

DETECTION SIMULTANEE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ET ENTERITIDIS PAR PCR DANS DES PRELEVEMENTS ISSUS DE L'ENVIRONNEMENT D'ELEVAGES AVICOLES

Soumet Christophe^{1,2}, Ermel Gwennola^{1,2}, Salvat Gilles¹, Colin Pierre¹

¹ Unité de Recherches d'Hygiène et Qualité des Produits Animaux,
CNEVA Ploufragan : Zoopôle Beaucemaine, BP 53 - 22 440 Ploufragan

² Unité de Recherches en Biologie Moléculaire,
CNEVA Ploufragan : Zoopôle Beaucemaine, BP 53 - 22 440 Ploufragan

Résumé

Une réaction d'amplification génique mise au point avec trois couples d'amorces (PCR Multiplex) permet la détection de l'ensemble des sérotypes de *Salmonella* et plus particulièrement de *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium. L'évaluation de cette PCR par rapport à la bactériologie a été réalisée à partir de 22 chiffonnettes d'environnement d'élevages avicoles ; ils ont été pré-enrichis pendant 24 h en eau peptonée tamponnée en phosphate suivis ou non d'un enrichissement sélectif de 24 h sur MSRV. Les échantillons pré-enrichis ont subi un traitement utilisant une résine échangeuse d'ions (InstagèneTM) ou par immuno-séparation à l'aide de billes magnétiques (DynabeadsTM anti-*Salmonella*) ; à l'aide de ces deux protocoles, 8 résultats positifs sont notés en 24 h contre 20 avec la bactériologie. La méthode MSRV-PCR donne en 48 h des résultats comparables à ceux obtenus par la bactériologie.

Introduction

Les *Salmonella* sont les principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires collectives en France ; elles entraînent de nombreuses hospitalisations et quelques décès par an. La transmission à l'homme se fait principalement à la suite de la consommation d'ovoproduits et de viandes de volailles contaminés. En pathologie humaine, les sérotypes les plus souvent isolés sont Enteritidis, Typhimurium et Virchow ; *Salmonella* Enteritidis, Virchow et Hadar prédominent dans les prélèvements de viandes de volailles (Desenclos et al., 1996).

Une surveillance des *Salmonella* est donc nécessaire tout le long de la chaîne de production, "de la fourche à la fourchette", afin d'assurer la sécurité alimentaire des consommateurs. Ce contrôle peut être mis en oeuvre à l'aide de méthodes rapides, fiables et adaptées à l'échantillon analysé. A l'heure actuelle, la mise en évidence des *Salmonella* s'effectue à l'aide de méthodes classiques de bactériologie ; cependant, celles-ci permettent généralement d'obtenir un résultat présomptif qu'au bout de 3 jours. Récemment, des méthodes alternatives se sont développées, certaines d'entre elles sont commercialisées ; elles comprennent des méthodes utilisant des anticorps, des acides nucléiques et des nouveaux milieux de culture (Swaminathan et Feng, 1994). Aucune de ces méthodes n'est à l'heure actuelle à la fois suffisamment sensible, spécifique et rapide.

Dans cette étude, nous reportons l'évaluation d'une méthode basée sur la réaction d'amplification

génique (P.C.R.) pour la détection non seulement de l'ensemble des sérotypes de *Salmonella* mais également de *Salmonella* Enteritidis et de *Salmonella* Typhimurium à partir de prélèvements issus de l'environnement d'élevages avicoles.

Matériel et Méthodes

1. Méthode bactériologique pour la détection des *Salmonella*

Des prélèvements issus d'environnement d'élevages avicoles (chiffonnettes) sont placés dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée en phosphate (AES Laboratoire, Combourg, France) et incubés pendant 18 à 20 h à 37°C. Trois gouttes de ce milieu de préenrichissement sont déposés sur MSRV, lequel est incubé pendant 18 à 20 h à 41,5°C. Parallèlement, 1 ml de bouillon de pré-enrichissement est additionné à 9 ml de tétrathionate de Müller-Kauffmann (AES Laboratoire) et incubé à 37°C pendant 18 à 20 h. Les échantillons présentant un halo de migration sur MSRV sont supposés positifs ; ils sont alors isolés sur Rambach (Merck, Nogent sur Marne, France) à partir du MSRV et sur XLT4 (AES Laboratoire) à partir du tétrathionate. A partir des échantillons négatifs, qui ne présentent pas de halo de migration, un isolement sur XLT4 est effectué à partir du bouillon de tétrathionate. Les colonies caractéristiques de *Salmonella* identifiées sur ces milieux sont caractérisées biochimiquement sur Kligler-Hajna (AES Laboratoire) puis sérologiquement à l'aide de sérums somatiques et flagellaires (Diagnostic Pasteur, France).

2. Préparation des échantillons pour la PCR

2.1. Traitement des échantillons avec la résine échangeuse d'ions : Instagène™ (Biorad, Ivry s/Seine, France)

A partir du bouillon de pré-enrichissement, 1 ml est prélevé et centrifugé (13 000g, 5 min) et 200 µl d'Instagène™ sont ajoutés sur le culot. Le mélange est incubé pendant 30 min à 56°C puis chauffé à 100°C pendant 10 min. Après centrifugation (13 000 g, 1 min), 2 µl de surnageant sont utilisés pour la PCR.

