

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE *SALMONELLA* SENFTENBERG ISOLEES DE COUVOIRS

Le Gall Françoise, Salomon Kévin, Salvat Gilles, Chemaly Marianne

*ANSES, Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins, B.P.53, 22440 Ploufragan
Université européenne de Bretagne, France*

francoise.legall@anses.fr

RÉSUMÉ

La contamination récurrente des couvoirs par *Salmonella* Senftenberg et sa capacité à persister dans les élevages est une des préoccupations importantes des professionnels de la filière volaille. L'objectif de cette étude est de génotyper des isolats de *Salmonella* Senftenberg issus de couvoirs afin de déterminer leur diversité génétique et d'identifier des types de contaminations. Deux cents huit isolats collectés entre mars 2013 et avril 2014 provenant de trois couvoirs ont été analysés par RFLP-PFGE (Restriction Fragment Length Polymorphism-Pulsed Field Gel Electrophoresis) avec l'enzyme de restriction *XbaI*. Les profils génétiques obtenus sont comparés au moyen du logiciel BioNumerics 6,5 (Applied-Maths). La similarité des isolats est déterminée selon le coefficient de DICE (Detection of Informative Combined Effects) avec une tolérance de 1 % et le dendrogramme est construit selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). L'indice de Simpson est calculé pour estimer la diversité génétique des isolats (Hunter, 1988). Les résultats de cette étude permettent de confirmer la grande diversité génétique de *Salmonella* Senftenberg avec un indice de 0,964 (Kerouanton, 2007 ; Boumart, 2012). L'analyse des résultats de chaque couvoir montre trois types de contaminations : résiduelles, croisées et multiples. La comparaison des profils retrouvés dans les trois couvoirs montre des isolats ayant une similarité à 100 % communs aux trois couvoirs, indiquant une probable origine de contamination commune. Une enquête épidémiologique sera nécessaire par la suite pour déterminer les causes de ces contaminations et mettre en place les moyens de lutte appropriés.

ABSTRACT

Recurrent contamination with *Salmonella* Senftenberg in hatcheries and its ability to persist on farms is a major preoccupation of poultry professionals. The objective of this study is to genotype isolates of *Salmonella* Senftenberg from hatcheries to determine the genetic diversity, and to identify types of contaminations. Two hundred and eight isolates collected between march 2013 and april 2014 from three hatcheries were analysed by RFLP/PFGE with the enzyme *XbaI*. DNA profiles obtained are compared using the BioNumerics 6.5 software. The similarity of isolates was determined using the coefficient of DICE with a tolerance of 1% and the dendrogram is built according to the UPGMA method. The Simpson Index is calculated to estimate the genetic diversity of isolates. The results of this study confirm the high genetic diversity of *Salmonella* Senftenberg with a Simpson index of 0.964. Analysis of the results of each hatchery highlights three types of contamination: residual, cross and multiple contaminations. The comparison of the profiles from the three hatcheries shows 100% similarity among some isolates assuming a possible common origin of contamination. An epidemiological investigation will be needed later to determine the source of contamination and develop appropriate control strategies.

INTRODUCTION

La contamination récurrente des couvoirs par *Salmonella* Senftenberg et sa capacité à persister dans les élevages (Bailey 2001, Martinez-Urtaza 2005) est une des préoccupations importantes des professionnels de la filière volaille.

L'objectif de cette étude est de génotyper des isolats de *Salmonella* Senftenberg issus de couvoirs afin de déterminer leur diversité génétique et d'identifier des types de contaminations.

1. MATERIELS ET METHODES

Deux cents huit isolats collectés entre mars 2013 et avril 2014 provenant de trois couvoirs ont été analysés par RFLP-PFGE (Restriction Fragment Length Polymorphism - Pulsed Field Gel Electrophoresis) : les isolats sont inclus dans des inserts d'agarose puis lysés avec la protéinase K afin de libérer l'ADN. L'ADN est digéré avec l'enzyme *XbaI* pour obtenir des fragments dont le poids moléculaire est compris entre 20 et 1135 kb. Une électrophorèse en champs pulsés permet la migration des brins d'ADN dans le gel en fonction de leur poids moléculaire. La position des fragments d'ADN est visualisée grâce à un intercalant de L'ADN (Gel Red). Les profils génétiques obtenus sont comparés au moyen du logiciel BioNumerics 6,5 (Applied-Maths). La similarité des isolats est déterminée selon le coefficient de DICE (Detection of Informative Combined Effects) avec une tolérance de 1 % et le dendrogramme est construit selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages). L'indice de Simpson est calculé pour estimer la diversité génétique des isolats (Hunter, 1988).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent une diversité importante de 0,964 pour l'ensemble des isolats génotypés ; les valeurs par couvoir varient entre 0,561 et 0,966 (tableau 1). Ces résultats permettent de confirmer la grande diversité génétique de *Salmonella* Senftenberg observée dans d'autres études (Kérouanton, 2007 ; Boumart, 2012). Cependant, pour le couvoir 2, la faible diversité observée 0,561 serait en lien d'une part avec le nombre faible d'isolats (12) et d'autre part avec des sources de contamination moins variées que pour les autres couvoirs.

