) avec la culture précédemment obtenue. Après incubation du bouillon RVS à  $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 24 heures  $\pm 3$  heures et du bouillon MKTTn à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 24 heures  $\pm 3$  heures, les cultures sont ensemencées sur deux milieux sélectifs solides. Il s'agit de la gélose xylose lysine désoxycholate (XLD) et d'un autre milieu sélectif solide approprié, laissé au choix du laboratoire, complémentaire du milieu gélose XLD, permettant la recherche de *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella Typhi* et *Salmonella Paratyphi*. L'incubation du milieu gélose XLD a lieu à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 24 heures  $\pm 3$  heures. Pour la confirmation, au moins une colonie considérée comme caractéristique ou suspecte sera prélevée à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs et ensemencée sur la surface de boîtes de gélose nutritive préalablement séchées. Ces dernières seront incubées à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 24 heures  $\pm 3$  heures. Si cette colonie s'est révélée négative, la procédure sera répétée à partir de quatre autres colonies. L'identification définitive se fait enfin au moyen de tests biochimique et sérologique.

Figure 3 : Schéma du mode opératoire selon la norme NF EN ISO 6579.



## 2. Méthode de détection par amplification génique

En plus d'une grande sensibilité, la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) offre une réponse rapide, soit en 24 heures. Elle rend possible la détection des *Salmonella* mobiles et non mobiles. Par contre, elle ne permet pas d'isoler la souche en fin de process. Il faut donc nécessairement disposer d'une méthode bactériologique fiable afin d'isoler et de caractériser les souches.

### PCR à l'aide du kit Probelia

Plusieurs kits d'amplification et de détection sont commercialisés, notamment Probelia™ *Salmonella sp.* (Bio-Rad). Cette méthode rapide de recherche a été validée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) pour une série d'échantillons d'aliments destinés à l'homme (Dilasser *et al.*, 1997). Cependant, cette méthode n'a pas été validée pour des matrices non alimentaires.

Le protocole PCR est divisé en trois étapes : extraction, amplification et détection. Après une incubation de  $18 \pm 2$  heures à  $37^\circ\text{C}$  de 25 grammes d'échantillons dilués dans 225 ml d'eau peptonnée tamponnée, 1 ml est transféré dans un tube Eppendorf et est centrifugé pendant 2 à 3 minutes à 12 000 rpm. Le surnageant est ensuite éliminé.

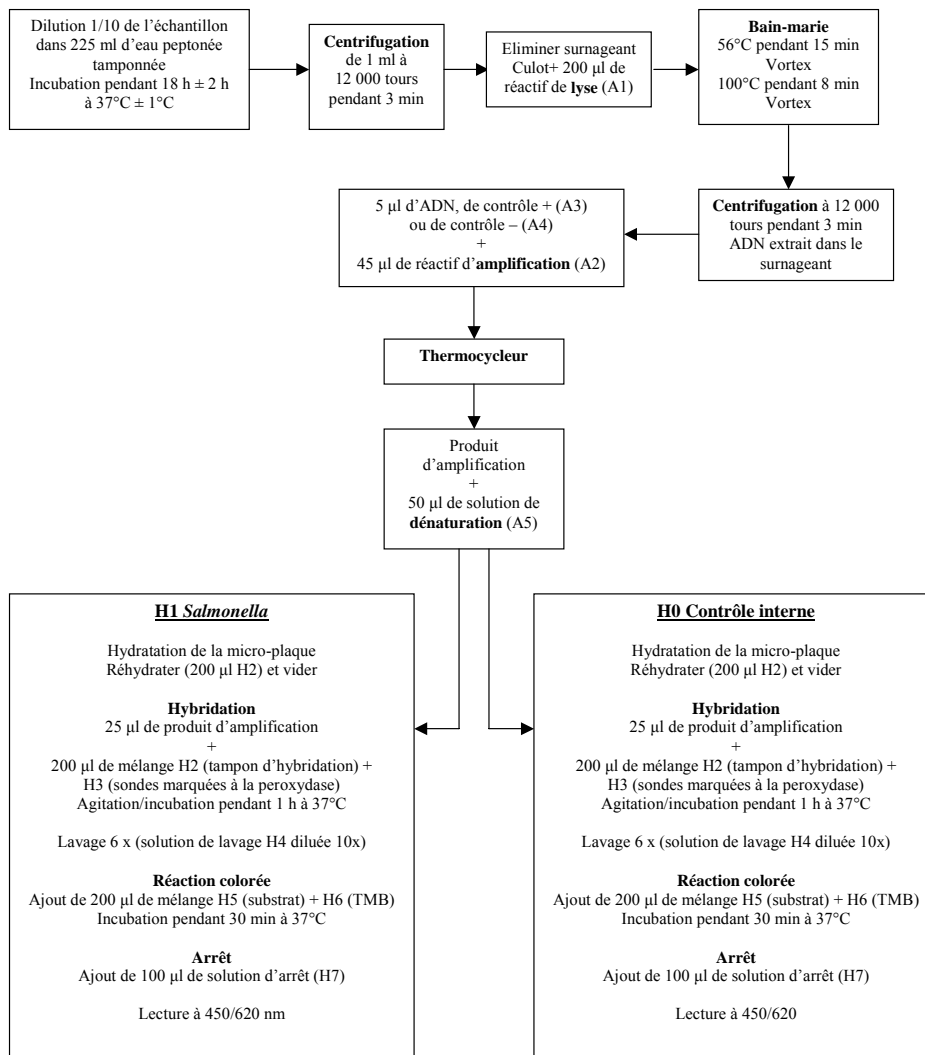
Après avoir ajouté 200  $\mu\text{l}$  de réactif de lyse, les tubes sont soumis à une première incubation ( $56^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes), puis à une seconde ( $100^\circ\text{C}$  pendant 8 minutes) pour l'extraction d'ADN. Après ces phases d'incubations, une seconde centrifugation est opérée (12 000 rpm pendant 3 minutes). Ensuite, 5  $\mu\text{l}$  du surnageant contenant de l'ADN bactérien sont transférés dans un micro-tube et 45  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel sont ajoutés aux échantillons et aux contrôles (un positif et deux négatifs) pour initier l'étape d'amplification. Celle-ci est régulée par le thermocycleur qui répète

un nombre déterminé de cycles de températures. L'amplification achevée, une solution de dénaturation est distribuée aux échantillons et aux contrôles.

Pour la détection, deux types de cupules sont utilisés ; les unes servant de contrôle interne, les autres étant spécifiques de la partie amplifiée du génome de *Salmonella*. Différentes solutions tampons sont distribuées en vue de l'hybridation (figure 4), de la réaction colorimétrique et enfin, de l'arrêt de la réaction. Les deux plaques sont lues au moyen d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 et de 620 nm. Une Densité Optique (DO) supérieure à 0,070 pour l'échantillon et pour le contrôle interne signifie que l'échantillon contient des *Salmonella spp.* À l'inverse, une DO inférieure à 0,070 pour l'échantillon et supérieure à 0,070 pour le contrôle interne signifie une absence. Dans le cas d'une inhibition de la PCR, les valeurs du contrôle interne sont inférieures à 0,070 et aucune interprétation ne peut être faite.

