



Année Universitaire : 2014-2015

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*Étude de la distribution des différents
sérovars de Salmonella des souches reçues
à l'INH entre l'année 2006 et 2014*

- Présenté par : ELABRIA Souad
- Encadré par : Dr. Najia AMEUR
Pr. Abdellatif HAGGOUR

Soutenu le : 23/06/2015 devant le jury composé de :

❖ Pr. Samir ANANOU	FST Fès	Examineur
❖ Pr. Kawtar FIKRI BENBRAHIM	FST Fès	Examinatrice
❖ Pr. Abdellatif HAGGOUR	FST Fès	Encadrant
❖ Dr. Najia AMEUR	INH Rabat	Encadrante



RÉSUMÉ

Les salmonelloses représentent une charge très importante pour la santé publique et un coût considérable pour la société de nombreux pays, elles sont responsables de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives mondiales.

L'émergence des nouveaux sérovars résistants est un problème qui va en s'aggravant et qui sont transmis aux humains principalement par voie alimentaire et limitent les possibilités de traiter efficacement les salmonelloses humaines. Le but de cette étude est de déterminer la distribution des sérovars de *Salmonella* annuelle, et de suivre la tendance des principaux sérovars circulants d'origine alimentaire, reçus au département de Microbiologie et hygiène alimentaire, INH Rabat entre l'année 2006 et 2014.

Les souches ont été serotypées par la méthode d'agglutination sur lame selon le schéma de Kauffmann-White.

Un total de 362 souches de *Salmonella* a été stocké à l'INH entre 2006 et 2014, certaines souches ont été isolées à partir des échantillons des aliments et au cours des études de recherche (dindes, volaille, viandes hachées), les autres ont été reçues en cas de TIAC.

Sur les souches de *Salmonella* isolées à partir des aliments au cours des analyses de routine, 52 sérovars différents ont été identifiés, parmi lesquels *S. enteritidis* (23,7%) était la plus fréquente, suivi par, *S. groupe II* (11,85 %), *S. kentucky* (5,18 %), *S. typhimurium* (2,96 %), les aliments incriminés dans ces sérovars sont généralement les volailles et leurs produits, les viandes rouges, les produits de mer contaminés par l'eau. Entre autre 15 souches ont été isolées à partir des échantillons des eaux analysées à l'INH avec une prévalence de *S.typhi* de (25,22%).

Les études qui ont été faites sur différentes catégories de viandes (volaille, viande rouge et produits halieutique) révèlent la présence de différents sérovars avec prédominance de *S.kentucky* (35,44%) pour la volaille, *S.bonariensis* (20%) pour les viandes rouges et charcuterie et *S.chester* (36,14%) pour les produits halieutiques.

Un total de 31 foyers de TIAC à salmonelle a été confirmé à l'INH entre 2006 et 2014. Entre tous les sérovars identifiés, *S.enteritidis* était la plus fréquente (55%) suivi de *S.typhi* (23%). Les aliments incriminés dans les TIAC à *S.enteritidis* sont principalement les œufs et des aliments préparés à base de ces produits, alors que *S.typhi* a comme origine les eaux non traitées.

Mots clés : salmonelle, aliments, TIAC

AVANT -PROPOS

Ce stage s'est déroulé au sein de l'Institut National d'Hygiène (INH) qui est un Etablissement sous la tutelle du Ministère de la Santé au Département de Microbiologie Eau et Aliment et qui se donne pour objectif de garantir une prise en charge efficace des problèmes d'hygiène et d'épidémiologie.

L'INH de Rabat se caractérise par son champ d'intervention très vaste et ses nombreux laboratoires, ce qui lui permet d'agir en tant que support technique des différents programmes du Ministère de la Santé (MS) tel que la tuberculose, le programme du paludisme, le programme du VIH (SIDA), le programme des infections sexuellement transmissibles (IST),le programme de la rougeole ou encore le programme santé-environnement, etc.

En outre, l'INH assure également le rôle d'expertise technique en matière d'hygiène alimentaire, de toxicologie de l'environnement et de domaine médico-légal. Parallèlement à ses activités techniques, l'institut veille à la formation professionnelle des étudiants, que ce soit des médecins, des pharmaciens biologistes ou des scientifiques pour leur recherches, ainsi qu'à celle des techniciens de laboratoire ou des infirmiers.

