



Détection des infections à *Salmonella Enteritidis* et/ou *Typhimurium* chez *Gallus gallus* à l'aide d'une technique ELISA

Evaluation de la méthode et comparaison avec la détection bactériologique en élevage.

Eric JOUY, Karine PROUX, Florence HUMBERT, Catherine HOUDAYER, Françoise LALANDE, Jean-Paul PICAULT et Gilles SALVAT.

AFSSA-Site de Ploufragan, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN.

RESUME

En France, la détection réglementaire de *Salmonella Enteritidis* (SE) et *Salmonella Typhimurium* (ST) en élevages avicoles est basée sur l'analyse bactériologique de prélèvements d'environnement et d'origine fécale. L'objectif de cette étude était de comparer, dans les conditions du terrain, ces résultats bactériologiques à ceux obtenus par une technique sérologique ELISA préalablement évaluée avec des poules artificiellement contaminées. Quarante-cinq élevages ont été suivis mensuellement avec 2 prélèvements bactériologiques (d'environnement et fécaux) et 20 prélèvements sérologiques (sérums ou vitellus). Vingt-sept élevages indemnes de SE et ST ont donné une réponse sérologique négative tout au long de leur suivi. Concernant la spécificité, sur les 10 sérotypes autres que SE et ST détectés dans cette étude, 3 étaient présents dans des élevages présentant une sérologie positive : *S. Heidelberg*, *S. Agona* et *S. Hadar*. La technique ELISA n'est donc pas strictement spécifique car elle détecte des sérovars présentant des antigènes communs ou non avec SE et ST. Au niveau de la sensibilité, dans les 7 élevages contaminés par SE ou ST, un décalage entre les détections bactériologique (plus précoce) et sérologique a pu être constaté. Par ailleurs, cette technique sérologique peut aussi être intéressante pour le contrôle de la stimulation immunitaire suite à une vaccination contre SE et/ou ST.

SUMMARY

In France, the regular detection of *Salmonella Enteritidis* (SE) and *Salmonella Typhimurium* (ST) in poultry flocks is based on bacteriological analysis of environmental swabs and faeces samples. The aim of this study was to compare, in field conditions, these bacteriological results with those obtained by ELISA (serological method) first evaluated with artificially contaminated hens. Forty-five flocks were monthly followed with 2 bacteriological samples (environmental swab and faeces) and 20 serological samples (sera or yolks). Twenty-seven flocks without SE and ST gave a negative serological response throughout their follow-up. Three among ten serovars different from SE and ST found in this study gave seropositive results: *S. Heidelberg*, *S. Agona* and *S. Hadar*. Consequently, this ELISA method is not specific as it detects serovars having common antigens or not with SE and ST. Finally, in the 7 flocks contaminated by SE or ST, the serological response was appeared later than the bacteriological detection. Otherwise, this serological method can also be interesting for the control of immune response following a vaccination against SE and/or ST.

Introduction

Dans le cadre de la prévention des toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* Enteritidis (SE) et *Salmonella* Typhimurium (ST), la Directive Européenne 92/117 (Anonyme, 1992) et les arrêtés ministériels du 26/10/98 (Anonyme, 1998) ont rendu obligatoire la recherche bactériologique des salmonelles dans les élevages de poules pondeuses d'œufs de consommation ainsi que dans les élevages de sélection et de multiplication des deux filières *Gallus gallus*. En production, cette recherche est actuellement effectuée sur un prélèvement d'environnement (chiffonnette) et un prélèvement d'origine fécale toutes les 8 semaines pour les multiplicateurs chair, et à 24, 40 et 55 semaines d'âge pour les poules pondeuses. Mais la Directive prévoit la possibilité d'une détection sérologique, plus rapide et moins coûteuse, si elle présente des garanties équivalentes à la bactériologie.

La technique ELISA a été mise au point à l'AFSSA - Site de Ploufragan afin de dépister *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium, les deux sérovars visés par la directive Zoonoses 92/117/CEE. L'objectif de cette étude est, d'une part, d'évaluer les qualités de cette méthode sur des animaux inoculés expérimentalement et, d'autre part, de la comparer à la détection bactériologique en élevage.

1. Description de la technique

Cette technique ELISA est basée sur l'utilisation de lipopolysaccharides (références L-2012-et L-2262, Sigma) qui sont les antigènes de la membrane des salmonelles (Fawcett *et al.*, 1991 ; Kles *et al.*, 1993, Proux *et al.*, 1995). Ces antigènes sont adsorbés avec des anticorps anti-*Escherichia coli* (référence 0 : 111 B4, Sanofi diagnostic pasteur) afin de réduire les réactions croisées avec les colibacilles. Les sérums sont directement dilués au 1/300 alors que les vitellus sont pré-dilués au 1/10 dans une solution

tamponnée au phosphate puis dilués au 1/30 avant analyse. Les anticorps de poules qui se fixent sur les antigènes salmonelliques sont ensuite révélés par des anticorps de lapin conjugués à la phosphatase alcaline (référence A-9171, Sigma), enzyme qui dégrade le p-nitrophényl phosphate (référence 104-105, Sigma). La réaction colorée est lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm et un filtre référence de 490 nm. La densité optique (DO) est ensuite corrigée (DOC) par rapport aux sérums de contrôle négatif et positif suivant la formule $DOC = (DO \text{ échantillon} - DO \text{ négatif de contrôle}) / (DO \text{ positif de contrôle} - DO \text{ négatif de contrôle})$. Le seuil de positivité a été établi à 0,150 (Kles *et al.*, 1993).

