

RECHERCHER LES SALMONELLES POURQUOI - COMMENT - JUSQU'OU

Florence Humbert¹ et Hervé Morvan²

¹ CNEVA Ploufagan, Zoopole St-Brieuc-Ploufragan, BP 53, 22440 Ploufragan

² LDA 22, Zoopole St-Brieuc-Ploufragan, BP 54, 22440 Ploufragan

Introduction

La filière avicole réalise depuis de nombreuses années des recherches de Salmonelles à tous les étages de ses différents types de production. L'apparition de *S. Enteritidis* dans la fin des années 80 a provoqué une intensification de ces contrôles, sans qu'on ait le sentiment que le problème global des Salmonelles ait été résolu.

Il faut cependant rappeler que les Salmonelles ne sont pas seulement multipliées et excrétées par les volailles et que dans les zones à forte densité d'élevages comme le grand-ouest, il est hors de question d'améliorer durablement ce problème sans la participation des autres filières (bovins, porcs en particulier).

Cependant, dans certains cas, cette approche globale est discutable. En effet, en dehors de la traditionnelle division entre sérotypes ubiquistes (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *Virchow*, etc...) et sérotypes spécifiques d'espèces (*Typhi* chez l'homme, *Gallinarum* chez les volailles, *Choleraesuis* chez le porc) il semble que chaque souche (chaque clone) de Salmonelles développe une "affinité" pour certaines espèces animales sans que l'on ait pu, jusqu'à présent, comprendre exactement pourquoi.

En effet, il est très étonnant d'isoler *S. Enteritidis* presque uniquement des volailles, alors que ce sérotype a sans doute largement contaminé l'environnement de tous les animaux d'élevage, en particulier depuis 6-8 ans. Le relais de ce sérotype n'a pas, fort heureusement, été assuré par d'autres productions (porcs, bovins), sauf peut être par les rongeurs et les oiseaux sauvages, mais dans leur cas particulier, on ne peut réellement parler de production animale.

Il n'en demeure pas moins que l'ensemble des contrôles visant à rechercher les Salmonelles dans la filière avicole permet aujourd'hui à cette filière, de disposer de données épidémiologiques précises sur l'incidence de ces bactéries, alors que ces mêmes données manquent ou sont tout à fait parcellaires pour les autres filières de production animale. La filière avicole dispose donc aujourd'hui, si elle en a la volonté et/ou les moyens, de tous les renseignements nécessaires à la conduite raisonnée d'une prophylaxie efficace. Encore faut-il ne pas se tromper de cibles et de priorités à chaque étage de la production et considérer chacun de ces étages dans un ordre logique.

Pourquoi

En dehors des cadres réglementaires ou contractuels et si les contrôles sont effectivement possibles partout et tout le temps (la recherche de salmonelles dans les environnements des élevages et chez les oiseaux ne posant aucun problème particulier à tout bon laboratoire d'analyses vétérinaires) ils n'ont d'intérêt que :

1. S'ils font partie d'une stratégie d'amélioration du problème Salmonelles dans une filière de production. Pourquoi rechercher les Salmonelles si l'on a décidé plus ou moins consciemment qu'aucune action corrective ne sera mise en oeuvre ?

C'est peut être le moment de s'interroger s'il ne vaut pas mieux un peu moins d'analyses et un peu plus d'actions correctives. D'autant que les analyses sont devenues très performantes, et que les moyens d'action sont bien connus.

2. S'ils sont comparables dans le temps

La prophylaxie des Salmonelles est, dans un système de production, une action de longue haleine. Un changement de l'échantillonnage, du mode de prélèvement ou de la technique d'analyse peut modifier les résultats et les pourcentages de positifs qui deviennent alors difficiles à analyser en termes de tendances d'un mois sur l'autre ou d'une année sur l'autre.

3. S'il sont exploités

Les résultats des analyses doivent être utilisés. Pour cela il faut avoir prévu les contrôles en fonction de questions précises auxquelles on désire apporter une réponse (évaluation d'une technique de décontamination des carcasses ou d'un bâtiment, maîtrise des matières premières dans une usine d'aliments, classement des éleveurs en différents groupes plus ou moins à risque dans une intégration...) ou en fonction des objectifs à atteindre ou des résultats escomptés après la mise en oeuvre de mesures correctives. Il est dangereux "d'ensiler" des résultats d'analyses sans les utiliser dans la mesure où l'on peut parfois confondre la réalisation des analyses avec la résolution des problèmes...