L'institut a pour mission aussi d'élaborer des normes en matière de biologie sanitaire et de développer et standardiser les techniques de référence à implanter dans les laboratoires du MS à l'échelle régionale ou provinciale. : **Renforcement et consolidation du système d'évaluation scientifique des risques alimentaires :**

- Dans sa mission de surveillance, établis selon l'approche d'évaluation des risques sanitaires liés aux denrées alimentaires et eaux
- MHA contribue à l'investigation d'épidémies par la Caractérisation de la souche épidémique, la recherche de la source de contamination et la participation aux réseaux de surveillance internationaux.
- Dans sa mission d'alerte signale tout phénomène inhabituel : contamination d'eau de réseau, apparition de cas groupés, catégories d'aliments contaminés, de nouvelles souches circulantes, nouveaux modes de contamination, nouveaux sérovars circulants et résistants.

DÉDICACE

A l'aide de DIEU tout puissant, qui nous a tracé le chemin de notre vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie ma mère Fatima qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'a donné confiance, courage et sécurité.

A mon cher père Lahcen qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.

A mes très chères frères (Hamza, Mohamed, Zakaria et Chouaib) et sœurs (Khadija, Meryam, et Samira).

A mon fiancé Ali.

A ma famille.

A mes amis et amies (Fatima Ezzahra, Ihsane, Aziza, Rachida, Khadija, keltoum, Khaoula et Naima...) pour les beaux moments qu'on a passé ensemble.

A tous ceux qui nous sont chers et ceux qui œuvrent pour le bien être de l'humanité.

REMERCIEMENT

Je remercie DIEU tout puissant, maitre des cieux et de terre, qui nous a permis de mener à bien ce travail.

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à mon encadrant : **Mme AMEUR Najia**, ingénieur en chef à l'Institut National d'Hygiène (INH) qui par sa compétence, expérience et sa modestie et renseignements fructueux m'étaient une source prodigieuse d'enrichissement pour ce travail.*

*Un remerciement particulier va à mon encadrant: **Mr. HAGGOUR Abdellatif**, Professeur à la FST de Fès, pour son aide qu'il n'hésitait jamais à me proposer dans les moments difficiles. Je le remercie pour sa bienveillance et ses conseils.*

*J'exprime également ma profonde gratitude aux membres de jury : **Mr. HAGGOUR Abdellatif** professeur à la FST de Fès, **Mme AMEUR Najia** ingénieur en chef à l'INH de Rabat, **Mme. FIKRI BENBRAHIM Kawtar** professeur à la FST de Fès et **Mr. ANANOU Samir** professeur à la FST de Fès, qui ont accepté de sacrifier une partie de leurs temps pour juger ce travail et l'enrichir par leurs critiques et conseils.*

Enfin je remercie gracieusement tout le personnel de l'INH qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

Les salmonelloses représentent une charge très importante pour la santé publique et un coût considérable pour la société de nombreux pays, elles sont responsables de nombreuses toxi-infections alimentaires collectives mondiales.

L'émergence des nouveaux sérovars résistants est un problème qui va en s'aggravant et qui sont transmis aux humains principalement par voie alimentaire et limitent les possibilités de traiter efficacement les salmonelloses humaines. Le but de cette étude est de déterminer la distribution des sérovars de *Salmonella* annuelle, et de suivre la tendance des principaux sérovars circulants d'origine alimentaire, reçus au département de Microbiologie et hygiène alimentaire, INH Rabat entre l'année 2006 et 2014.

Les souches ont été serotypées par la méthode d'agglutination sur lame selon le schéma de Kauffmann-White.

Un total de 362 souches de *Salmonella* a été stocké à l'INH entre 2006 et 2014, certaines souches ont été isolées à partir des échantillons des aliments et au cours des études de recherche (dindes, volaille, viandes hachées), les autres ont été reçues en cas de TIAC.

Sur les souches de *Salmonella* isolées à partir des aliments au cours des analyses de routine, 52 sérovars différents ont été identifiés, parmi lesquels *S. enteritidis* (23,7%) était la plus fréquente, suivi par, *S. groupe II* (11,85 %), *S. kentucky* (5,18 %), *S. typhimurium* (2,96 %), les aliments incriminés dans ces sérovars sont généralement les volailles et leurs produits, les viandes rouges, les produits de mer contaminés par l'eau. Entre autre 15 souches ont été isolées à partir des échantillons des eaux analysées à l'INH avec une prévalence de *S.typhi* de (25,22%).