2. Evaluation de l'ELISA

Les qualités de cette méthode ont été étudiées grâce à différentes expérimentations réalisées sur des poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ou conventionnelles hébergées dans les animaleries protégées de l'AFSSA.

La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN), la loi dose-effet et la comparaison des réponses de la technique ELISA réalisée sur des sérums et des vitellus sont successivement présentées.

2.1. Définitions

Les calculs de sensibilité, spécificité, VPP et VPN sont réalisés à partir du tableau 1 à double entrée.

2.2. Spécificité

La spécificité a été évaluée sur des sérums issus de poules âgées de 8 à 19 semaines, soit indemnes de toutes salmonelles, soit immunisées avec différents vaccins (non-salmonelliques) contenant des adjuvants huileux (Kles *et al.* 1993), soit inoculées avec d'autres salmonelles ayant ou non des antigènes communs avec *S. Typhimurium* et Enteritidis, ou encore issues d'un élevage naturellement contaminé par *Escherichia coli*. Les prélèvements sérologiques sont réalisés 3 semaines après l'inoculation.

Le tableau 2 présente les antigènes somatiques des différentes souches de salmonelles inoculées.

Le tableau 3 présente les résultats obtenus avec la technique ELISA (spécificité).

Salmonella Agona et Berta présentent donc respectivement des antigènes communs avec *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* alors que *S. Virchow* et Infantis n'en présentent pas.

Tableau 1 : Répartition des résultats pour les calculs de sensibilité, spécificité, VPP et VPN.

sérologie	Contamination des animaux par SE et/ou ST	
	+	-
+	A	C
-	B	D

Légende : A, B, C et D sont les nombres d'animaux concernés.

$Sensibilité = (A / A + B) \times 100$ = pourcentage d'animaux détectés positifs parmi les animaux infectés.

$Spécificité = (D / C + D) \times 100$ = pourcentage d'animaux détectés négatifs parmi les animaux non-infectés.

$VPP = (A / A + C) \times 100$ = pourcentage d'animaux infectés parmi les animaux détectés positifs.

$VPN = (D / B + D) \times 100$ = pourcentage d'animaux non-infectés parmi les animaux détectés négatifs.

Tableau 2 : **Formules antigéniques des sérovars testés (Popoff et Le Minor, 1997).**

<i>Salmonella</i>	Antigènes O	Antigènes H1	Antigènes H2
Enteritidis	1, 9, 12	[f], g, m, [p]	[1,7]
Berta	1, 9, 12	[f], g, [t]	/
Typhimurium	1, 4, [5], 12	i	1, 2
Agona	1, 4, [5], 12	f, g, s	[1, 2]
Virchow	6, 7	r	1, 2
Infantis	6, 7, [14]	r	1, 5

Légende :

Les antigènes O et H entre crochets peuvent être absents. Leur présence n'est pas liée à la conversion bactériophagique.

Les antigènes O soulignés ne sont présents qu'après conversion bactériophagique.

infectés avec des sérovars présentant ou non des antigènes O communs avec *S. Enteritidis* ou *Typhimurium* sont variablement dépistés (*S. Agona* 96 % de positifs, Berta 0%, Virchow 29 % et Infantis 20%) ce qui peut être mis en relation avec leur potentiel d'invasivité et donc leur capacité à stimuler ou non le système immunitaire. La technique ELISA mise en oeuvre n'apparaît donc pas strictement spécifique de *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium.

■ 2.3. Sensibilité et loi dose-effet

Des poules EOPS de 6 à 19 semaines ont été inoculées par voie intramusculaire (IM) avec des doses de 10^6 à 10^8 UFC de *S. Enteritidis* ou Typhimurium et des poules pondueuses de 45 semaines ont été inoculées par voie orale (VO) avec 10^9 UFC de *S. Enteritidis*. Les sérums ont été prélevés 3 semaines après l'inoculation. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

A dose inoculée égale, la technique présente des sensibilités qui ne sont pas significativement différentes vis-à-vis de *S. Enteritidis* ou Typhimurium. Dans les deux cas, et pour une même voie d'inoculation, la sensibilité de la technique apparaît dépendante du titre de l'inoculum, ce qui vérifie la loi dose-effet en matière de réponse sérologique.

■ 2.4. Bilan

Les paramètres de sensibilité, spécificité, VPP et VPN peuvent être calculés à partir des résultats obtenus sur les poules EOPS ou conventionnelles élevées en animaleries protégées et dont le statut vis-à-vis des salmonelles est parfaitement connu (tableau 5). Ces résultats sont obtenus à partir de toutes les expérimentations précédentes (chapitres 2.2 et 2.3) en excluant les animaux infectés par *E. Coli*. En effet, ces derniers provenaient d'un élevage du terrain pour lequel une éventuelle contamination par une salmonelle pouvait passer inaperçue.