Les isolats issus des trois couvoirs se regroupent en 7 clusters principaux (figure 1). Chaque cluster est constitué d'isolats similaires à plus de 90 % (Boumart et al., 2012). La majorité des isolats de chaque couvoir se regroupent dans les mêmes clusters. Les clusters 1,2,7 sont exclusivement

composés d'isolats du couvoir 3, les clusters 4 et 5 sont associés respectivement aux couvoirs 1 et 2 (figure 1) : Chaque couvoir possède un ou deux types majoritaires de *Salmonella* Senftenberg : indiquant certainement une source de contamination qui lui est propre. Deux clusters (4 et 5) regroupent des isolats provenant des trois couvoirs (figure 1). Les clusters 3 et 6 sont formés avec des isolats des couvoirs 1 et 3 et comportent peu d'individus (figure 1) : Les couvoirs hébergent des souches communes. Des isolats provenant de couvoirs différents sont identiques à 100 % (figure 2) : cas pour les profils 42, 50, 53 et 55. Ces exemples confirment la présence de souches communes aux couvoirs et montrent qu'il existe également une même origine de contamination pour les trois couvoirs.

L'analyse des résultats de chaque couvoir montre trois types de contaminations :

- des contaminations résiduelles : des isolats similaires à 100 % sont présents dans les mêmes lieux durant toute la période de récolte de 13 mois : pour exemple les isolats de profils 41 sont présents dans le couvoir 1 de avril 2013 à mars 2014 (Figure 3). La cause de cette persistance pourrait être en relation avec la désinfection ;
- des contaminations croisées : des isolats ayant des profils identiques sont retrouvés dans plusieurs salles du couvoir (Figure 3) : pour le couvoir 3 les isolats de profil 2 sont présents dans 6 éclosiers. Ces contaminations peuvent avoir pour origine le déplacement du personnel, le matériel commun aux différentes salles, des problèmes de désinfections, des contaminations en amont du couvoir ;
- des contaminations multiples : des isolats de profils différents sont retrouvés au même endroit dans les couvoirs : par exemple dans l'écloir 9 du couvoir 1 deux isolats ont des profils présentant 51,85% de similarité (figure 3). Dans ce cas on peut supposer que ces contaminations ont des origines différentes.

CONCLUSION

Cette étude a permis de confirmer la grande diversité génétique de *Salmonella* Senftenberg parmi des isolats issus de couvoirs. Trois types de contaminations ont été mis en évidence, résiduelle, croisée et multiple. L'analyse des résultats des trois couvoirs montre que chaque couvoir possède une population dominante de *Salmonella* Senftenberg que des contaminations peuvent être exclusives à un couvoir, et d'autres sont communes à plusieurs couvoirs.

Une enquête épidémiologique serait nécessaire pour déterminer les causes de ces contaminations et mettre en place les moyens de lutte appropriés

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bailey, J.S., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Craven, S.E., Cox, N.A., Cosby, D.E., Ladely, S., Musgrove, M.T., 2001. J. Food Prot., 64: 1690-1697.
2. Boumart, Z., Roche, S.M., Lalande, F., Virlogeux-Payant, I., Hennequet-Antier, C., Menanteau, P., Gabriel, I., Weill, F.X., Velge, P., Chemaly, M., 2012. PlosOne, 7(4): 1-10.
3. Hunter, P.R., Gaston, M.A. 1988. J. of Cli. Micro., 26(11): 2465-2466.
4. Kérouanton, A., Marault, M., Lailler, R., Weill, F-X, Feurer, C., Espié, E., Brisabois, A., 2007. Food. Patho. and Dis., 4(3): 293-303.
5. Martinez-Urtaza, J., Liebana, E., 2005a. FEMS Micro. Ecol. 52 : 255-263.
6. Martinez-Urtaza, J., Liebana, E., 2005b. Int. J. Food Micro., 105: 153-163.