Les études qui ont été faites sur différentes catégories de viandes (volaille, viande rouge et produits halieutique) révèlent la présence de différents sérovars avec prédominance de *S.kentucky* (35,44%) pour la volaille, *S.bonariensis* (20%) pour les viandes rouges et charcuterie et *S.chester* (36,14%) pour les produits halieutiques.

Un total de 31 foyers de TIAC à salmonelle a été confirmé à l'INH entre 2006 et 2014. Entre tous les sérovars identifiés, *S.enteritidis* était la plus fréquente (55%) suivi de *S.typhi* (23%). Les aliments incriminés dans les TIAC à *S.enteritidis* sont principalement les œufs et des aliments préparés à base de ces produits, alors que *S.typhi* a comme origine les eaux non traitées.

Mots clés : salmonelle, aliments, TIAC

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **STI** : Tri Sugar Iron
- **ONPG**: Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.
- **TIAC** : Toxi-infection alimentaire collective
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **API 20E**: Analytical Profile Index 20 enterobacteria
- **EFSA** : Autorité européenne de sécurité des aliments
- **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- **MLST** : Multilocus sequence typing
- **PCR** : Polymérisation chaîne réaction
- **CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- **PFGE** : Pulsed-Field Gel Electrophoresis
- **MLVA** : Multi Locus VNTR Analysis
- **ONSSA** : Office National de Sécurité Sanitaire des produits
- **CNR-ESS** : Centre national de référence de *E.coli*, *Shigella* et *Salmonella*

- **CDC**: Centers for Disease Control and Prevention
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **INH**: Institut National d'Hygiène
- **MHA**: microbiologie et hygiène des aliments
- **EQAS** : External quality assurance system
- **BHI** : Brain Heart Infusion
- **Na Cl** : Chlorure de Sodium
- **SG** : Sven Gard
- **BEH** : Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire.
- **ISO** : Organisation internationale de normalisation.
- **NM** : Norme Marocaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de l'expression séquentielle des gènes lors des différentes étapes de la pathogénie après infection orale par <i>Salmonella</i> (Chen et al, 1995)..	16
Figure 2: Schéma résumant la procédure pour l'isolement de <i>Salmonella</i> (ISO 6579: 2002).	18
Figure 3: Répartition du nombre de foyers de TIAC à <i>Salmonella</i> , selon le type d'aliment incriminé (2003 et 2004), d'après les données de l'Institut de Veille Sanitaire.	24
Figure 4: Présence de la diffusion de la souche.....	24
Figure 5 : Absence de la diffusion de la souche.....	34
Figure 6: Tests séquentiels de sérums polyvalents et monovalents pour la recherche des antigènes somatiques et flagellaires des <i>Salmonella</i>	35
Figure 7: Distribution annuelle des souches de salmonelles reçus à l'INH entre 2006 et 2014	38
Figure 8: Distribution des souches selon leur origine géographique.	39
Figure 9: Prévalence des sérovars isolés à partir des eaux analysées	44
Figure 10: Distribution des sérovars isolés à partir des produits de pêche au cours des études faites à l'INH entre 2006 et 2014.	45
Figure 11: Distribution des sérovars isolés au cours des études sur les volailles.	47
Figure 12: Distribution des sérovars de salmonelle isolés au cours des études sur les viandes rouges et charcuterie.....	49
Figure 13: Répartition des sérovars responsables des TIAC enregistrées à l'INH entre 2006 et 2014.	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nombre des sérovars de chaque espèce de <i>Salmonella</i> au cours des années (Grimont et Weill, 2007).	5
Tableau 2: Caractéristiques biochimiques des espèces et sous espèces de <i>Salmonella</i> (Le Minor et al, 1982 ; Le Minor et al, 1986).	7
Tableau 3: Sérotypage de <i>Salmonella</i> (ancienne désignation) et antigène « O » correspond (nouvelle désignation) (Grimont et al, 2007).	9
Tableau 4: Extrait de schéma de kauffman-white indiquant la formule antigénique de quelques sérotypes (Grimont et al, 2007).	19
Tableau 5: Principales causes des TIAC (Bolnot,2006 ; Corpet ,2005).....	23
Tableau 6: Prévalence des salmonelles dans les aliments analysés au cours de contrôle de routine à l'INH entre 2006 et 2014.	40
Tableau 7: distribution des principaux sérovars isolés au cours des analyses de routine des aliments à l'INH entre 2006 et 2014.	41
Tableau 8: Origine de principaux sérovar isolés à partir des aliments analysés à l'INH entre 2006 et 2014.	42
Tableau 9: Répartition des TIAC confirmées <i>Salmonella</i> à l'INH entre l'année 2006 et 2014.	50
Tableau 10: Catégories des aliments incriminés dans les TIAC causées par <i>S.enteritidis</i> et <i>S.typhi</i>	52