Les valeurs des différents paramètres sont donc les suivantes :

Sensibilité = 91,1 %

Spécificité = 95,0 %

VPP = 89,7 %

VPN = 95,7 %

Tableau 3 : **Nombre d'animaux retrouvés positifs et négatifs avec la technique ELISA en fonction de leur traitement.**

Traitement	Antigènes communs avec SE ou ST	Dose (UFC ^b) et voie d'inoculation	animaux	ELISA SE/ST (nombre d'animaux)		Spécificité
				+	-	
indemnes	/	/	EOPS ^c	2	615	99,7 %
vaccins adjuvants huileux ^a	/	/	EOPS	2	185	98,9 %
<i>S. Agona</i>	oui	10^8 IM ^c	EOPS	24	1	4 %
<i>S. Berta</i>	oui	10^8 VO ^d	Conv. ^f	0	20	100 %
<i>S. Virchow</i>	non	10^8 IM	EOPS	7	17	70,8 %
<i>S. Infantis</i>	non	10^8 VO	Conv.	12	48	80 %
<i>Escherichia coli</i>	/	/	Conv.	15	84	84,9 %

Légende :

(a) : Les vaccins avec des adjuvants huileux utilisés visaient : *Pasteurella multocida* (0+/19), *Haemophilus paragallinarum* (1+/20), *Mycoplasma gallisepticum* (0+/34), *Coronavirus* (0+/20), *Paramyxovirus* type 1 – PMV1 (0+/44), *Birnavirus* (0+/20), PMV1 et *Coronavirus* (0+/10), PMV1 *Coronavirus* et *Birnavirus* (1+/10), PMV1 *Réovirus* et *Coronavirus* (0+/10).

(b) : Unité Formant Colonie.

(c) : Voie intra-musculaire.

(d) : Voie orale.

(e) : Exempts d'organismes pathogènes spécifiés.

(f) : Poules conventionnelles.

Tableau 4 : **Nombre d'animaux retrouvés positifs et négatifs avec la technique ELISA en fonction de la dose et de la voie d'inoculation par *S. Enteritidis* et Typhimurium.**

<i>Salmonella</i>	Dose (UFC ^a) et voie d'inoculation	ELISA SE/ST (nombre d'animaux)		Spécificité %
		+	-	
Enteritidis	10^6 IM ^b	13	7	65
	10^7 IM	48	0	100
	10^8 IM	30	0	100
	10^9 VO ^c	281	27	91,2
Typhimurium	10^6 IM	14	6	70
	10^7 IM	8	0	100
	10^8 IM	16	0	100

Légende : (a) : Unité formant colonie.

(b) : Voie intra-musculaire.

(c) : Voie orale.

En conclusion, la spécificité pour des poules EOPS indemnes ou immunisées avec différents vaccins contenant des adjuvants huileux est proche de 99 % donc très élevée. Par contre, la

technique peut présenter des défauts de spécificité par rapport aux entérobactéries puisque nous enregistrons 15 % de faux-positifs dans l'élevage contaminé par *E. coli*. Les animaux

2.5. Comparaison des résultats des tests ELISA effectués sur sérums et vitellus

Dans les élevages de poules pondeuses il est évidemment plus facile de prélever des oeufs que de réaliser des prises de sang. Cette étude a donc été réalisée afin de comparer les niveaux de détection des anticorps dans les vitellus et les sérums (Proux *et al.*, 2001).

Quinze poules de la lignée L2 (lignée de pondeuses Hubbard-ISA) ont été inoculées avec 10^8 UFC de *Salmonella* Enteritidis au moment du pic de ponte. Le sérum ainsi que 3 oeufs par poule ont été prélevés avant inoculation et après 1, 2, 4, 6, 8 et 10 semaines.

Les résultats sont présentés dans la figure 1.

Un délai d'un peu plus de 2 semaines après inoculation est nécessaire pour que les sérums (valeur moyenne des DOC de 15 échantillons) dépassent le seuil de positivité, alors que ce délai est d'un peu plus de 6 semaines dans le cas de l'application de la technique ELISA aux vitellus (valeur moyenne des DOC de 3 fois 15 échantillons).

Les IgG vitellines apparaissent donc entre 3 et 4 semaines après les IgG sériques mais il n'existe pas de différences significatives entre les résultats cumulés des tests ELISA réalisés sur ces 2 types d'échantillons pendant toute la durée de l'essai (de 0 à 10 semaines). Il est donc possible de réaliser un suivi de parquets de pondeuses par la recherche des IgG vitellines, tout en tenant compte, dans l'interprétation des résultats, d'un délai d'apparition des anticorps d'au moins 6 semaines après l'infection.

3. Suivi des élevages

Un suivi bactériologique et sérologique mensuel de 45 élevages a été effectué, depuis la mise en production des animaux (18-20 semaines d'âge) jusqu'à la réforme (55-65 semaines). Ce travail a été réalisé en collaboration avec des couvoirs, des groupements d'élevages de poules pondeuses ainsi que des laboratoires d'analyses vétérinaires.