Comment

Les techniques de recherche des Salmonelles sont, pour la plupart, normalisées. C'est-à-dire qu'il existe une norme nationale ou internationale qui précise les échantillons auxquels elle s'applique et tous les détails de l'analyse de ces échantillons, les modalités d'échantillonnage et la réalisation du prélèvement lui-même n'étant que rarement normalisés. Ces normes sont issues du travail de l'ISO (International Standard Organisation) et de l'AFNOR (Association Française de Normalisation) et plus récemment du COFRAC (Comité Français d'Accréditation). On distingue :

1. Les méthodes horizontales

1.1. Les méthodes horizontales de référence

La principale norme qui concerne la recherche des Salmonelles est la norme ISO 6579 de 1993. Ce texte, qui est un "texte d'hygiénistes" comme le précise son domaine d'application (produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale), préconise l'association du sélénite-cystine et du Rappaport-Vassiliadis pour l'étape d'enrichissement. Cette norme est pratiquement inapplicable en routine puisqu'elle oblige à l'isolement après 24h, mais aussi après 48h d'incubation de chacun des milieux d'enrichissement sur deux milieux d'isolement (dont obligatoirement le milieu au rouge de phénol et au vert brillant) en utilisant 2 boîtes par milieu. Chaque prélèvement correspond donc à 16 boîtes d'isolement.

Cette norme constitue cependant la référence en cas de litige et c'est celle qui apparaît dans les textes réglementaires, en particulier dans la directive zoonose 92/117/EC.

1.2. Les méthodes horizontales de routine

Toujours en microbiologie alimentaire, la méthode de routine pour la recherche des Salmonelles est la méthode V08-052 de septembre 1993. Plus praticable en routine, cette technique reste cependant calquée sur la norme ISO 6579 (mêmes milieux d'enrichissement).

2. Les méthodes sectorielles

Bien que ces normes sortent parfois du cadre de la filière avicole, il existe :

2.1. Des normes spécifiques

Elles concernent la gélatine alimentaire (norme NF V 59-104) et le lait et les produits laitiers (norme FIL 93B)...

2.2. Des méthodes officielles

Outre l'arrêté du 21 Décembre 1979 paru au JO du 19 janvier 1980 et maintes fois modifié depuis (JO du 29 septembre 1984, du 23 mars 1985, du 8 juillet 1988 et du 20 avril 1989) qui concerne en partie la

filière avicole et qui décrit quelques techniques bactériologiques, une circulaire (DQ/SVHA/N84/n°8098 du 25 septembre 1984) décrit également une technique de recherche des Salmonelles dans différents produits laitiers destinés à être exportés vers certains pays. Plus importantes sont les Directives européennes 95/160 (reproducteurs et poussins de 1 jour), 95/161/EC (poules pondeuses), 95/168 (oeufs de consommation), 95/410 (volailles de chair vivantes) et 95/411 (viandes de volailles fraîches) qui décrivent les échantillons et les techniques à mettre en oeuvre pour exporter ces différents produits vers la Finlande et la Suède. Dans ces directives la méthode de recherche des Salmonelles est toujours la méthode ISO 6579, mais des méthodes "offrant des garanties équivalentes" peuvent être autorisées, au cas par cas, et seulement pour les deux dernières directives citées.

3. Les méthodes COFRAC

Au niveau français et pour ce qui concerne le secteur de la "santé animale", bien que ce terme ne soit pas très approprié puisqu'en matière de Salmonelles et de volailles la pathologie reste l'exception par rapport au portage sain qui constitue la règle générale, nous avons recherché au sein du COFRAC la technique la mieux adaptée (meilleur rapport qualité (sensibilité+spécificité) / prix) pour l'analyse en série, à répétition et vraiment de routine des échantillons imposés par la directive zoonose 92/117 (parquets de reproducteurs) ou par le COHS (parquets de pondeuses d'oeufs de consommation). Tout parquet de reproducteurs doit en effet être échantillonné tous les 15 jours (en production) et même si l'on ne prévoit qu'un échantillon par parquet, le nombre de parquets de parentales étant en France de l'ordre de 1000, ceci représente 27000 analyses annuelles pour le seul secteur de la multiplication.

Le COFRAC édite donc deux textes dans le programme 116 (bactériologie animale) : BA-60 (isolement et identification des Salmonelles chez les volailles) et BA-70 (isolement et identification des Salmonelles en élevage avicole). Le schéma du mode opératoire de la procédure classique de mise en évidence des Salmonelles issu de ces textes est présenté dans la FIGURE I.