SOMMAIRE

Introduction	1
OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	2
Partie I : Bibliographie	4
I. Historique :	4
II. Taxonomie et nomenclature :	4
1. Habitat :	5
2. Caractères cultureux :	6
3. Caractères biochimiques :	6
4. Marqueurs épidémiologiques :	7
a. Biotype :	8
b. Sérotype :	8
c. Lysotypie :	10
d. Bactériocinotypie :	10
e. Antibiotypie :	11
III. Physiopathologie:	11
1. Pathogénie des <i>Salmonella</i> :	11
2. Voies de transmission :	11
3. Manifestations extra-digestives :	12
4. Facteurs de virulence :	12
a. Pili ou fimbriae :	12
b. Invasion et colonisation de l'organisme :	13
c. Survie dans les phagocytes :	13
d. Complexe lipopolysaccharidique :	13
e. Synthèse de toxines :	14
f. Systèmes de captation du fer :	14
2. Principales étapes des infections à <i>Salmonella</i> :	14
IV. Isolement et identification des salmonelles :	17
1. Echantillonnage :	17
2. Technique d'isolement :	17
3. Identification biochimique :	18
4. Identification sérologique (schéma de Kauffman-White) :	19
I. Salmonelloses :	19
1. Portage asymptomatique :	20
2. Gastro-entérites :	20

3.	Infections systémiques ou fièvre typhoïde :	21
II.	Toxi-infection alimentaire collective :	21
1.	Définition :	21
2.	Agents responsables :	22
3.	Aliments identifiés ou suspectés :	24
I.	Méthodes phénotypiques:.....	24
1.	Le sérotypage classique par agglutination :	24
2.	Le sérotypage moléculaire d'une souche de <i>Salmonella</i> :.....	25
a.	L'analyse MLST (Multilocus sequence typing) :.....	25
b.	Le séquençage après PCR des gènes de flagellines <i>fliC</i> et <i>fljB</i> :.....	25
c.	L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage :.....	25
I.	Méthodes génotypiques:.....	26
1.	L'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) :	26
2.	L'analyse MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats Analysis) :	26
3.	La méthode CRISPOL :	26
4.	Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles :	26
a.	L'antibiogramme	26
b.	L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques	26
	PARTIE II : MATERIEL ET METHODES :	28
I.	Généralités :	28
II.	Matériel :	28
III.	Contrôle des sérums utilisés dans le sérotypage à l'aide des souches EQAS :	29
IV.	Culture des souches étudiées sur milieu approprié :.....	29
V.	Sérotypage des souches :.....	30
1.	Principe :.....	30
2.	Appareillage :	30
3.	Milieux de culture :	30
4.	Liste des sérums utilisés dans le sérotypage:.....	30
5.	Technique :	30
6.	Recherche de souche auto-agglutinante :	31
7.	Recherche de l'antigène d'enveloppe avec l'antisérum Vi :	32
8.	Détermination du groupe par identification des facteurs antigéniques somatiques "O" :	32
9.	Détermination du sérotype par identification des facteurs antigéniques flagellaires "H" :	33
10.	Vérification de la présence de la deuxième phase par la méthode d'inversion de phase :	33
11.	Lecture et expression des résultats :	35

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION :	38
CONCLUSION	54
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	55
REFERENCES bibliographiques	56
ANNEXES :	66