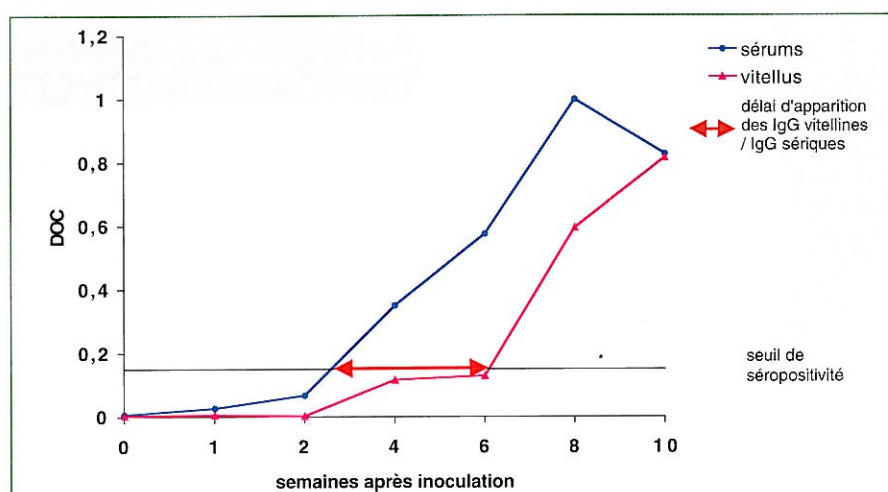
Tableau 5 : Sensibilité, spécificité, VPP et VPN de la technique ELISA.

ELISA	Nombre d'animaux infectés par SE et ST		Total
	+ a	- b	
+	410	47	457
-	40	886	926
Total	450	933	

Légende : (a) : animaux inoculés SE (n=406) et ST (n=44).

(b) : animaux indemnes de toutes salmonelles (n=617), ou immunisés avec des vaccins non-salmonelliques contenant des adjuvants huileux (n=187) ou inoculés avec d'autres sérotypes de salmonelles que SE ou ST (n=129).

Figure 1 : Résultats de l'ELISA réalisée sur les sérums et les vitellus de poules de la lignée L2 inoculées par voie orale avec 10^8 UFC de *S. Enteritidis* au moment du pic de ponte.



3.1. Méthodologie

3.1.1. Suivi bactériologique mensuel

Les prélèvements bactériologiques mensuels ont consisté en une chiffonnette d'environnement et un prélèvement d'origine fécale (pédi-chiffonnette, fientes ou chiffonnette de tapis de fientes).

Ces prélèvements ont ensuite été analysés, suivant le texte de référence BA 70 (Humbert et Morvan, 1996 b) du COFRAC (Comité Français d'Accréditation), par l'un des laboratoires d'analyses vétérinaires participant à l'étude et ayant satisfait à un essai inter-laboratoires préalable.

3.1.2. Suivi sérologique mensuel

Il a été effectué, par ELISA, sur 20 vitellus pour les élevages de poules pondeuses et 20 sérums pour les élevages de multiplicateurs chair. Les prélèvements sérologiques ont été effectués aux mêmes dates que

les prélèvements bactériologiques et sont répartis au hasard dans l'élevage (animaux non identifiés).

Cette technique a également fait l'objet d'une chaîne d'analyses lors de son transfert aux laboratoires.

Un élevage a été considéré comme séro-positif lorsque au moins 1 échantillon sur 20 a présenté une densité optique corrigée (DOC) supérieure à 0,150.

3.1.3. Analyses complémentaires en cours d'élevage

Celles-ci ont uniquement été réalisées lorsque le suivi mensuel a donné des résultats discordants entre la technique bactériologique et la technique sérologique et ceci pour 2 séries de prélèvements réalisées à un mois d'intervalle : sérologie positive et absence de salmonelles, ou sérologie négative et présence de *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium.

Tableau 6 : *Prélèvements complémentaires réalisés en cas de discordance persistante entre les résultats sérologiques et bactériologiques mensuels.*

Elevages au sol	Elevages en cages
4 chiffonnettes sous pédisacs	4 chiffonnettes de tapis de fientes
2 chiffonnettes de nids	2 chiffonnettes de fonds de cages
2 chiffonnettes de matériels de ramassage des œufs	2 chiffonnettes de tapis d'acheminement des œufs
2 chiffonnettes sur le système d'aération (ventaux ou extracteurs)	2 chiffonnettes sur le système d'aération (ventaux ou extracteurs)
2 chiffonnettes de mangeoires	
60 prises de sang pour les élevages de multiplicateurs chair	
60 vitellus et 20 prises de sang pour les élevages de poules pondeuses	

Un échantillonnage complémentaire a alors été réalisé comme indiqué dans le tableau 6. Les analyses bactériologiques ont porté sur 12 chiffonnettes au minimum et sur 60 à 80 échantillons pour les analyses Sérologiques.

3.1.4- Analyses finales avant réforme des animaux

Des analyses avant réforme ont été réalisées lorsque les analyses complémentaires précédentes donnaient les mêmes résultats discordants que le suivi mensuel.