La figure 4 donne le protocole suivi pour la PCR à l'aide du kit Probelia.

Figure 4 : Protocole PCR utilisant le kit Probelia™  
(Bio-Rad, Marnes La Coquette-France).



Le recours au kit Probelia donne de bons résultats avec les échantillons de matières premières et d'aliments finis ainsi qu'avec les écouvillons de carcasses. Par contre, les échantillons de nature fécale (matière fécale, surchaussures, lisiers et cæcum) conduisent à beaucoup d'inhibitions.

### **PCR à l'aide du kit iQ-Check**

Une autre alternative consiste à recourir au test automatisé iQ-Check (Bio-Rad). Ce dernier permet, après ajout de lysozyme (Muramidase, Roche) lors du mélange du réactif de lyse au culot obtenu après centrifugation d'1 ml d'échantillon pré-enrichit en eau peptonée tamponnée et dilution au dixième du surnageant obtenu après incubation à 100 °C et contenant les acides nucléiques, de réduire considérablement le nombre d'inhibitions pour les échantillons de nature fécale. De plus, iQ-Check offre un gain de temps appréciable lors des analyses de routine.

Le protocole suivi pour la détection de *Salmonella* à l'aide du kit iQ-Check dans les différents échantillons est le suivant :

- a) Enrichissement :
  - Homogénéiser 25 g d'échantillon dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée dans un sac stomacher avec filtre incorporé ;
  - Incuber pendant 18 h ± 2 heures à 37 °C ;
  - Prélever 1 ml de la suspension enrichie pour l'extraction de l'ADN.
  
- b) Extraction des acides nucléiques :
  - Centrifuger à 13.000 tours/minute pendant 4 minutes et éliminer le surnageant ;
  - Ajouter 160 µl de réactif de lyse et 40 µl de lysozyme Muramidase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) au culot obtenu, mélanger et vortexer ;
  - Incuber dans un bloc chauffant à 100 °C pendant 15 minutes ;

- Vortexer et centrifuger à 13.000 tours/minute pendant 4 minutes ;
- Réaliser une dilution au dixième du surnageant obtenu ;
- Prélever 5 µl de la solution diluée pour l'amplification.

c) Amplification :

- Préparer le mélange réactionnel iQ-Check en fonction du nombre d'échantillons et de contrôles à analyser ;
- Répartir 45 µl de ce mélange réactionnel par puits ;
- Ajouter 5 µl d'échantillon (solution diluée) ou de contrôle.

Le programme des températures suivi pour cette PCR est donné au tableau suivant.

*Tableau 6 : Programme des températures pour la détection de Salmonella à l'aide du test iQ-Check.*

Cycle	Répétition	Etapas	Durée	Température
1	1	1	2 min	50°C
2	1	1	5 min	95°C
3	50	1	20 sec	95°C
		2	30 sec	55°C
		3	30 sec	72°C
4	1	1	...	72°C



Après la réaction d'amplification, le logiciel iCycler permet une analyse rapide des données.

Pour la validation du test, les résultats des contrôles doivent être les suivants :

	Détection de <i>Salmonella</i> (FAM-490)	Détection du contrôle interne (Texas Red-575)
Contrôle négatif	Ct=0	Ct>0
Contrôle positif	Ct>0	Non significatif

L'interprétation des résultats obtenus sur les échantillons est telle

Détection de <i>Salmonella</i> (FAM-490)	Détection du contrôle interne (Texas Red-575)	Interprétation
Ct>0	Non significatif	Positif
Ct=0	Ct>0	Négatif
Ct=0	Ct=0	Inhibition

que :

FAM et Texas Red sont les deux fluorophores, le premier pour *Salmonella*, le second pour le contrôle interne.



### 3. Test immuno-enzymatique VIDAS SLM

VIDAS *Salmonella* est un test immuno-enzymatique, permettant la détection d'antigènes de *Salmonella* par la méthode ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) grâce au système automatisé VIDAS.

Le cône à usage unique sert à la fois de phase solide et de système de pipetage pour le test. L'intérieur du cône est recouvert d'anticorps anti-*Salmonella* adsorbés sur sa surface. Les autres réactifs sont prêts à l'emploi et sont pré-répartis dans la cartouche.

Toutes les étapes du test sont réalisées automatiquement. Une fraction aliquote du bouillon d'enrichissement est placée dans la cartouche et l'échantillon subit un cycle d'aspiration/refoulement. Les antigènes présents dans le milieu vont se fixer sur les anticorps monoclonaux anti-*Salmonella* tapissant l'intérieur du cône. Après lavage, les anticorps conjugués marqués à la phosphatase alcaline sont aspirés/refoulés dans le cône et vont se fixer sur les antigènes de *Salmonella*, eux-mêmes fixés sur les anticorps de la paroi du cône.

De nouvelles étapes de lavage éliminent le conjugué non fixé. L'enzyme du conjugué catalyse la réaction d'hydrolyse du substrat ajouté (4-Méthyl-ombelliférophosphate) en un produit (4-Méthyl-ombelliféron) dont la fluorescence émise est mesurée à 450 nm.

A la fin du test, les résultats sont analysés automatiquement par l'ordinateur qui fournit une valeur test pour chaque échantillon. Cette valeur est comparée à des références internes (seuils) et chaque résultat est interprété (positif/négatif).

Selon le type d'échantillons à analyser, différents protocoles sont proposés. Les figures 5 et 6 présentent les protocoles respectivement pour les échantillons de nature fécale (matières fécales, surchaussures, lisiers et contenus de cæcum) et pour les autres prélèvements (écouvillons de carcasses, viandes, aliments finis et matières premières).

Figure 5 : Protocole de détection de Salmonella par VIDAS SLM pour les échantillons de matière fécale, de lisier, de contenu de cæcum et les surchaussures (Biomérieux, Marcy l'étoile, France).