Concernant ces textes, quelques points essentiels doivent être soulignés :

- Pour tous les prélèvements réalisés dans les élevages de reproducteurs ou destinés à contrôler ces élevages (prélèvements de couvoir), on doit obligatoirement employer deux milieux d'enrichissement, alors que pour les élevages de production (filière chair ou ponte), un seul milieu d'enrichissement (le Tétrathionate de Muller-Kauffman modifié ou équivalent) est requis. Cette

distinction est en rapport avec les conséquences épidémiologiques pour l'aval de la filière de la mise en évidence de Salmonelles, conséquences qui sont évidemment beaucoup plus importantes dans le cas d'un parquet de multiplication, et a fortiori dans le cas d'un parquet de sélection.

- La phase de pré-enrichissement (eau peptonée tamponnée) est obligatoire pour tous les prélèvements. Cependant, pour les oeufs embryonnés non béchés et pour les organes profonds d'animaux malades (pathologie) ou sains (poussins de 1 jour), il est prévu d'effectuer un isolement direct sur milieu non sélectif avant la mise en oeuvre de la procédure classique (figure 1). Ceci pour ne pas retarder à plus de 72 heures un résultat que l'on peut parfois obtenir en 48 heures, et surtout pour ne pas manquer de diagnostiquer *S. Gallinarum* ou une *Salmonella arizonae* si ces bactéries venaient à réapparaître en France.

- Les procédures utilisées pour l'identification biochimique ou sérologique des souches isolées ne sont pas décrites dans ces textes. Il appartient à chaque laboratoire de les définir et de les préciser (par écrit).

- Le sérotypage complet de toutes les souches de *Salmonella* isolées n'est pas obligatoire, mais il est demandé de disposer des sérums nécessaires à l'identification complète d'une quinzaine de sérovars qui, à l'exception de *Gallinarum*, sont les sérovars les plus fréquemment isolés de la filière avicole.

- Dans ces deux textes, et surtout pour celui correspondant à la mise en évidence des Salmonelles dans les élevages (prélèvements de fientes, poussières, chiffonnettes...), l'accent n'a sans doute pas été suffisamment mis sur les performances du milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis pour le recouvrement de faibles contaminations par *S. Enteritidis* en particulier.

En conclusion, ces deux textes constituent une première approche vers la normalisation, en France, des analyses effectuées dans le cadre du COHS ou de la directive 92/117. Dans le cas d'échanges intra-communautaires se souvenir que la norme ISO 6579 fait loi. Enfin, il est important que ces deux textes même si ce sont des "normes", ne soient pas figés et que toute amélioration technique puisse y être intégrée rapidement.

Cependant si les techniques de laboratoire sont en bonne voie de normalisation, il n'en est pas de même pour les nombres et les types d'échantillons. A notre connaissance, aucune étude n'a comparé les multiples échantillons que l'on peut prélever, tant au couvoir qu'à l'élevage, pour surveiller des parquets. A titre indicatif, le tableau I rapporte les fréquences et les échantillons prélevés dans différents pays, telles qu'elles ont été recensées par Wray et Davies pour la WHO. Il ressort de ce tableau comparatif que le prélèvement qui apparaît dans la Directive 92/117

(250 méconium au couvoir) est sans doute une contribution anglaise.

Jusqu'où

Jusqu'où faut-il rechercher les Salmonelles dans la mesure où l'éradication est illusoire ?

En qui concerne les Salmonelles, il est nécessaire de limiter au maximum :

1. La multiplication et l'excrétion massives de ces bactéries par les oiseaux, donc la contamination des animaux lorsqu'ils sont jeunes et surtout pendant leurs 10 premiers jours d'élevage, ainsi que les épisodes de Salmonelloses cliniques.

Actuellement, le niveau de contamination est encore malheureusement suffisamment élevé pour que l'on s'attache à rechercher, très correctement les Salmonelles au niveau des étapes stratégiques, à partir desquelles ces bactéries sont capables de diffuser à plusieurs milliers, voire plusieurs millions d'animaux. Il s'agit essentiellement dans nos systèmes de production intensifs des sélectionneurs et multiplicateurs d'une part, et des matières premières et des usines d'aliments du bétail d'autre part. Non pas que l'abattoir soit incapable d'intercontaminer des milliers de carcasses par jour, mais cette intercontamination, en terme de diffusion des Salmonelles dans et vers la filière avicole, a sans doute moins d'importance que, par exemple, la bonne marche de la station d'épuration qui gère les effluents de cet abattoir et les modalités d'épandage des boues de cette station.

2. Les rejets sans précautions des fientes, lisiers, fumiers des parquets d'animaux multiplicateurs et excréteurs et des effluents d'abattoirs.