Dans le cas d'une sérologie négative et d'une présence de *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium dans l'élevage, 60 poules ont été abattues puis identifiées comme le préconise la réglementation. Les sérums ont été analysés individuellement par ELISA et une recherche de salmonelles a été réalisée sur les foies,

rates, caeca, ovaires préalablement regroupés par 5 selon le type d'organes (Humbert et Morvan, 1996 a).

Dans le cas d'une sérologie positive et d'une absence de salmonelles dans l'élevage, 20 poules ont été isolées et marquées. Après une analyse des 20 sérums, 5 animaux séro-négatifs et 5 animaux séro-positifs seulement ont été autopsiés. Le nombre d'animaux est plus faible que précédemment car ces analyses ne sont pas imposées par la réglementation (analyses bactériologiques négatives) mais seulement nécessaires à l'enquête. Une recherche de germes a été effectuée par isolement direct sur gélose non-sélective à partir des foies, rates, caeca et ovaires. Une recherche de salmonelles a également été réalisée sur ces mêmes prélèvements selon le texte de référence COFRAC BA 60 (Humbert et Morvan, 1996 a).

Parallèlement aux prélèvements sur animaux, 12 prélèvements complémentaires (minimum) ont été à nouveau réalisés comme indiqué dans le tableau 6.

3.2. Résultats

Au total, 45 élevages ont été suivis, dont 27 élevages de multiplicateurs chair et 18 élevages de poules pondeuses.

3.2.1. Elevages bactériologique-ment négatifs

Il s'agit de tous les élevages où aucune salmonelle n'a jamais été isolée lors du suivi mensuel. Ils sont au nombre de 18, dont 16 (4 de poules pondeuses et 12 de multiplicateurs chair) qui ont présenté une sérologie négative tout au long de leur suivi.

Deux élevages de multiplicateurs chair ont présenté une sérologie positive dès la mise en place des animaux avec un nombre d'échantillons séropositifs qui est resté assez constant (de 1 à 5 sur 20 suivant le mois de prélèvements) pendant tout le suivi. Les analyses complémentaires en cours d'élevage et celles effectuées sur les animaux avant réforme (chapitres 3.1.3 et 3.1.4) ont confirmé l'absence de salmonelles.

Tableau 7 : *Résultats bactériologiques et sérologiques des 18 élevages présentant une contamination par des salmonelles de sérotype autre que S. Enteritidis et Typhimurium*

Type d'élevage	Sérotype(s) de salmonella isolé(s) dans l'élevage	Antigènes communs avec SE et/ou ST	Retrouvé systématiquement dans l'environnement	Résultat sérologique	Groupe
Pondeuses	Saint Paul	Oui	Non	Négatif	1
Pondeuses	Agona	Oui	Non	Négatif	
Multiplicateurs Chair	Heidelberg	Oui	Non	Négatif	
Multiplicateurs Chair	Coeln	Oui	Non	Négatif	
Pondeuses	Mbandaka	Non	Non	Négatif	2
Pondeuses	O : 43 H : lv : z53	Non	Non	Négatif	
Pondeuses	Hadar et Infantis	Non	Non	Négatif	
Pondeuses	Yoruba	Non	Non	Négatif	
Pondeuses	Yoruba	Non	Non	Négatif	
Multiplicateurs Chair	Montevideo	Non	Non	Négatif	
Multiplicateurs Chair	Mbandaka	Non	Non	Négatif	
Multiplicateurs Chair	Hadar	Non	Non	Positif	3
Multiplicateurs Chair	Hadar	Non	Non	Positif	
Multiplicateurs Chair	Hadar	Non	Non	Positif	
Multiplicateurs Chair	Heidelberg	Oui	Oui	Positif	4
Multiplicateurs Chair	Agona	Oui	Oui	Positif	
Multiplicateurs Chair	Heidelberg	Oui	Oui	Positif	
Multiplicateurs Chair	Heidelberg	Oui	Oui	Positif	

3.2.2. Elevages bactériologique-ment positifs

3.2.2.1. Présence de sérotypes de salmonelles autres que *Salmonella Enteritidis* et *Typhimurium*.

18 élevages étaient contaminés par des sérotypes de salmonelles autres que *Salmonella Enteritidis* et *Typhimurium* (tableau 7).

14 d'entre eux ont présenté des analyses bactériologiques positives de façon sporadique. Ils étaient contaminés par différents sérotypes ayant (groupe 1) ou non (groupes 2 et 3) des antigènes communs avec *S. Enteritidis* ou *Typhimurium*. Ces résultats négatifs de façon intermittente peuvent être liés à l'absence effective des salmonelles dans l'élevage au moment des prélèvements ou bien à leur non-détection par les méthodes d'échantillonnage et d'analyses bactériologiques courantes.

Parmi ces 14 élevages, seulement 3 élevages ont été retrouvés séro-positifs (groupe 3) alors qu'ils étaient contaminés par *S. Hadar* qui ne présente aucun antigène commun avec *S. Enteritidis* ou *Typhimurium*.

Enfin, 4 élevages étaient contaminés en permanence par *S. Heidelberg* ou *S. Agona*, salmonelles appartenant au même groupe antigénique que *S. Typhimurium*, et se sont révélés séro-positifs tout au long de la production (groupe 4).