2.2. Traitement des échantillons par immunoséparation (IMS) à l'aide de billes magnétiques : Dynabeads™ anti-Salmonella (DynaL, Oslo, Norvège)

Une partie aliquote de 1 ml de bouillon de pré-enrichissement est additionné dans un tube Eppendorf™ à 20 µl de billes Dynabeads™ (DynaL, Oslo, Norvège) recouvertes d'anticorps dirigés contre les *Salmonella*. Chaque est placé en agitation rotative pendant 30 min puis dans un portoir aimanté MPC-E (DynaL) pendant 2 à 3 min. Après ce temps de contact, le liquide est délicatement aspiré puis les billes sont remises en suspension dans 1 ml de solution de lavage PBS-Tween 20 (0,05%). Cette opération est renouvelée à deux reprises, puis les billes sont remises en suspension dans 50 µl de solution de lavage. Cette suspension est chauffée 10 min à 100°C puis placée dans la glace avant PCR.

3. Dépôt sur MSRV

Le protocole est identique à celui décrit dans la méthode de bactériologie. L'échantillon positif présente un halo de migration dont une partie aliquote est prélevée à l'aide d'une oëse (1 µl), placée dans 200 µl d'eau ultra-pure stérile puis chauffée pendant 20 min à 56°C avant PCR.

4. Réaction d'amplification génique (P.C.R.) et détection des produits amplifiés sur gel d'agarose

La réaction d'amplification génique est réalisée à partir de 2 µl d'échantillon extrait selon des protocoles décrits ci-dessus ou de 2 µl de suspension de MSRV. Cet échantillon est additionné au mélange réactionnel composé de 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% gélatine, 0,6 µM de chacune des amorces, 100 µM de dNTP (Boehringer Mannheim, Meylan, France) et 1 U de *Taq* Polymerase (Boehringer Mannheim). Trois couples d'amorces sont utilisés : ST11-ST15 (Aabo et al., 1991), amorces démontrées comme spécifiques du

genre *Salmonella* ; S1-S4, amorces sélectionnées à partir de la séquence d'ADN d'un plasmide de virulence (Wood et al. 1996) ; elles sont spécifiques de *Salmonella* Enteritidis phage type 4 (PT4) ; Fli15-Typh04, amorces sélectionnées à partir du gène *fliC* et spécifiques de *Salmonella* Typhimurium.

La PCR est réalisée dans un thermocycleur GeneAmp 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) sous les conditions suivantes : 30 cycles : 30 s à 94°C, 1 min à 55°C, 30 s à 72°C suivis d'une extension terminale de 10 min à 72°C. Les produits amplifiés (10 µl) sont ensuite analysés par électrophorèse (120 Volts, 1 h) sur un gel d'agarose (1,5%) puis visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

Résultats-Discussion

Détection par PCR Multiplex de *Salmonella* spp, et des sérotypes Typhimurium et Enteritidis à partir des MSRV

Des échantillons de chiffonnettes d'environnement naturellement contaminés par *Salmonella* pré-enrichis puis déposés sur MSRV sont analysés par PCR. Trois couples d'amorces sélectionnés à partir de gènes différents sont utilisés dans un même tube de réaction d'amplification. Les résultats sont reportés dans la figure 1. Les amorces ST11-ST15 détectent l'ensemble des sérotypes de *Salmonella* (puits 2, 3, 4, 6 à 20) et génèrent un produit d'amplification de 429 pb ; des prélèvements réalisés sur les halos de migration des boîtes MSRV pour les échantillons 1 et 5 n'ont pas montré de fragment de 429 pb, spécifique du genre *Salmonella* ; par la méthode classique, ces échantillons se sont révélés négatifs ; S1 et S4 (Wood et al., 1994) donnent un produit d'amplification (250 bp) spécifique de *Salmonella* Enteritidis PT4 (puits 9, 10) et les amorces Typh04-Fli15, spécifiques de *Salmonella* Typhimurium, donnent un amplicon de 620 pb (puits 8 et 16). La méthode MSRV-PCR permet d'obtenir un résultat en 48 heures.

Evaluation de protocoles de traitement des échantillons avant PCR

Pour avoir un résultat en 24 heures, des échantillons ont été analysés à partir de milieux de pré-enrichissement. La P.C.R. appliquée directement sur ces échantillons présentant un seuil de détection élevé (10⁷ *Salmonella* par ml) ou ne donnant aucun résultat, des protocoles utilisant l'Instagène™ ou l'immunoséparation (IMS) à l'aide des billes ont été testés. Cette évaluation par rapport à la méthode de bactériologie utilisant le MSRV a été mise en oeuvre sur 22 chiffonnettes.

