

UTILISATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES POUR SUIVRE LA DIFFUSION DE SALMONELLES DANS DES ELEVAGES AVICOLES.

Millemann Y. *, Lesage-Descauses Marie-Claude, Chaslus-Dancla Elisabeth, Lafont J. P.

INRA. Station de Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 Nouzilly

*Adresse actuelle: LEGSA, DPA. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort

Résumé

Les salmonelles posent d'importants problèmes hygiéniques et sanitaires dans la filière avicole, avec deux sérotypes majeurs: *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis. Les études épidémiologiques des infections par des souches de ces deux sérotypes nécessitent l'utilisation de marqueurs efficaces. 56 souches de *Salmonella* Typhimurium et 14 souches de *Salmonella* Enteritidis ont été caractérisées par des méthodes phénotypiques (biotypie, antibiotypie, profils plasmidiques) et génotypiques (ribotypie, IStypie et RAPD). Au sein des souches de sérotype Typhimurium, neuf ribotypes et sept IS200types ont été détectés permettant la détermination de liens de parenté, ainsi que sept RAPDtypes. Les souches de sérotype Enteritidis n'ont été discriminées que sur la base de leurs profils d'antibiorésistance et contenus plasmidiques ainsi que par RAPD.

Introduction

Les bactéries du genre *Salmonella* sont le premier agent responsable de toxi-infections alimentaires humaines en France (Buisson, 1992), avec deux sérotypes prédominants: *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*. Les volailles et leurs produits sont souvent suspectés d'être la source d'infection lors de toxi-infection alimentaire lorsque l'un ou l'autre de ces sérovars est isolé. Il apparaît primordial dans ces conditions de disposer de marqueurs performants afin de suivre la diffusion de clones de ces deux sérotypes et de retrouver l'origine d'épidémies. De tels marqueurs sont également un outil utilisable dans la filière avicole pour des enquêtes épidémiologiques visant à découvrir les origines de la contamination de troupeaux.

L'analyse de caractères phénotypiques peut être réalisée ainsi que l'analyse du contenu plasmidique (Threlfall et Frost, 1990), et peut être complétée par l'étude de marqueurs chromosomiques afin de suivre une diffusion clonale. La ribotypie consiste à hybrider l'ADN chromosomique préalablement digéré par des enzymes de restriction avec la sonde universelle ARNr 16+23S correspondant à des séquences hautement conservées du génome (Grimont et Grimont, 1986). Les séquences d'insertion (IS) peuvent également être utilisées comme sondes. Correspondant à des séquences d'ADN variables en nombre de copies et en localisation sur le chromosome, certaines d'entre elles, telle l'IS200 spécifique des salmonelles, peuvent apporter des informations supplémentaires sur le degré de parenté génétique entre les souches.

Nous avons réalisé une étude épidémiologique sur 70 souches de *Salmonella* isolées dans des élevages avicoles: nous avons évalué leur degré de parenté par détermination de caractères phénotypiques, analyse du contenu plasmidique et étude de marqueurs chromosomiques, en particulier en comparant l'intérêt de la ribotypie et de la détection de l'IS200, ou IS200type.

Matériel et méthodes

Nous avons étudié 70 souches isolées en France entre 1991 et 1993 (Tableau 1) d'animaux élevés dans trois zones géographiques indépendantes. Toutes les souches ont été biotypées en réalisant 23 tests biochimiques avec des galeries API 20E. Leur résistance à 12 antibiotiques représentatifs des principales familles a été recherchée. Après extraction de l'ADN plasmidique, les échantillons ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0.8%. L'ADN plasmidique digéré par les enzymes *EcoRI* ou *HindIII* a également été soumis à électrophorèse. Quatre endonucléases ont été choisies après des essais préliminaires pour la ribotypie: *HindIII*, *BglII*, *PvuII*, *SmaI*. Pour l'IStypie, *BglII*, *PstI*, *PvuII*, *SmaI* ont été utilisées. Les fragments d'ADN génomique obtenus après digestion ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 0.8% et transférés sous vide sur des membranes de nylon. Cet ADN a été ensuite hybridé avec les sondes radioactives correspondant à l'ADN ribosomal (ribotypie) et à l'IS200 (IS200type). Les profils, ribotypes et IStypes, ont été visualisés par

autoradiographie, puis analysés par UPGMA et analyse de correspondance afin de déterminer le degré de similarité, et donc la parenté, entre les souches étudiées. ont été choisies Pour la technique de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), nous avons retenu cinq amorces oligonucléotidiques parmi quarante testées. Les réactions de PCR ont été conduites classiquement. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1, 5% et les profils obtenus ont été comparés.