On sait que le stockage (des fumiers s'il est correctement réalisé) constitue la technique la moins coûteuse pour diminuer les Salmonelles avant l'épandage. Tant que l'on n'aura pas pris certaines mesures afin de limiter le pouvoir contaminant de ces rejets, les Salmonelles multipliées et excrétées par nos animaux d'élevage, continueront d'être dispersées dans l'environnement, seront retrouvées chez les rongeurs, les oiseaux sauvages et dans l'eau des rivières, enfin à terme dans l'environnement immédiat des bâtiments d'élevage et dans les matières premières des aliments du bétail.

En ce qui concerne les Salmonelles, le pouvoir polluant de nos systèmes d'élevages est important. Ce risque de pollution de l'environnement paraît même très important puisque "The Lancet", revue médicale de langue anglaise, vient de faire paraître un article rapportant la présence de *S. Enteritidis* chez les pingouins de l'Antarctique. L'article s'intitule

"*S. Enteritidis* zoonose pour l'homme ou humanose pour les animaux ?" Il nous appartient de maîtriser ce type de pollution, moins par des contrôles ou des analyses que par des actions correctives qu'il est urgent de prendre, ces actions étant bien connues en ce qui concerne la filière avicole. La prophylaxie doit commencer par l'amont sans que l'effort financier soit intégralement et totalement pris en charge par ce secteur. Il faut donc que dans chaque "pyramide" de production, de l'amont jusqu'à l'aval, les différents intervenants professionnels se concertent pour décider de leur stratégie vis à vis de ce problème (tous sérotypes confondus), des moyens qu'ils y consacrent et des résultats qu'ils escomptent. Ce n'est qu'avec ce type de stratégie que l'on mérite le nom de filière. Enfin la prophylaxie des *Salmonelles* devrait passer par des actions qui visent à protéger l'environnement, au sens large du terme.

Références

- Recueil des normes françaises, Analyses microbiologiques, Tome 1 (méthodes horizontales) et tome 2 (méthodes sectorielles), 6ème éd. AFNOR, Paris 1996.
- Olsen B., Bergström S., McCafferty D.J., Sellin M. and Wiström J., 1996. *The Lancet*, 348(9037), 1319-1320.
- Wray C. and Davies R. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella* Enteritidis. WHO, Genève 1994.