Les résultats sont répertoriés dans le tableau 1. Deux résultats négatifs et 20 résultats positifs sont notés avec la bactériologie alors que seulement 8 résultats positifs sont trouvés avec le protocole InstagèneTM-PCR, soit une sensibilité de 40 %. Des résultats similaires sont notés avec le protocole IMS-PCR. La faible sensibilité de ces deux protocoles peut s'expliquer par un nombre insuffisant de *Salmonella* présentes dans le milieu de pré-enrichissement ou par une inhibition de la PCR par des molécules contenues dans les prélèvements. Par contre, la PCR appliquée à partir du milieu sélectif semi-solide (MSRV) donne les meilleurs résultats. Elle permet l'obtention d'un plus grand nombre de résultats positifs, identique à celui trouvé par la bactériologie. L'analyse des échantillons par le protocole MSRV-PCR demande 24 heures supplémentaires par rapport à celle réalisée à partir des milieux pré-enrichis traités avec l'InstagèneTM ou par immuno-séparation à l'aide des DynabeadsTM anti-*Salmonella* ; sa mise en oeuvre est aisée et adaptée à l'analyse d'un nombre important d'échantillons. De plus, le seuil de détection sur ce milieu est très faible, d'environ 60 *Salmonella* par ml de milieu d'après De Smedt et Bolderdijk (1987). Le protocole MSRV-PCR diminue le nombre d'analyses et par conséquent le coût puisque seuls les échantillons présentant un halo de migration sur MSRV sont analysés par PCR. Ce milieu ne permet pas la détection des *Salmonella* non mobiles et des sérotypes Typhi et Paratyphi A ; cependant, l'incidence des *Salmonella* non-mobiles reste relativement faible (0.15 %) d'après Holbrook et al. (1989).

Le protocole MSRV-PCR sera évalué en comparaison avec la méthode de bactériologie sur plusieurs centaines de prélèvements issus de l'environnement d'élevages avicoles. D'autres protocoles basés sur l'immunoconcentration (ICS-VIDAS, Biomérieux) ou la PCR (Probelia, Sanofi) sont en cours d'étude pour réduire le temps nécessaire à la détection de *Salmonella*.

Références

- Aabo S., Rasmussen O.F., Rossen L., Sorensen P.D., Olsen J.E., 1993. Mol. Cell. Probes, 7, 171-178
- Desenclos J-C, Bouvet, P., Pierre V., Brisabois A., Fremy S., Lahellec C., Grimont C., Grimont P.A.D., 1996. Bull. Soc. Fr. Microbiol., (3), 11, 209-215
- De Smedt J.M., Bolderdijk R.F., 1987. J. Food. Prot., 50, 658-661
- Holbrook R., Anderson J.M., Baird-Parker A.C., Dodds L.M., Sawhney A., Stuchbury S.H., Swaine D., 1989. Lett. Appl. Microbiol., 8, 139-142
- Swaminathan B., Feng P., 1994. Mol. Cell. Probes, 8, 473-479

FIGURE 1 : PCR Multiplex à partir de prélèvements issus de l'environnement d'élevages avicoles pré-enrichis puis enrichis sur MSRV. Sérotypes de *Salmonella* identifiés par la méthode de bactériologie : Hadar (puits 2 et 15) ; Infantis (puits 3, 6, 17) ; Virchow (puits 4) ; Panama (puits 7) ; Typhimurium (puits 8 et 16) ; Enteritidis (puits 9 et 10) ; Bredeney (puits 11) ; Heidelberg (puits 12, 18, 20) Tennessee (puits 13) Indiana (puits 19) ; échantillons dont les MSRV sont positifs mais les isollements sur Rambach sont négatifs (puits 1, 5, 14) ; témoin négatif : eau ultra-pure stérile utilisée pour la PCR (puits 21) ; 300 ng de marqueurs de poids moléculaires ϕ x 174-Hae III (Gibco BRL, France) (puits 22).



TABLEAU 1 : Détection de *Salmonella* par différentes méthodes à partir de chiffonnets issues de l'environnement d'élevages avicoles pré-enrichies en eau peptonée tamponnée en phosphate ou enrichies sur MSRV.

N° échantillon	Bactériologie	sérotype	MSRV	MSRV PCR	Instagène PCR	IMS PCR
1	+	Enteritidis	+	+	-	-
2	+	Enteritidis	+	+	-	-
3	-		-	-	-	-
4	+	Infantis	+	+	+	+
5	+	Infantis	+	+	+	+
6	+	Infantis	+	+	+	+
7	+	Infantis	+	+	+	+
8	+	Infantis	+	+	+	+
9	+	Infantis	+	+	-	-
10	+	Montevideo	+	+	-	-
11	+	Montevideo	+	+	-	-
12	+	Heidelberg	+	+	-	-
13	+	Enteritidis	+	+	-	-
14	+	Enteritidis	+	+	-	-
15	-		-	-	-	-
16	+	Heidelberg	+	+	-	-
17	+	Heidelberg	+	+	+	+
18	+	Heidelberg	+	+	+	+
19	+	Tennessee	+	+	+	+
20	+	Tennessee	+	+	-	-
21	+	Tennessee	+	+	-	-
22	+	Anatum	+	+	-	-