3.2.2.2. Présence de *Salmonella Enteritidis*

Salmonella Enteritidis a été détectée dans 4 lots : 2 de multiplicateurs chair et 2 de poules pondeuses.

Bien que les contrôles mensuels bactériologiques et sérologiques du premier élevage de multiplicateurs chair aient toujours donné des résultats négatifs, l'éclosoir recevant entre autres les œufs de cet élevage s'est retrouvé contaminé par *S. Enteritidis*.

Une autopsie de 60 poules (regroupées par 5) a montré la contamination d'organes sur un des pools d'animaux ce qui a entraîné l'abattage du troupeau.

En ce qui concerne le deuxième élevage de multiplicateurs chair, *S. Enteritidis* a été retrouvée une seule fois sur une chiffonnette d'environnement. Les autres résul-

tats bactériologiques et sérologiques se sont révélés négatifs jusqu'à la fin de la production.

Les 2 lots de poules pondeuses contaminés par *S. Enteritidis*, qui sont deux bâtiments d'un même élevage, n'ont malheureusement pas pu être suivis depuis la mise en place des animaux (tableau 8).

Suite à une TIAC à *S. Enteritidis*, la DSV a identifié cet élevage comme étant sans doute à l'origine de la toxi-infection. Elle a réalisé 7 chiffonnettes dans chaque bâtiment (poules de 40 semaines).

Le bâtiment 1 était fortement contaminé et pouvait être à l'origine de cette TIAC, alors que le bâtiment 2 s'avérait négatif à 40 semaines. Ensuite, sans doute du fait de la proximité des 2 bâtiments et du passage du personnel de l'un à l'autre, le bâtiment 2 a été contaminé. Cet élevage a alors été suivi à partir de 50 semaines dans le cadre de notre enquête. Les deux bâtiments étaient bactériologiquement positifs mais seul le bâtiment 1 présentait une sérologie positive. Des prélèvements supplémentaires réalisés à 56 semaines dans le bâtiment 2 ont permis de détecter le début de la séro-conversion à la fois sur les vitellus (3+/60) et les sérums (4+/60).

En fin de production, les statuts bactériologiques et sérologiques des deux bâtiments étaient devenus équivalents.

3.2.2.3. Présence de *Salmonella Typhimurium*

Trois élevages de poules pondeuses ont été contaminés par *Salmonella Typhimurium*, tous vers la fin de la production. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Dans le cas de l'élevage 1, il semble que *S. Typhimurium* ait été éliminée de façon naturelle et qu'il n'y ait pas eu d'infection persistante du troupeau bien qu'une séro-conversion transitoire soit apparue en novembre 2000.

En ce qui concerne l'élevage 2, l'absence de résultat sérologique positif peut s'expliquer, soit parce que les poules ont été abattues avant une éventuelle infection et séro-conversion, soit parce que la présence sporadique de *S. Typhimurium* retrouvée dans les prélèvements d'environnement n'a pas été une source d'infection suffisante pour les animaux.

Pour l'élevage 3, un début de détection sérologique a été constaté en novembre 2000, soit 1 mois après la première détection bactériologique positive.

3.2.3. Elevages vaccinés contre *Salmonella Enteritidis*.

Deux élevages de poules pondeuses vaccinées à 12 et 16 semaines par voie intra-musculaire contre *S. Enteritidis* avec le vaccin Salenvac® (Intervet) ont été suivis dans cette

Tableau 8 : **Résultats du suivi bactériologique et sérologique de l'élevage de poules pondeuses contaminé par *S. Enteritidis***

	Age des poules (semaines)	Bâtiment 1		Bâtiment 2	
		Bactériologie ^a	Sérologie ^b	Bactériologie ^a	Sérologie ^b
Prélèvements DSV	40	7+/7	non-fait ^c	0+/7	non-fait ^c
	41	non-fait	non-fait ^c	5+/14	non-fait ^c
	42	non-fait	non-fait ^c	2+/28	non-fait ^c
	50	1+ 1/2	10+/20	1+ 1/2	0+/20
Prélèvements AFSSA	54	2+/2	6+/20	2+/2	0+/20
	56 ^d	non-fait	non-fait	14+/15	3+/60 vitellus 4+/60 sérums
	59	2+/2	9+/20	1+ 1/2	2+/20
	65	2+/2	7+/17	2+/2	3+/15
Fin de production					

Légende :

- (a) : les résultats sont exprimés en nombre d'échantillons positifs sur le nombre total d'échantillons analysés.
- (b) : les résultats sont exprimés en nombre d'échantillons (vitellus) séro-positifs sur le nombre total d'échantillons analysés.
- (c) : les analyses sérologiques n'ont été réalisées qu'à partir de 50 semaines, âge auquel cet élevage est entré dans l'étude.
- (d) : Il s'agit d'analyses complémentaires réalisées sur un plus grand nombre de prélèvements du fait de la discordance des résultats pour les 2 séries précédentes.
- (f) : le prélèvement positif est d'origine fécale.