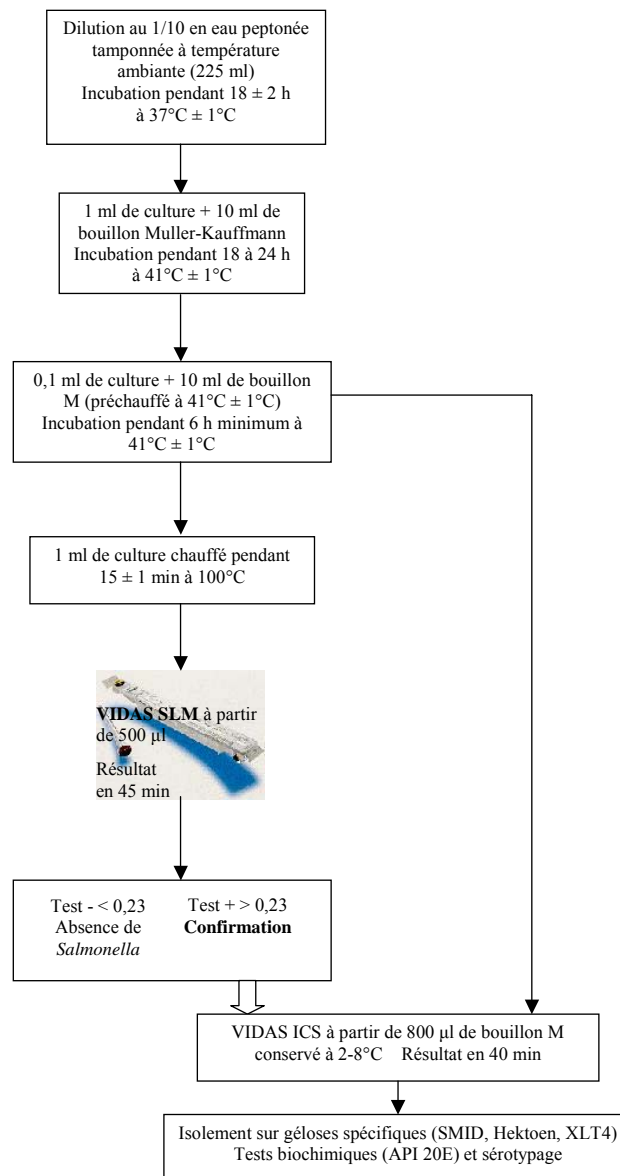
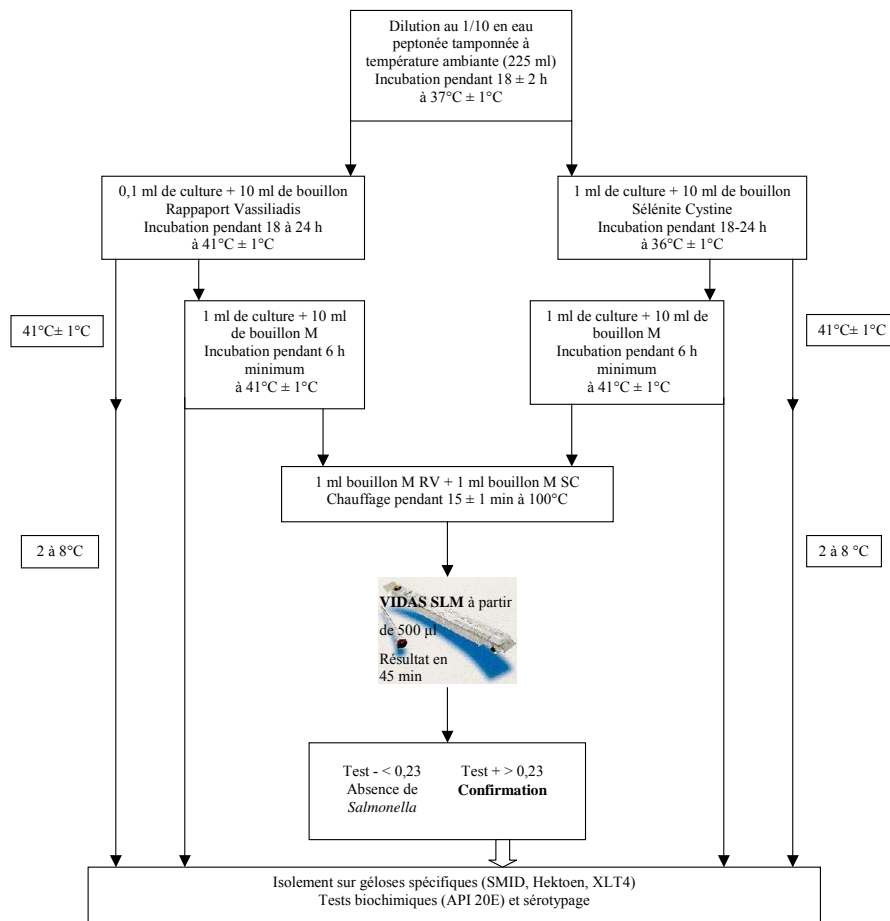


Figure 6 : Protocole de détection de *Salmonella* par VIDAS SLM pour les échantillons de matières premières, d'aliments finis, de viande et les écouvillons de carcasses (Biomérieux, Marcy l'étoile, France).



L'annexe 2 donne la composition de l'ensemble des milieux et bouillons intervenant dans les différents protocoles proposés dans le présent guide.

## 4. Sérologie

Il s'agit d'un test de type « ELISA » permettant la détection d'anticorps spécifiques contre *Salmonella*. Ce test peut être réalisé sur du sérum sanguin ou sur du jus de décongélation du muscle du pilier du diaphragme prélevé à l'abattoir. Il identifie les animaux qui ont été en contact avec des salmonelles durant leur vie mais n'indique pas si les porcs sont toujours porteurs au moment du test. De plus, si le porc vient d'être contaminé, et si la souche de *Salmonella* n'est pas suffisamment invasive, il se peut qu'il n'y ait pas encore eu séroconversion. Le test n'est donc pas adéquat pour une contamination récente.

En ferme, c'est à partir de sérum sanguin que l'on effectuera le test. À l'abattoir, pour des raisons de traçabilité et de facilité, on préférera le jus de décongélation du muscle du pilier du diaphragme. Pour chaque lot suivi à l'abattoir, le test sérologique s'effectuera à partir de prélèvements réalisés sur 5 à 10 % des porcs. L'idéal serait de réaliser ce test sérologique à partir des mêmes animaux que ceux qui auront été soumis aux analyses bactériologiques sur base des échantillons de contenu du cæcum.

Pour cette analyse, le kit commercial sérologique « Salmotype Pig LPS ELISA » (Labor Diagnostik, Leipzig) a été choisi.



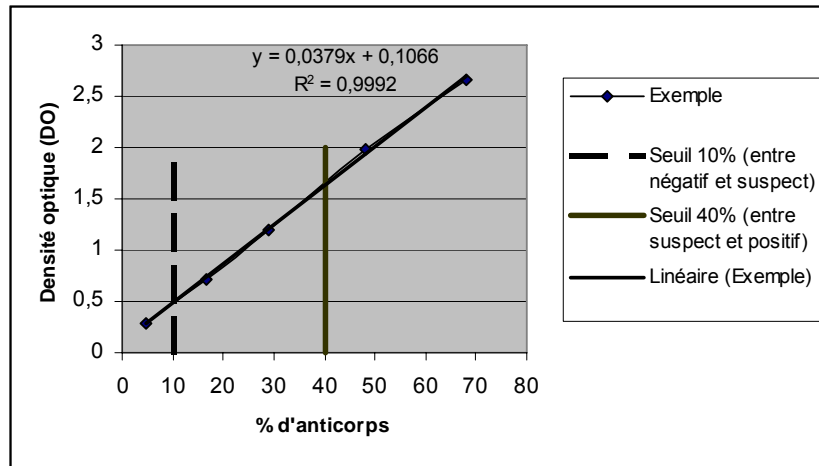
La détermination quantitative des anticorps anti-*Salmonella* dans les échantillons de jus de viande ou de sérum sanguin est effectuée par une réaction immuno-enzymatique. D'après le fabricant, il permet de détecter plus de 90 % des anticorps dirigés contre la plupart des sérotypes rencontrés.