TABLEAU 1: Origine et caractéristiques de souches aviaires de sérotypes Typhimurium et Enteritidis
La dénomination de chaque souche comprend l'année d'isolement (p. ex. 91 pour 1991), la bande (lettre) et l'ordre chronologique d'isolement. Nal: acide Nalidixique; Oxo: acide Oxolinique; Pef: Péfloxacin.

Souches <i>Salmonella</i> Typhimurium	Origine (lieu, espèce)	Ribotype	IS200type	RAPDtype
BN91A1, BN91A3-BN91A5, BN91B1-BN91B5	α . dinde	9	V	a
BN91A2	α . dinde	9	VI	a
BN92E1, BN92E2	β . canard	1	I	b
BN92E3	β . canard	1	IV	b
BN92D1, BN92D2, BN92K1-BN93K6, BN92F3	β . canard	2	I	b
BN91DE, BN92C8, BN92G1, BN92G2, BN92G4-BN93G11	β . canard	3	I	b
BN92G3	β . canard	3	I	c
BN92J2	β . canard	4	I	d
BN92J1, BN92J3	β . canard	4	IV	d
BN91C1, BN92F4, BN91H1	β . canard	6	II	b
BN91C5	β . canard	6	II	e
BN91C7	β . canard	6	II	f
BN92H2	β . canard	6	II	c
BN91C2, BN91C4,	β . canard	6	III	b
BN91C3	β . canard	6	III	g
BN92H3, BN92H4	β . canard	6	III	c
BN92F2	β . canard	7	II	b
BN92F1	β . canard	7	III	c
BN91C6, BN93L1	β . canard	8	II	d
BN92M1	γ . canard	2	VII	b
BN92N1	γ . canard	5	I	b
BN93P1	γ . canard	6	II	b

Souches <i>Salmonella</i> Enteritidis	Origine (lieu, espèce)	Antibio-résistance	Plasmides (kpb)	RAPDtype
BN92R1	α . pintade	-	54	A
BN92R2	α . pintade	-	54	B
BN92R3	α . pintade	-	54	C
BN92S1-BN92S3	α . canard	-	54	A
BN93T1, BN93T3, BN93T4	β . canard	Nal. Oxo	54; 50; 3.8	C
BN93T2	β . canard	Nal	54; 50; 3.8	C
BN93T5, BN93T6	β . canard	-	54	A
BN93U1	β . lapin	Nal. Oxo. Pef	54	A
BN93U2	β . lapin	-	54	A

Résultats et discussion

Parmi les 56 souches de sérotype Typhimurium, quatre biotypes ont été déterminés et huit souches étaient résistantes aux antibiotiques, dont le chloramphénicol et la tétracycline (Tableau 1). Huit profils plasmidiques différents ont été retrouvés chez ces souches, avec des plasmides de poids moléculaire compris entre 2 et 115 kilopaires de bases (kpb). Neuf ribotypes différents ont été mis en évidence au sein de ces 56 souches. Les ribotypes 1 à 7 étaient proches. Les ribotypes 8 et 9 étaient également proches mais clairement distincts des précédents. Sept profils de restriction de l'ADN pour l'IS200 ont été détectés, avec 6 à 9 copies de l'IS200. L'analyse hiérarchique par UPGMA des ribotypes et IStypes des souches de sérovar Typhimurium a conduit à la

construction d'un dendrogramme représentant les liens de clonalité entre souches, avec détermination de trois groupes homogènes (Figure 1). Sept RAPDtypes ont pu être définis chez ces mêmes souches.