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, *Salmonella* constitue la cause majeure des infections du tractus digestif humain, liées à la consommation de denrées alimentaires d'origine animales. Il s'agit d'un agent étiologique de la salmonellose -humaine d'origine alimentaire. Dans la plupart des cas, la salmonellose est causée par des produits alimentaires contaminés, en particulier ceux d'origine animale tels que la volaille, les œufs, le bœuf et le porc. Les fruits et les légumes ont également été signalés comme des véhicules de transmission de *Salmonella*, et la contamination peut se produire à plusieurs étapes de la chaîne alimentaire (Gomez et al, 1997). Dans les pays développés *Salmonella* est reconnu comme l'agent pathogène important d'origine alimentaire qui est responsable de l'intoxication alimentaire collective avec environ 65% des cas en France (Haeghebaert et al, 2003) et 95% aux États-Unis d'Amérique (Mead et al, 1999). Bien que la déclaration et l'enregistrement des 12% des cas de *Salmonella* demeurent insuffisants, *Salmonella* est la principale cause d'intoxication alimentaire au Maroc (Rouahi et al, 1998).

Au Maroc, 7118 cas de toxi-infections alimentaires ont été rapportés entre 2000 et 2004 dont plus de 86 % sont d'origine bactérienne (Cohen et al, 2006), et 1160 cas d'intoxication alimentaire ont été enregistrés en 2008 (Selon le centre antipoison et pharmacovigilance, Maroc).

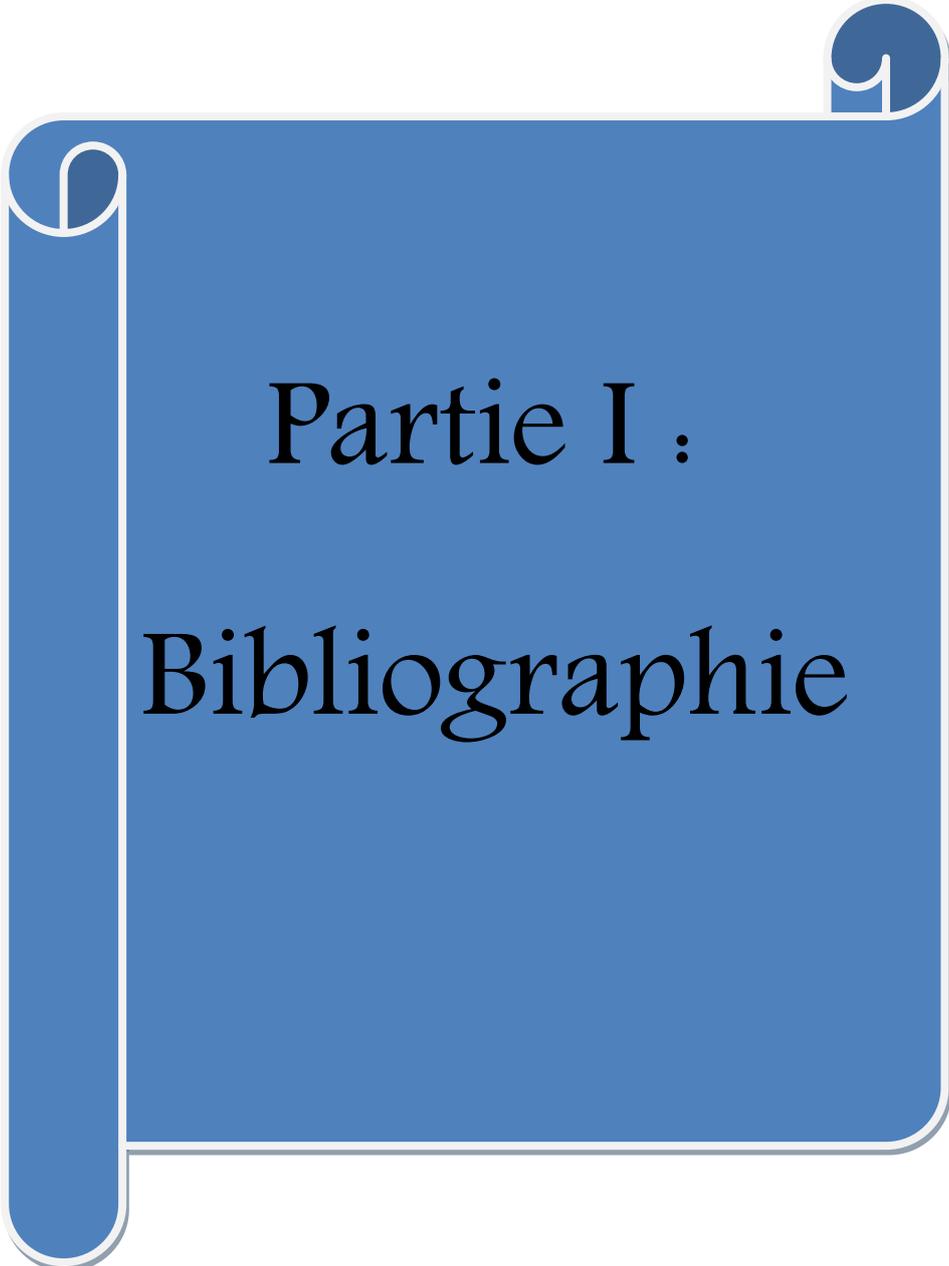
Certains sérotypes sont les agents de maladies graves comme la fièvre typhoïde et paratyphoïde (Levantesi et al., 2012). La plupart des sérotypes de *Salmonella* sont considérées comme pathogènes humains potentiels (OMS, 2005), et *Salmonella* est reconnu mondialement comme un principal pathogène d'origine alimentaire humaine (CDC, 2008). Les infections à *Salmonella*, restent un problème de santé publique dans le développement des pays. Parmi ces infections, les infections gastro-intestinales et les infections extradiigestives sont notés. Le sérovar *Salmonella Typhi* est responsable de gastro-entérite, et peut aussi causer des septicémies (Benacer et al, 2010). Autres sérotypes peuvent être responsables des infections extra-intestinaux telles que les infections des voies urinaires, la suppuration profonde et la méningite chez les individus immuno-déficients (WHO, 1996).