Une micro-plaque a été sensibilisée avec les antigènes de salmonelles. Durant l'incubation de l'échantillon, les anticorps spécifiques anti-*Salmonella* se fixent et forment un complexe antigènes-anticorps. Les fractions non fixées sont éliminées par lavage. Un enzyme conjugué se liant aux anticorps précédemment fixés est ajouté. Les fractions non fixées sont à nouveau éliminées par lavage. Après addition d'une solution chromogène, une réaction colorée se développe. Celle-ci est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps présent dans l'échantillon. La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

Les résultats sont analysés à l'aide d'une courbe établie en portant, pour chaque sérum de contrôle, en abscisse sa concentration en anticorps et en ordonnée la densité optique obtenue. Le kit est composé de 5 sérums de contrôle de plus en plus concentrés. Chacun de ceux-ci est mesuré en double afin d'obtenir une valeur moyenne. Une droite de régression est enfin établie et, en y reportant les valeurs de densité optique obtenues pour chaque échantillon, la concentration en anticorps peut facilement être déduite (figure 7).

À la valeur de densité optique mesurée pour chaque contrôle, correspond une valeur de concentration en anticorps exprimée en pour cent. Cette valeur est fournie par le fabricant.

Figure 7 : Exemple de droite de régression « kit sérologique »



Dans l'exemple repris ci-dessus, les valeurs de densité optique (DO) et de concentrations sont les suivantes :

Tableau 7 : Exemple de résultats des contrôles d'un test sérologique.

	Concentration (%)	Moyenne des valeurs de DO
Contrôle 1	4,7	0,288
Contrôle 2	16,6	0,717
Contrôle 3	29	1,201
Contrôle 4	48,3	1,978
Contrôle 5	68,2	2,664

Grâce à la droite de régression et à son équation, le taux en anticorps de chaque échantillon, exprimée en pour cent, peut être calculée.

D'après le test, tous les échantillons ayant une concentration en anticorps supérieure à 40 % sont considérés comme positifs. Les échantillons compris entre 10 et 40 % sont suspects, et ceux inférieurs à 10 % sont négatifs. Les limites de densité optique correspondant à 10 % et 40 % sont propres à chaque plaque réalisée.

## **VI. Caractérisation des souches**

Le typage, basé sur des propriétés antigéniques (séro-agglutinations), sur l'expression de l'antibiorésistance ou sur des caractéristiques moléculaires propres à la souche de *Salmonella* étudiée, vise à différencier des souches isolées à partir d'échantillons différents et à pouvoir tracer l'origine d'une contamination. Il permet une meilleure connaissance des sources de contaminations et des voies de propagation.

Six méthodes de typage (classiques et moléculaires) développées durant la phase préliminaire de l'étude peuvent être appliquées en routine pour différencier les souches isolées. Il s'agit de l'étude de la résistance à six antibiotiques, du génotypage par « Random Amplified Polymorphism DNA » (RAPD) et par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (analyse sous-traitée au Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Melle), du sérotypage classique, du typage intra-sérotype par RAPD et du lysotypage (analyse sous-traitée à l'Institut Pasteur de Bruxelles).

L'annexe 3 reprend un tableau comparatif de différentes méthodes de typage bactérien comme outils épidémiologiques (d'après Dominique S. Blanc *et al.*, 1995).

### **1. Évaluation de la résistance des souches aux antibiotiques**

Les six antibiotiques utilisés pour la détermination des résistances (Tétracycline, Ampicilline, Chloramphénicol, Streptomycine, Triméthoprim et Acide Nalidixique) ont été sélectionnés d'après les résultats obtenus dans le cadre du programme 1998 et 1999 du plan de surveillance des zoonoses de l'Institut d'Expertise Vétérinaire (IEV) afin d'obtenir la meilleure discrimination des souches.

La souche pure de salmonelle après incubation de 24 heures à 37 °C sur gélose PCA est utilisée pour préparer l'inoculum. A cet effet, une tige « Inoclic » (IMP) standardise directement la quantité de l'inoculum dans 5 ml de sérum physiologique. Un écouvillon stérile est plongé dans la suspension, pressé sur la paroi pour en éliminer l'excédent et est finalement frotté sur une boîte de gélose Mueller-Hinton II (annexe 2) dans trois directions différentes afin d'obtenir une répartition homogène de l'inoculum en surface. Les antibiotiques présents sous forme de disques en papier sont placés en surface de la gélose grâce à un distributeur automatique.

Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 16 à 20 heures. La lecture est réalisée au moyen d'un pied à coulisse gradué avec une précision de l'ordre du dixième de millimètre et les diamètres sont interprétés suivant les limites propres à chaque antibiotique, comme préconisé par le « National Committee for Clinical Laboratory Standards » (NCCLS).



## 2. Sérotypage conventionnel

(Rowe, B. *et al.*, 1989 et Poppof, M. Y. *et al.*, 1997).

Le schéma suivi pour sérotyper les souches est celui établi par Kauffman-White. Les souches pures isolées sont d'abord testées avec du sérum physiologique afin de vérifier si elles n'auto-agglutinent pas. Si tel n'est pas le cas, la détermination se poursuit avec une batterie d'anti-sérums commerciaux qui donnent lieu à une agglutination si les anticorps présents sont complémentaires des antigènes de surface de la souche. Par essais et erreurs, le sérotype est finalement déduit des résultats des agglutinations. Pour les sérotypes les plus rares, les souches peuvent être envoyées pour



sérotypage au Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaire et Agrochimique (CERVA).

### **3. Lysotypage**

(Anderson ES *et al.*, 1977)

Le lysotypage est une technique très discriminante basée sur la lyse de la cellule bactérienne par des bactériophages. Elle nécessite cependant de posséder une collection de phages de lyse qui soit régulièrement titrée et demande une certaine expérience pour l'interprétation des résultats. C'est pourquoi, cette manipulation a été sous-traitée au service de lysotypie et de génétique bactérienne de l'Institut Pasteur de Bruxelles. Cette technique n'est encore appliquée qu'à un faible nombre de sérotypes. Seules les souches de *Salmonella* Typhimurium ont été typées par cette méthode.

Elle permet de définir des DT (Definitive Phage Type) ou encore des RDNC (Routine Dilution No Conformity). Les souches ne donnant aucune réaction avec la gamme des phages utilisés sont regroupées sous le symbole NT (non typable). Précisons que certaines ambiguïtés peuvent néanmoins subsister quant à l'interprétation des résultats obtenus. Dans certains cas par exemple, l'observation de réactions faibles avec le phage 18 rend la différence DT12 - DT104 peu significative.

### **4. Typage moléculaire par « Random Amplified Polymorphism DNA »**

Le sérotypage couplé à l'étude de l'antibiorésistance ne suffit pas toujours à opérer des distinctions entre les souches isolées. C'est pourquoi l'usage de la biologie moléculaire s'avère nécessaire puisqu'elle offre la carte d'identité ou empreinte génétique de la bactérie étudiée.