Tableau 9 : Résultats du suivi bactériologique et sérologique de 3 élevages de poules pondeuses contaminés par *Salmonella Typhimurium*

Dates de prélèvements	Elevage 1		Elevage 2		Elevage 3	
	Bactériologie ^a	Sérologie ^b	Bactériologie ^a	Sérologie ^b	Bactériologie ^a	Sérologie ^b
08/00	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
09/00	1+ ^c /2	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
10/00	1+ ^f /2	négatif	négatif	négatif	2+/2	négatif
11/00	1+ ^c /2	2+/20	1+ ^c /2	négatif	2+/2	1+/20
12/00	négatif	négatif	négatif	négatif	Fin de production	
01/01	1+ ^f /12 ^c	négatif	1+ ^c /2	négatif		
Fin de production						

Légende : (a) et (b) : voir tableau 8. (c) : un plus grand nombre de chiffonnets a été réalisé en fin de production. (e) : le prélèvement positif est la chiffonnette d'environnement (poussières). (f) : le prélèvement positif est d'origine fécale.

étude. *Salmonella* Braenderup (O 6,7,14 ; H1 e,h ; H2 e,n,z15) a été retrouvée tous les mois dans l'élevage 1 dès le début de la production et aucune salmonelle n'a été détectée dans l'élevage 2. La figure 2 présente les DOC moyennes et le pourcentage d'échantillons séro-positifs durant toute la durée de production de ces deux élevages vaccinés.

Dans les deux élevages, la sérologie est positive à chaque série de prélèvements depuis la mise en place des animaux, soit au moins 4 semaines après la deuxième injection du vaccin, jusqu'à la fin de la production.

Le pic de DOC moyenne se situe à 36 semaines avec une valeur de 1,670 pour l'élevage 1 et à 43 semaines avec une valeur de 1,730 pour l'élevage 2. Ce dernier présente un pourcentage d'échantillons séro-positifs fluctuant et plus faible.

4. Discussion

La technique ELISA mise au point à l'AFSSA - Site de Ploufragan n'est donc pas strictement spécifique de *Salmonella* Enteritidis (SE) et *Salmonella* Typhimurium (ST). En raison de communautés antigéniques entre les différents sérovars de salmonelles classés dans le même groupe (antigènes O majeurs communs), ou de différents groupes, ou encore entre différents genres bactériens de la famille des entérobactéries (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*,...), il est quasiment impossible de construire une technique ELISA basée sur des antigènes du LPS qui soit strictement spécifique de SE et ST. Ainsi, dans le cadre de cette étude, l'ELISA SE/ST a détecté la présence de *Salmonella* Heidelberg (SHe) et Agona (SA), qui appartiennent au même groupe antigénique que

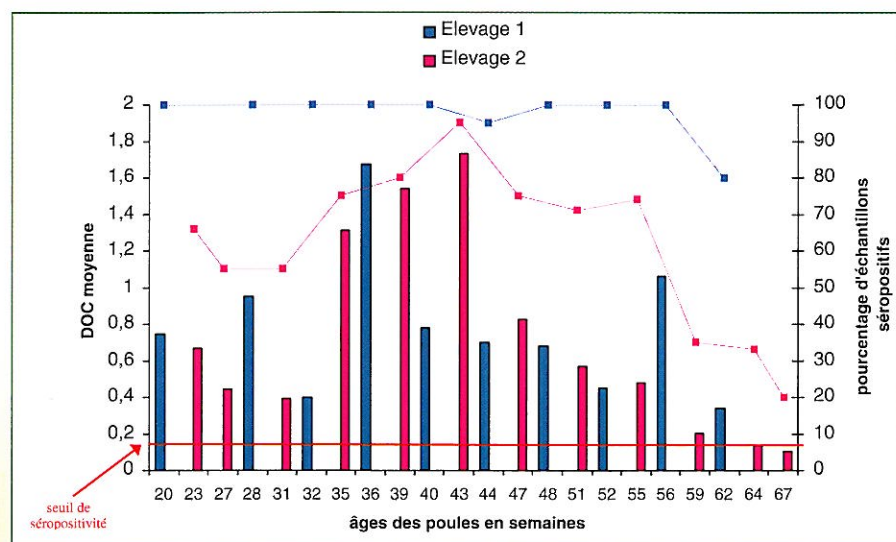
ST (groupe B), et de *Salmonella* Hadar (SHa) qui ne possède pourtant aucun antigène commun ni avec SE, ni avec ST. Le point commun entre ces 3 souches (SHe, SA et SHa) est leur éventuelle capacité à induire une contamination verticale (dans l'oeuf) ou pseudo-verticale (sur la coquille) puisque s'agissant de parquets de multiplicateurs, ces souches étaient également isolées au couvoir et sur les poussins livrés à partir de ces couvoirs.

De plus, il n'est pas exclu que certains élevages soient contaminés par plusieurs sérotypes mais qu'un seul soit détectable par la bactériologie en raison de l'utilisation de milieux sélectifs plus favorables à certains sérotypes, ce qui a déjà été montré chez des porcs artificiellement contaminés (Van Winsen et al., 1999).

Deux élevages sur 45 ont présenté une sérologie positive sans qu'il ait été possible d'identifier les bactéries responsables de cette séroconversion.