FIGURE I : Schéma du mode opératoire de la procédure classique

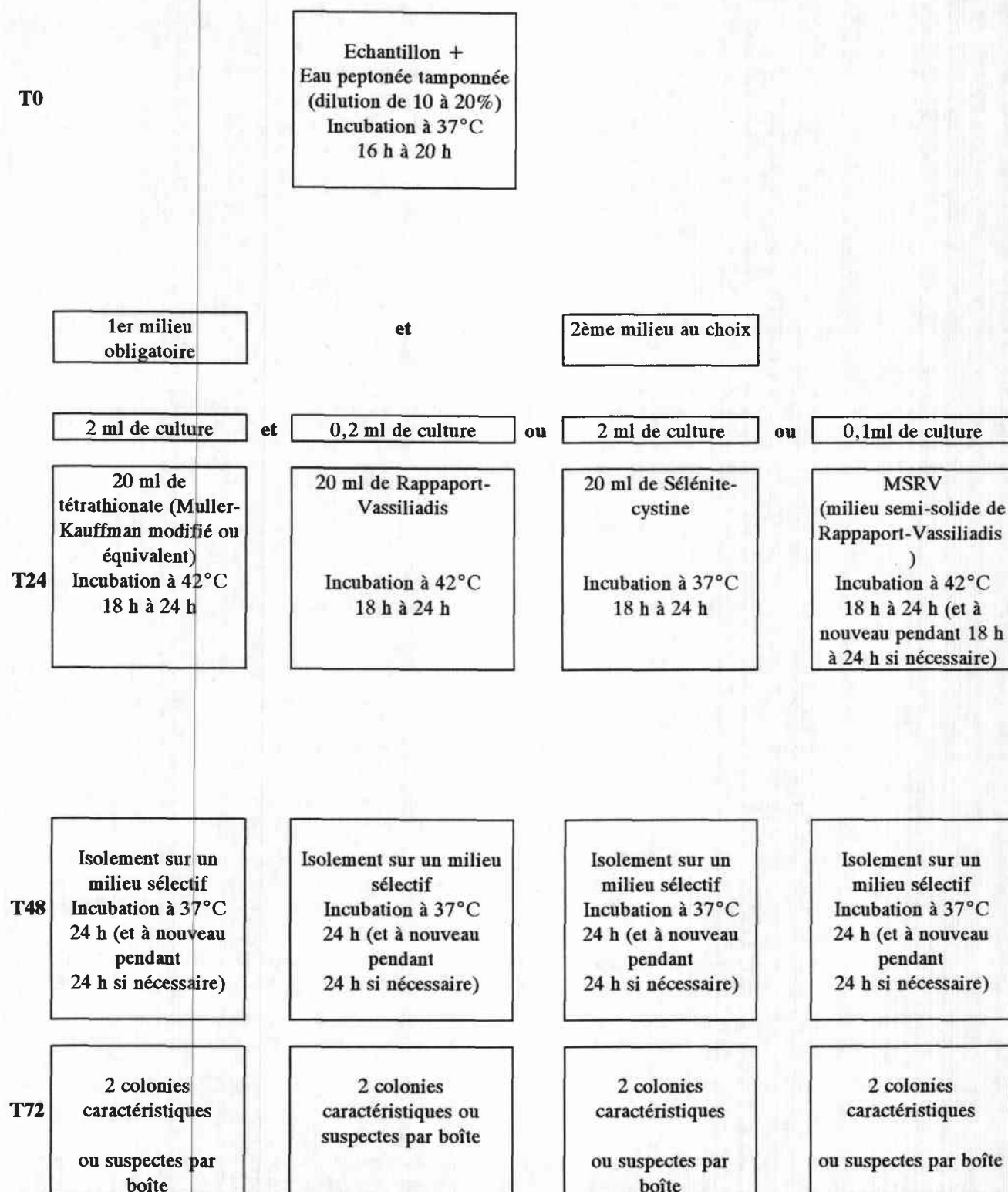


TABLEAU I : Techniques d'échantillonnage et d'isolement utilisées par différents pays pour contrôler leurs parquets de sélection et de multiplication

Pays	Etage	Date	Nombre et type d'échantillons	Détection
Angleterre	Croissance	1er jour	- 60 cadavres max. à l'arrivée et 1 fond de boîte/500 animaux (max.10)	bactériologique
		4è semaine	- 60 fientes/parquet	bactériologique
		2 semaines avant transf.	- 60 fientes/parquet	bactériologique
	Production			
	a - Grands parentales	toutes les semaines	- méconium de 250 poussins ou morts en coquille ou animaux chétifs (max.50)	bactériologique
Danemark	b - Parentales	toutes les 2 semaines	- id supra	bactériologique
	Croissance			
	a - Pedigree et grands parentales	1er jour	- 50 poussins par bâtiment incluant les morts à l'arrivée	bactériologique
		semaine 1 à 4 (2 fois par semaine)	- min. de 12 animaux chétifs ou morts par bâtiment, à chaque fois	bactériologique
		semaine 5	- 300 écouvillons de cloaque par bâtiment	bactériologique
	b - Parentales	semaine 17 à 19	- id sem. 5	bactériologique
		1er jour	- poussins morts à l'arrivée	bactériologique
		semaine 1 à 4	- animaux chétifs ou morts (avec un min. de 84 animaux)	bactériologique
		semaine 5	- 300 écouvillons de cloaque par bâtiment	bactériologique
		semaine 17 à 19	- id sem. 5	bactériologique
	Production			
	a - Pedigree et grands parentales	tous les 2 mois	- 300 écouvillons de cloaque par site	bactériologique
	b - Parentales	30 et 40 semaines	- 300 écouvillons de cloaque par site	bactériologique
Hollande	Croissance	1er jour	- 1 échantillon composé de 5 g de duvet, 20 g de coquilles et quelques poussins morts	bactériologique
		semaine 3, 12 et 16	- 60 prises de sang poolées par 10	ELISA (confirmation par bactériologie)
	Production			
	a - Parentales chair	semaine 20 et 26, puis toutes les 9 semaines	- 60 prises de sang poolées par 10	ELISA (confirmation par bactériologie)
	b - Autres parquets de sélection	semaine 20 et 26 puis toutes les 4 semaines	- 60 prises de sang poolées par 10	ELISA (confirmation par bactériologie)
Allemagne	Elevage	1er jour	- au minimum 5 animaux morts et 1 fond de boîte/1000 poussins	bactériologique
		7-10 jours	- au minimum 5 animaux morts	bactériologique
		4ème semaine	- 1 prélèvement de poussière et la mortalité de la semaine	bactériologique
		16ème semaine	- id supra	bactériologique
		2ème semaine avant transfert	- 60 fientes/bâtiment	bactériologique
	Production	fréquence ?	- au minimum 60 oeufs/parquet	bactériologique