Le typage moléculaire vise la traçabilité des souches de *Salmonella* isolées dans les différents sites de prélèvements. Ceci doit permettre

une meilleure connaissance des sources de contamination et des voies de propagation. On déterminera par exemple si une souche isolée dans un aliment est identique à celle trouvée dans un élevage donné voire au sein de l'abattoir.

Sur base des essais réalisés au cours du premier mandat, une série de souches a été soumise à la RAPD. Seuls deux primers ont été utilisés à des fins de discrimination intra-sérotype ; il s'agit du primer P1254 (Hilton *et al.*, 1996, 1997) pour le sérotype Typhimurium et du primer P23L (Lin *et al.*, 1996) pour les autres sérotypes. Le génotypage à l'aide du primer D14307 (Shangkuan et Lin, 1998) (discrimination inter-sérotypes) a été abandonné au profit du sérotypage conventionnel et de l'antibiorésistance, les souches auto-agglutinables étant envoyées au CERVA.

Le protocole suivi pour le typage moléculaire est exposé à la figure 8.

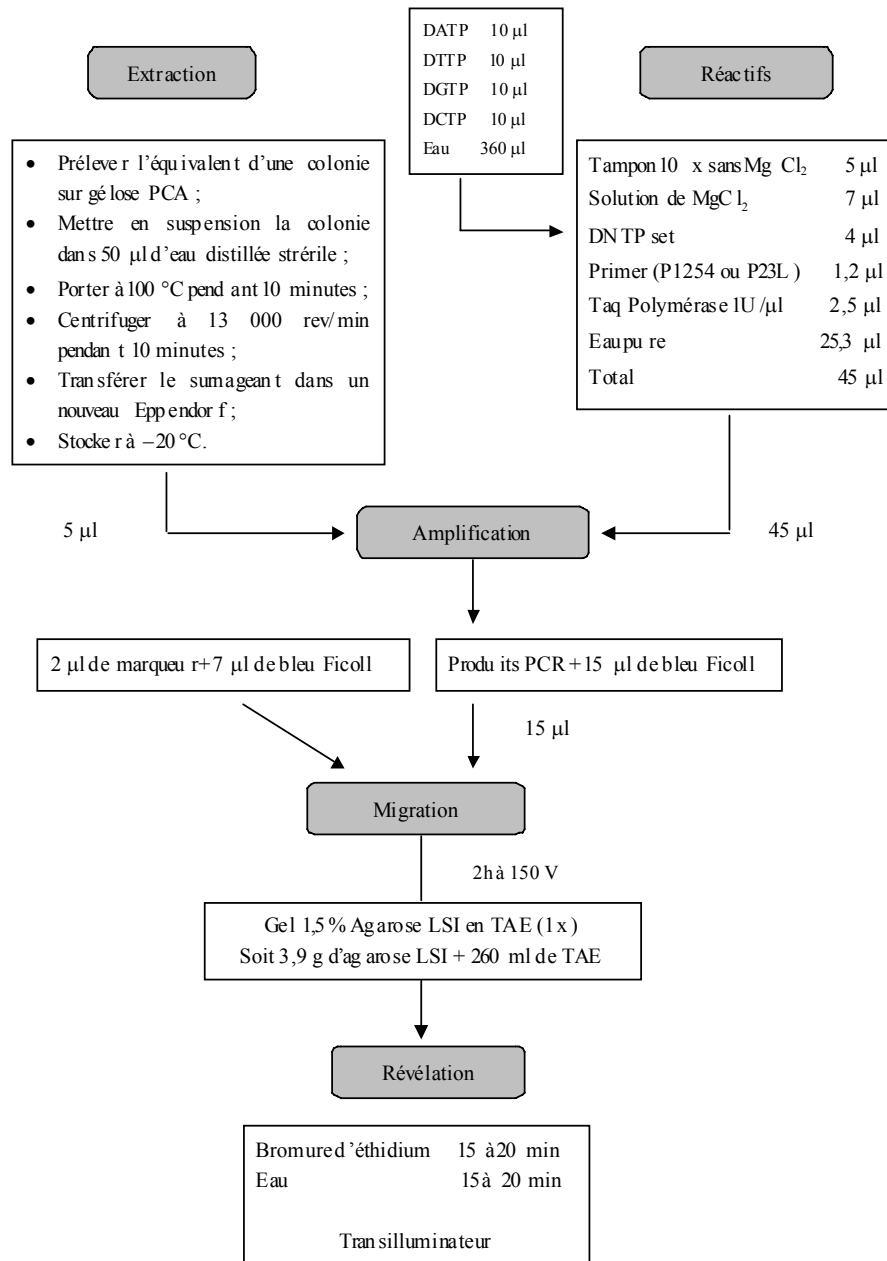
Le tableau ci-après présente le programme de température utilisé pour la PCR.

Tableau 8 : Programme de température utilisé pour la PCR.

Dénaturation	Appariement	Elongation	Nombre de cycles
94°C / 4 min 30 sec	-		1
94°C / 30 sec	20°C / 2 min	72°C / 2 min	5
94°C / 30 sec	32°C / 1 min	72°C / 2 min	35
-	-	72°C / 5 min	1
Cycle de maintien à 4°C indéfiniment			

Les produits d'amplification sont séparés par migration sur gel d'agarose 1,5 % sous voltage constant (150 V) et visualisés par fluorescence U.V.

Figure 8 : Protocole de typage moléculaire des souches de Salmonella par RAPD.



## 5. Typage moléculaire par « Pulse Field Gel Electrophoresis »

(Gautom, 1997 et Vlaemynck G. *et al.*, 1998)

Le sous typage moléculaire des souches de *Salmonella* a été sous-traité au Center for Agricultural Research-Ghent, Department for animal product quality (DVK).

Chacune des souches a été soumise à l'action d'au moins 2 enzymes de restrictions appartenant à la série *XbaI*, *SpeI*, *BlnI* et *NotI*, à l'exception de *Salmonella* Enteritidis qui a été typé par PFGE avec *XbaI* et par RAPD avec 4 primers différents (23L, OPB17, OPA4 et P1254). Les profils ont été classés en dendrogrammes à l'aide du logiciel GelCompar utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et l'algorithme de classification « unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA).

Tableau 9 : Enzymes de restrictions pour le typage de différents sérotypes de *Salmonella* par PFGE.

	XbaI	SpeI	BlnI	NotI
S. Typhimurium	x		x	
S. Brandenburg	x	x		
S. Infantis	x	x		x
S. Derby	x	x		
S. Bredeney	x	x		x
S. Goldcoast*				
S. Bovismorbificans	x	x		
S. Enteritidis	x			

\*pas de profils PFGE à partir des souches de ce sérotype (activité endonucléase qui dégrade l'ADN génomique).