Tableau 1 : Diversité des isolats

Couvoir	Nombre d'isolats	Nombre de profils	ID de Simpson
Couvoir 1	34	19	0.934
Couvoir 2	12	4	0.561
Couvoir 3	162	78	0.966
Toutes les souches	208	91	0.964

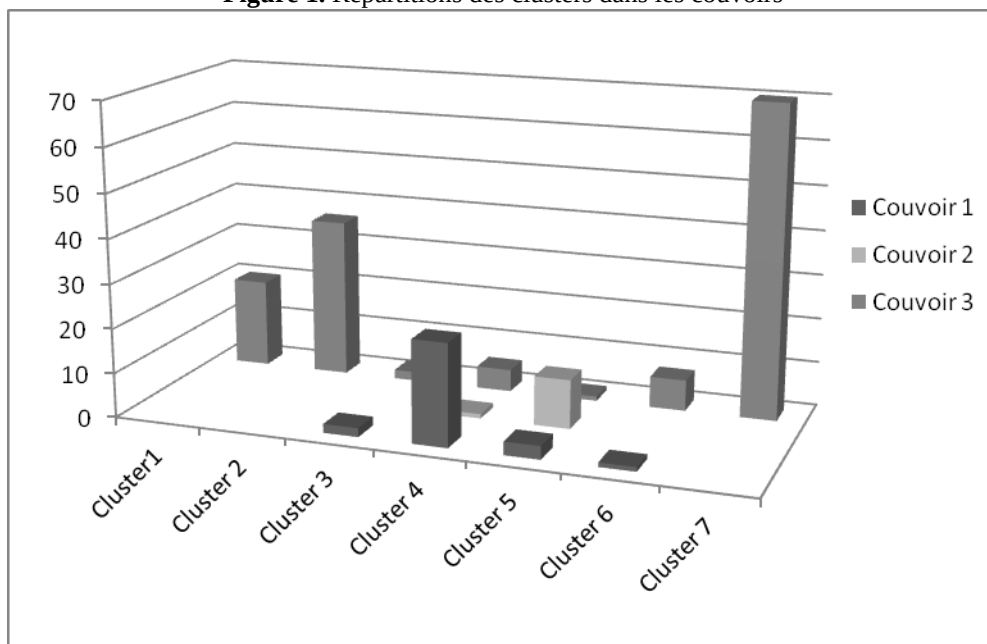
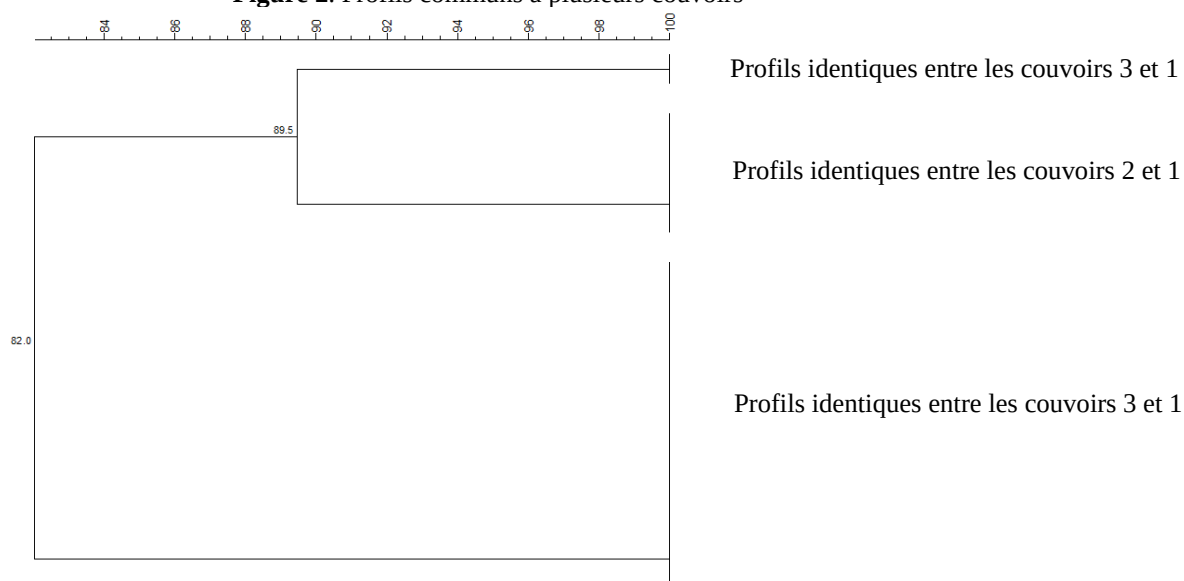
Figure 1. Répartitions des clusters dans les couvoirs**Figure 2.** Profils communs à plusieurs couvoirs

Figure 3. Contaminations résiduelle, croisée et multiple

- ★ 70,50 % de similarité entre les 2 profils issus de l'éclosoir 1
 ● 68,75 % de similarité entre les 2 profils issus de l'éclosoir 3
 ◆ 51,85 % de similarité entre les 2 profils issus de l'éclosoir 9