Bien que le nombre d'élevages contaminés par *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium inclus dans cette étude soit faible (7 sur 45), un décalage entre les réponses bactériologiques et sérologiques peut déjà être constaté. Ce phénomène pourrait retarder l'élimination d'un troupeau positif et favoriser la diffusion de l'infection si l'ELISA SE/ST était utilisée comme seule technique de détection. Ce délai de séroconversion est sans doute dû au temps nécessaire à la propagation des salmonelles dans l'élevage puis dans l'organisme des animaux et enfin à l'établissement de la réponse immunitaire. Il est toujours possible de diminuer en

Figure 2 : Variation de la DOC moyenne (histogrammes) et du pourcentage d'échantillons séro-positifs (courbes) au cours du temps dans les 2 élevages de poules pondeuses vaccinées par le Salenvac® (Intervet).



partie ce décalage en augmentant le nombre de prélèvements sérologiques.

Il serait également intéressant de déterminer quel est, de la sérologie ou de la bactériologie réalisée sur des prélèvements d'organes et/ou de fèces et/ou d'environnement, l'indicateur le plus pertinent et le plus précoce du risque de transmission verticale (Humbert et al., 2001). En effet, la présence de salmonelles, et en particulier de *S. Enteritidis*, à l'intérieur même de l'oeuf constitue la source majeure de toxi-infection alimentaire.

En raison de sa simplicité d'utilisation et de sa possible automatisation, la sérologie demeure un outil très intéressant dans le cadre d'un dépistage à grande échelle de troupeaux "à risques" ainsi que pour le contrôle de la stimulation immunitaire suite à une vaccination contre *Salmonella* Enteritidis et/ou Typhimurium. Néanmoins, en cas de sérologie positive dans un élevage n'ayant eu aucune vaccination contre *Salmonella*, une confirmation bactériologique restera nécessaire du fait d'une possible réponse non spécifique de la technique

ELISA mais aussi pour des raisons épidémiologiques (détermination exacte du sérotype) et réglementaires (*Enteritidis* et *Typhimurium* étant actuellement les deux seuls sérotypes visés par la réglementation).

Remerciements

Cette étude a été financée par le FEOGA.

Les auteurs tiennent également à remercier les laboratoires d'analyses, l'UGPVB, les groupements, les couvoirs, les éleveurs et les vétérinaires qui ont participé à cette étude.

Références bibliographiques

ANONYME, 1992.

Directive Européenne 92/117/CEE concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infections et d'intoxications dus à des denrées alimentaires.

Journal officiel des Communautés européennes, n° L62, 38-48.

ANONYME, 1998.

Arrêtés du 26 octobre 1998 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en reproduction pour la filière chair et en production d'œufs de consommation pour la filière ponte.

Journal Officiel de la République Française, n°284, 18444-18453.

FAWCETT P.T., GIBNEY K.M., ROSE C.D., KLEIN J.D., DOUGHTY R.A., 1991.

Adsorption with a soluble *E. coli* antigen fraction improves the specificity of ELISA tests for Lyme Disease. The journal of Rheumatology, 18 (5) : 705-708.

HUMBERT F., MORVAN H., 1996 (a).

Isolement et identification des salmonelles chez les volailles. Texte français de référence BA 60 pour l'application du programme d'accréditation n°116 du COFRAC au titre de cette technique.

HUMBERT F., MORVAN H., 1996 (b).

Isolement et identification des salmonelles en élevage avicole. Texte français de référence BA 70 pour l'application du programme d'accréditation n°116 du COFRAC au titre de cette technique.

HUMBERT F., JOUY E., PROUX K. et SALVAT G., 2001.

Evaluation du nombre d'œufs contenant *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium dans la production de parquets de pondeuses naturellement contaminés. Quatrièmes Journées de la Recherche Avicole, 27-29 mars, Nantes, France.

KLES V., MORIN M., HUMBERT F., LALANDE F., GUITTET M., BENNEJEAN G., 1993.

Diagnostic sérologique des salmonelloses aviaires : Mise au point d'un test ELISA utilisant des antigènes adsorbés à l'aide de sérums anticollibacillaires. Journal of Veterinary Medicine. (1993) B 40 : 305-325.

POPOFF M.Y., LE MINOR L., 1997.

Liste alphabétique des noms attribués aux sérovars de la sous-espèce enterica avec leurs formules antigéniques. Centre collaborateur OMS de référence et de recherche pour les *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris.

PROUX K., HUMBERT F., GUITTET M., BENNEJEAN G., 1995.

Dépistage sérologique des salmonelloses aviaires à *Salmonella* Enteritidis. Premières journées de la recherche avicole, 28 au 30 mars, Angers, France, 215-217.

PROUX K., JOUY E., HOUDAYER C., PROTAIS J., DIBB-FULLER M., BOSCHER E., GILLARD A., BEAUMONT C., DUCHET-SUCHEAUX M., 2001.

Comparison of anti-*Salmonella* Enteritidis antibodies in hen sera and egg yolks. British poultry science 2001; 42 Suppl: 35-36.

VAN WINSEN et al., 1999.

Proceedings of the third international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork, august 5-7, Washington DC, USA, 90-91.

Remarque :

Les textes COFRAC BA 60 et BA 70 sont maintenant respectivement remplacés par les normes AFNOR NF U47-101 et NF U47-100.