En définitive, le recours au typage moléculaire par RAPD conduit à plus de discrimination, tant pour le sérotype Typhimurium (P1254) que pour les autres sérotypes testés (P23L). Toutefois, dans la majorité des cas, ces distinctions supplémentaires sont peu utiles pour l'étude de la traçabilité d'une contamination.

La RAPD permet donc de valider les résultats obtenus par d'autres méthodes de caractérisation comme les tests biochimiques (galerie API 20E), les antibiogrammes et la lysotypie, mais ne doit pas se substituer à l'ensemble de ces techniques. Inversement, la RAPD peut être utilisée en début de protocole de caractérisation, étant donné sa rapidité d'exécution, à condition d'être confirmée ultérieurement par d'autres méthodes (lysotypage par exemple).



## VII. Perspectives

Ce guide se veut avant tout pragmatique en énonçant une série de recommandations destinées à évaluer le statut en *Salmonella* des sites échantillonnés tout au long de la chaîne de production de viande de porc.

Il s'attache également à fournir un ensemble de méthodes de détection aux laboratoires en charge des analyses. Le test immuno-enzymatique VIDAS SLM semble le plus performant.

De même, l'amplification génique à l'aide du kit iQ-Check paraît une bonne alternative à la détection rapide de *Salmonella* dans les échantillons de nature fécale. Deux améliorations ont toutefois été apportées au protocole standard proposé par Bio-Rad : d'une part l'ajout de lysozyme lors du mélange du réactif de lyse au culot obtenu après centrifugation d'1 ml d'échantillon pré-enrichi en eau peptonée tamponnée, et d'autre part, la dilution au dixième du surnageant obtenu après incubation à 100 °C et contenant les acides nucléiques. La PCR en temps réel iQ-Check offre également un gain de temps appréciable lors des analyses de routine. Il est par contre impossible d'isoler les souches détectées au moyen de cette technique. Quelques inhibitions sont encore parfois constatées.

Le recours au test sérologique Elisa semble particulièrement intéressant pour évaluer le statut en *Salmonella* des exploitations. Dans ce cas, il s'agira d'établir un plan de prélèvement de sérum sanguin dans les fermes d'engraissement.

La détermination du statut en *Salmonella* des exploitations porcines devra donc faire appel à la fois aux méthodes bactériologique (ISO 6579), immuno-enzymatique (VIDAS SLM) et PCR (iQ-Check) ainsi qu'au test sérologique (Salmotype). Seule la combinaison de ces méthodes d'analyse permettra un diagnostic fiable ; ceci dans un objectif d'organisation des journées d'abattage de façon à réduire au maximum les contaminations croisées.

Le présent guide s'attache enfin à proposer différentes méthodes de caractérisation des souches isolées à des fins de suivi épidémiologique. Bien que le typage moléculaire permette d'opérer rapidement des distinctions significatives, les techniques plus traditionnelles comme l'étude de la résistance aux antibiotiques, le sérotypage par agglutination ou encore le lysotypage donnent aussi de bons résultats.



## VIII. Samenvatting

Deze pragmatisch opgestelde brochure beschrijft een aantal aanbevelingen die tot doel hebben het *Salmonella* statuut van een aantal bemonsteringsplaatsen langsheen de varkensproductiekolom te bepalen.

Deze brochure beschrijft een aantal *Salmonella* detectiemethoden die kunnen gebruikt worden door de analyselaboratoria. De immuno-enzymatische VIDAS SLM test blijkt het meest performant te zijn. De moleculaire amplificatie met behulp van de iQ-Check kit is eveneens een goed alternatief voor de snelle detectie van *Salmonella* in meststalen. Twee verbeteringen werden evenwel aangebracht aan het standaardprotocol voorgesteld door Bio-Rad. Enerzijds werd lysozyme toegevoegd tijdens de menging van het lysereagens aan het bezinksel bekomen na centrifugatie van het vooraf met 1 ml gebufferde pepton aangerijkt monster. Anderzijds werd een tienvoudige verdunning gemaakt van het supernatans dat bekomen werd na incubatie aan 100 °C en dat de nucleïnezuren bevatte. De real time PCR methode - iQ-Check -leverde een belangrijke tijds winst op in het geval van routineanalyses. Het is evenwel onmogelijk om de gedetecteerde stammen te isoleren met behulp van deze techniek. Enkele inhibitorische reacties worden eveneens af en toe waargenomen.

De serologische ELISA-test blijkt vooral interessant te zijn om het *Salmonella* statuut van de bedrijven te beoordelen. In dit geval volstaat het een bemonsteringsplan van bloedserum op te stellen in de vleesvarkensbedrijven.

Voor de bepaling van het *Salmonella* statuut van de bedrijven zal dus moeten beroep gedaan worden zowel op de bacteriologische (ISO 6579) en immuno-enzymatische (VIDAS SLM) methoden als op PCR (iQ-Check) en serologie (Salmotype). Enkel de combinatie van deze analysemethoden zal een betrouwbare diagnose toelaten; dit

met als doel om slachtdagen dermate te organiseren dat het optreden van kruisbesmettingen maximaal wordt voorkomen.

Deze brochure stelt verschillende methoden voor om geïsoleerde stammen te karakteriseren met de bedoeling om een epidemiologische opvolging uit te voeren. Niettegenstaande dat de moleculaire typering toelaat om snel een significant onderscheid te maken tussen stammen, bieden ook de meer traditionele methoden zoals de bepaling van de antibioticagevoeligheid, de serotypering door agglutinatie of nog de lysotypering goede resultaten in dit verband.

## IX. Références et adresses utiles

### Sites Internet

- Service Public Fédéral Santé Publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement : <http://www.belgium.be/>
- Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (A.F.S.C.A.) : <http://www.afsca.be>
- Direction générale de l'agriculture : <http://mrw.wallonie.be/dga/>
- Filière porcine wallonne : <http://www.fpw.be>
- Institut Technique du Porc <http://www.itp.asso.fr/>
- Laboratoire national de référence en microbiologie des denrées alimentaires : <http://mda04.fmv.ulg.ac.be/lnr>
- OVOCOM asbl : <http://www.ovocom.be/>
- Université de Liège-Faculté de médecine vétérinaire-Département des sciences des denrées alimentaires d'origine animale : <http://mda04.fmv.ulg.ac.be>

### Références bibliographiques

- Anderson, E.S., Ward L.R., de Saxe M.J., de Sa J.D.H. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J Hyg (Lond)*, **78**, 297–300.
- Blanc, D.S., Lausanne et Hans H. Siegrist. 1995. Typage bactérien : méthodes et valeur épidémiologique. Swiss-Noso, Volume2, n° 1.
- Hilton A.C., Banks J.G., Penn C.W. 1996. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) for *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 575-584.
- Hilton A.C., Banks J.G., Penn C.W. 1997. Optimization of RAPD fingerprinting *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**, 243-248.