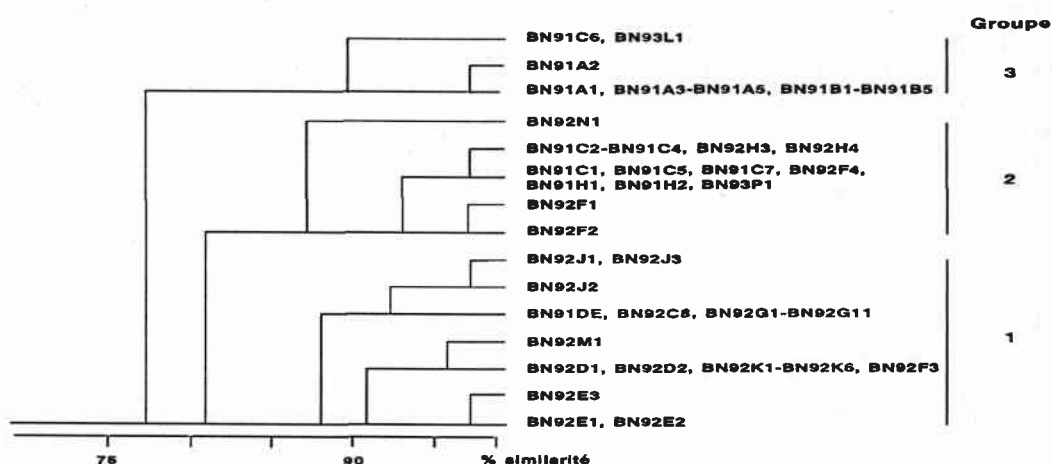
Biotypie, antibiotypie et analyse du contenu plasmidique peuvent être considérés comme un premier degré de discrimination pour les souches de sérotype Typhimurium. Toutefois ces caractères sont sujets à variation et sont peu discriminants au sein de ces souches. Dans ces conditions les marqueurs génomiques que sont ribotypes et IStypes permettent de déterminer les liens de clonalité entre les souches et autorisent une bonne discrimination. Les souches isolées des bâtiments du lieu α sont ainsi clairement regroupées. Les souches isolées en β sont classées dans deux groupes 1 et 2, à l'exception de deux d'entre elles, classées dans le groupe 3. Les souches isolées d'un même bâtiment sont regroupées, sauf pour deux bâtiments: C et F, témoignant vraisemblablement pour ces derniers d'un défaut de protection sanitaire. Enfin les souches du lieu γ se trouvent rassemblées avec des souches de β . La technique de RAPD n'apporte pas dans cette étude d'éléments supplémentaires de discrimination, mais vient confirmer les résultats obtenus.

Une seule des 14 souches de sérotype Enteritidis, BN93U1, a été séparée par biotypie, tandis que quatre souches étaient résistantes aux quinolones. Deux profils plasmidiques différents ont été retrouvés chez ces souches. Un seul ribotype ainsi qu'un seul et original IStype ont été détectés chez ces 14 souches de *S. Enteritidis*, tandis que trois RAPDtypes étaient définis au sein de ces mêmes souches (Tableau 1).

Biotypie, antibiotypie et analyse du contenu plasmidique sont une première étape de caractérisation des souches de *Salmonella* Enteritidis. Seules ces méthodes, ainsi que la RAPD, permettent de séparer les souches étudiées. En effet ribotypie et IS200type mettent en évidence la grande homogénéité génétique de ces souches: l'IS200type de ces souches est original et ne correspond à aucun autre profil déterminé chez des souches de ce sérotype (Millemann et al., 1995).

Ribotypie et IS200type apparaissent donc comme étant de bonnes méthodes pour examiner les liens de parenté entre souches de sérotype Typhimurium. Les souches de sérotype Enteritidis sont très homogènes, avec seulement des microévolutions, détectées par méthodes de caractérisation phénotypique et par RAPD.

FIGURE 1: Dendrogramme montrant les résultats de l'analyse par UPGMA des ribotypes et IS200types des souches de *Salmonella* Typhimurium.



Références

- Buisson Y., 1992. Med. Mal. Infect., 22(Spécial), 272-281.
 Grimont F., Grimont P. A. D., 1986. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 137B, 165-175
 Millemann Y., Lesage M.-C., Chaslus-Dancla E., Lafont J. P., 1995. J. Clin. Microbiol., sous presse.
 Threlfall E. J., Frost J. A., 1990. J. Appl. Bacteriol., 68, 5-16