- Lin A.W., Usera M.G., Barrett T.J., Goldsby A. 1996. Application of random amplification of polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. *J. Clin. Microb.*, **34**, 870-876.
- Lo Fo Wong., D.M.A. 2001. Epidemiology and control options of *Salmonella* in European pig herds. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Poppoff M.Y. and L. Le Minor. 1997. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, p. 151. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur 28, Paris.
- Romesh K. Gautam. 1997. Rapid pulse-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, n°11, 2977-2980.
- Rowe B. and M.L.M. Hall. 1989. Kauffman-White scheme, p. 77. Public Health Laboratory Service, London.
- Shangkuan Y.-H. and Lin H.-C. 1998. Application of random amplification of polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Typhi and other *Salmonella* species. *J. Appl. Bacteriol.*, **85**, 693-702.
- van der Wolf P.J. 2000. *Salmonella* in the pork production chain: feasibility of *Salmonella*-free pig production. Thesis 30 November 2000, Utrecht, The Netherlands, 199 p.
- Vlaemynck G., Pierard D., Pohl P., Imberechts H. and Heyndrickx M. (1998). PFGE as molecular epidemiological tool for *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *E. coli* O157. In: Proceedings 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin, Germany. I: 372-380.
- Wray C. and Wray A. 2000. *Salmonella* in domestic animals. CABI publishing. New York, USA.

# **Annexes**



**Annexe 1**  
**Tableau d'interprétation des essais**  
**biochimiques (NF EN ISO 6579)**





Essai <sup>a</sup>	Souche de <i>Salmonella</i>									
	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		Autres souches	
	Réaction	% <sup>b</sup>	Réaction	% <sup>b</sup>	Réaction	% <sup>c</sup>	Réaction	% <sup>c</sup>	Réaction	% <sup>b</sup>
Glucose, TSI (formation d'acide)	+	100	+	100	+		+		+	100
Glucose, TSI (formation de gaz)	- <sup>d</sup>	0	+	100	+		+		+	92
Lactose, TSI (formation d'acide)	-	2	-	100	-		-		-	1
Saccharose, TSI (formation d'acide)	-	0	-	0	-		-		-	1
Sulfure d'hydrogène, TSI	+	97	-	10	+		+		+	92
Hydrolyse de l'urée	-	0	-	0	-		-		-	1
Décarboxylation de la lysine	+	98	-	0	+		+		+	95
Réaction à la $\beta$ -galactosidase	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>e</sup>
Réaction de Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Recherche de l'indole	-	0	-	0	-		-		-	1

a De la référence EWING, W. H. and BALL, M. M. *The biochemical reactions of the genus Salmonella*. National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, Etats-Unis, 1996.

b Ces pourcentages indiquent seulement que toutes les souches de *Salmonella* ne donnent pas les réactions marquées + ou -. Ces pourcentages peuvent varier au sein d'un même sérotype et d'un sérotype à un autre pour les sérotypes ayant causé des empoisonnements alimentaires à différents endroits.

c Ces pourcentages ne sont pas référencés dans la littérature.

d *Salmonella* Typhi est anaérogène.

e Les *Salmonella enterica* du sous-genre arizonae donnent des réactions lactose positives ou négatives mais sont toujours  $\beta$ -galactosidase positives. Pour l'étude de ces souches, il peut être utile d'effectuer des essais biochimiques complémentaires.

**Annexe 2**  
**Composition des différents milieux**  
**et bouillons**

## **Eau peptonée tamponnée**

pH  $7,0 \pm 0,2$  à 25 °C

Digestat enzymatique de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Eau	1000 ml

## **Milieu semi-solide Diassalm**

pH  $5,5 \pm 0,2$  à 25 °C

Tryptone	20,0 g
Peptone	6,0 g
Sulfate ferreux ammoniacal	0,2 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Sucrose	7,5 g
Lactose	0,5 g
Bromocrésol pourpre	0,08 g
Oxalate de vert de malachite	0,037 g
Chlorure de magnésium anhydre	11,0 g
Agar n°1	2,8 g
Eau	1000 ml

# **Bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (RVS)**

pH  $5,2 \pm 0,2$  à 25 °C

## **Solution A**

Digestat enzymatique de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	8,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,4 g
Dipotassium hydrogénophosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,2 g
Eau	1000 ml

## **Solution B**

Chlorure de magnésium hexahydraté ( $\text{MgCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$ )	400,0 g
Eau	1000 ml

## **Solution C**

Oxalate de vert de malachite	0,4 g
Eau	100 ml

## **Milieu complet**

Solution A	1000 ml
Solution B	100 ml
Solution C	10 ml

**Bouillon Muller-Kauffmann au  
tétrathionate-novobiocine (MKTTn)  
pH 8,0 ± 0,2 à 25 °C**

**Milieu de base**

Extrait de viande	4,3 g
Digestat enzymatique de caséine	8,6 g
Chlorure de sodium (NaCl)	2,6 g
Carbonate de calcium (CaCO <sub>3</sub> )	38,7 g
Thiosulfate de sodium pentahydraté (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	47,8 g
Sels biliaires à usage bactériologique	4,78 g
Vert brillant	9,6 g
Eau	1000 ml

**Solution iodo-iodurée**

Iode	20,0 g
Iodure de potassium (KI)	25,0 g
Eau	100 ml

**Solution de novobiocine**

Sel monosodique de novobiocine	0,04 g
Eau	5 ml

**Milieu complet**

Milieu de base	1000 ml
Solution iodo-iodurée	20 ml
Solution de novobiocine	5 ml

## **Milieu solide Hektoen**

### **pH 7,6**

Peptone	12 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires	9,0 g
Lactose	12,0 g
Sucrose	12,0 g
Salicine	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hyposulphite de sodium	5,0 g
Citrate d'ammonium	1,5 g
Bleu de brothymol	0,064 g
Acide fuschique	0,040 g
Agar	13,5 g
Eau	1000 ml

## **Milieu solide SM ID**

### **pH 7,6**

Peptone de viande et caséine	6,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Sels biliaires	4,0 g
Rouge neutre	0,025 g
Tampon TRIS	0,065 g
Vert Brillant	0,3 mg
Substrat chromogène 1 (galactopyranoside)	0,17 g
Glucuronate de sodium	12,0 g
Substrat chromogène 2 (glucopyranoside)	0,025 g
Sorbitol	8,0 g
Agar	13,5 g
Eau	1000 ml

## **Bouillon Sélénite-cystine**

pH 7,0

Peptone et caséine	5,0 g
Lactose	4,0 g
Phosphate disodique	10,0 g
Sélénite de sodium	4,0 g
Cystine	0,01 g
Eau	1000 ml

## **Bouillon M**

pH 7,0

Peptone et caséine	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	5,0 g
Citrate de sodium	5,0 g
D-mannose	2,0 g
Sulphate de magnésium.7H <sub>2</sub> O	0,8 g
Sulphate ferreux.7H <sub>2</sub> O	0,04 g
Chlorure de Manganèse.4H <sub>2</sub> O	0,14 g
Tween 80	0,75 g
Eau	1000 ml

## **Plate count agar (PCA)-pH 7,0 ± 0,2 à 25 °C**

Tryptone	5,0 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar bactériologique	12,0 g
Eau	1000 ml

## **Gélose xylose lysine désoxycholate (gélose XLD)-pH 7,4 ± 0,2 à 25 °C**

Extrait de levure en poudre	3,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Hydrochlorure de L-Lysine	5,0 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Citrate d'ammonium de fer (III)	0,8 g
Rouge de phénol	0,08 g
Désoxycholate de sodium	1,0 g
Gélose	9 g à 18 g*
Eau	1000 ml

\* Selon le pouvoir gélifiant de la gélose.

## **Gélose xylose lysine tergitol 4 (gélose XLT4)-pH 7,4 ± 0,2 à 25 °C**

Extrait de levure en poudre	3,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Hydrochlorure de L-Lysine	5,0 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Citrate d'ammonium de fer (III)	0,8 g
Rouge de phénol	0,08 g
Tergitol 4	4,6 ml
Gélose	9 g à 18 g*
Eau	1000 ml



## **Gélose nutritive-pH $7,0 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$**

Extrait de viande	3,0 g
Peptone	5,0 g
Gélose	9 g à 18 g*
Eau	1000 ml

## **Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (gélose TSI)-pH $7,4 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$**

Extrait de viande	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone	20,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Lactose	10,0 g
Saccharose	10,0 g
Glucose	1,0 g
Citrate de fer (III)	0,3 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Rouge de phénol	0,024 g
Gélose	9 g à 18 g*
Eau	1000 ml

## **Gélose Mueller Hinton II-pH $7,3 \pm 0,2$**

Extrait de bœuf	2,0 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Gélose	17,0 g
Eau déionisée	1000 ml

**Annexe 3**  
**Tableau comparatif de différentes méthode**  
**de typage**

### Utilisation des méthodes de typage bactérien comme outils épidémiologiques

Méthode	Avantages	Désavantages	Pouvoir de discrimination
Biotypage (cfr. API)	facilité	variabilité	moyen
Antibiogramme	facilité	instabilité	moyen à bon
Sérotypie	standardisation	laboratoires spécialisés	faible à moyen
Lysotypie	standardisation	laboratoires spécialisés	moyen à bon
Typage par bactériocines	standardisation	méthode complexe	moyen à bon
REA (restriction enzyme analysis)	universalité, procédure simple	lecture difficile	bon
RFLP(restriction fragment length polymorphism)	universalité, lecture facile	procédure complexe	bon à excellent
PFGE(pulsed field gel electrophoresis)	universalité, lecture facile	procédure complexe, matériel onéreux	bon à excellent
RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)	universalité, simplicité, rapidité	pas de standardisation	bon à excellent

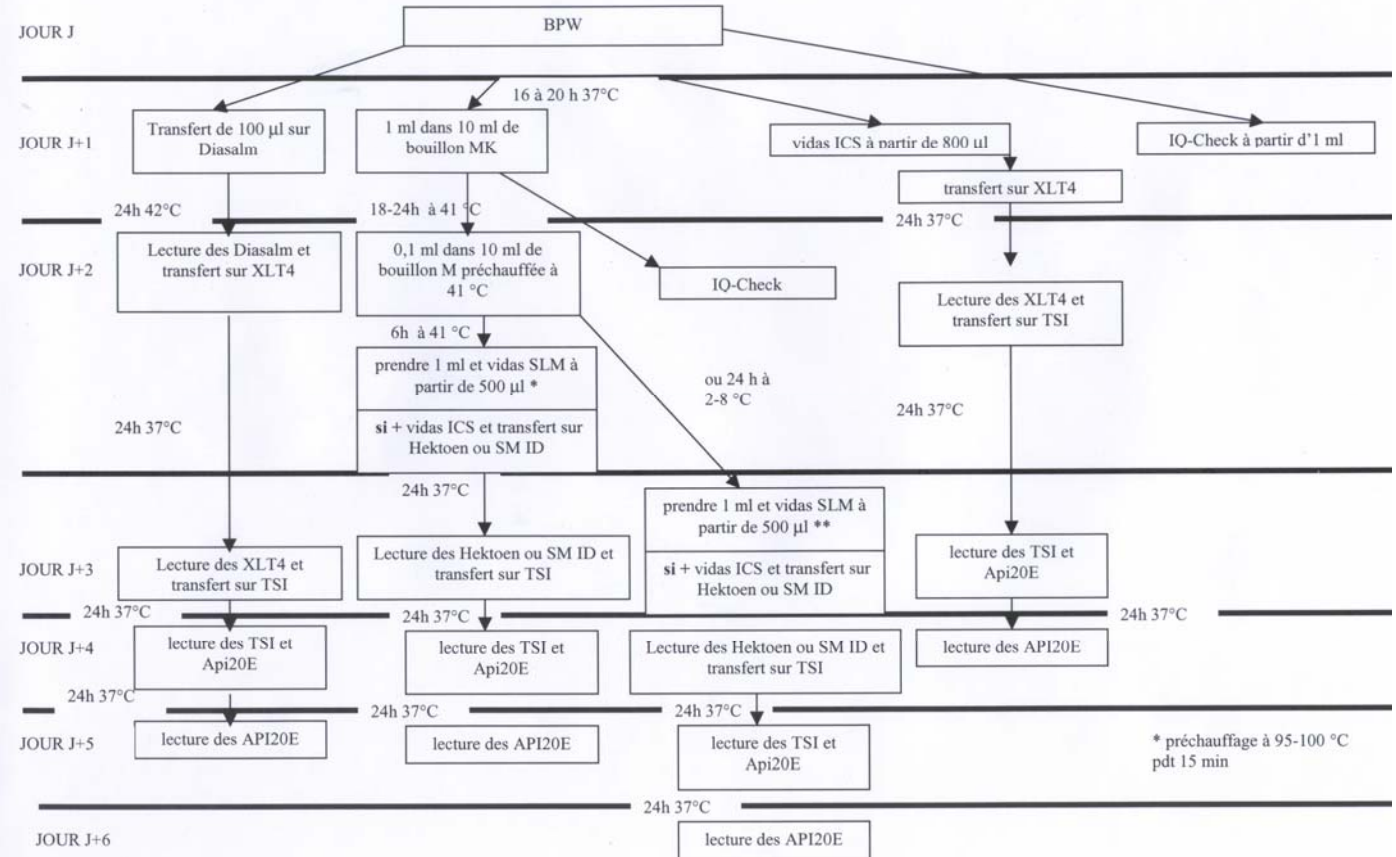
(source Dominique S. Blanc, Lausanne et Hans H. Siegrist. 1995. Typage bactérien : méthodes et valeur épidémiologique. Swiss-Noso, Volume2, Numéro 1 ou <http://www.hospvd.ch/swiss-noso/f21a3.htm>).



**Annexe 4**  
**Différents protocoles de méthodes de**  
**détection de *Salmonella* spp**

PROTOCOLE DE VALIDATION. COMPARAISON DE METHODES.

I. matières fécales et surchaussures.



2. carcasses de porcs, aliments pour porcs et découpes des porc

\* préchauffage à 95-100 °C pdt 15 min

\*\* à partir de bouillon M, RV et SC