L'objectif du présent travail est l'étude de la distribution des différents serovars de salmonella reçus à l'INH entre L'année 2006 à 2014 afin d'identifier les 15 sérovats les plus répandus et le pourcentage des catégories d'aliments incriminés afin d'aider à lister les facteurs des risques des salmonelloses.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Ce travail a comme objectifs :

- L'étude de la distribution des différents sérovars de *Salmonella* reçus à l'INH entre l'année 2006 et 2014 afin d'identifier les 15 sérovars les plus répandus.
- Détermination de pourcentage des catégories d'aliments incriminés afin d'aider à lister les facteurs des risques des salmonelloses.



Partie I :
Bibliographie

Partie I : Bibliographie

A. SALMONELLES ET LEUR ÉPIDEMIOLOGIE :

I. Historique :

En 1885, un vétérinaire américain nommé Daniel Salmon Elmer et son collègue, bactériologiste Theobald Smith ont découvert ce qu'ils croyaient être l'agent causal de la peste porcine classique (salmon & Smith, 1886). Le micro-organisme qu'ils ont décrit a finalement été identifié comme la cause des infections secondaires qui sont souvent associées à la maladie, qui a finalement été montré pour être d'origine virale. La désignation *Salmonella* générique a été inventée en 1900 comme un hommage au vétérinaire, et le bacille nouvellement décrit a été nommé *Salmonella choleraesuis*.

II. Taxonomie et nomenclature :

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Cette famille regroupe des genres de bactéries qui sont des hôtes habituels du tube digestif. Ce genre contient deux espèces (Jay et al. 2003):

- *S. enterica*
- *S. bongori*

L'espèce *S. enterica* se subdivise en 6 sous espèces:

- 1) *S. enterica* sous espèce *enterica* ou sous espèce I
- 2) *S. enterica* sous espèce *salamae* ou sous espèce II
- 3) *S. enterica* sous espèce *arizonae* ou sous espèce IIIa
- 4) *S. enterica* sous espèce *diarizonae* ou sous espèce IIIb
- 5) *S. enterica* sous espèce *houtenae* ou sous espèce IV
- 6) *S. enterica* sous espèce *indica* ou sous espèce VI

Le nombre de sérovars de chaque espèce a été officiellement caractérisé par leurs antigènes somatiques (antigène O) et, généralement, par leurs antigènes flagellaires (antigènes H).

Dans le 47ème supplément du schéma de kauffmann-white le minor (Guibourdenche et al, 2010), plus de 2600 sérovars de *Salmonella* sont mentionnés et ce nombre augmente régulièrement, tel que résumé dans le tableau 1.

Tableau 1: Nombre des sérovars de chaque espèce de *Salmonella* au cours des années (Grimont et Weill, 2007).

Espèce	Sous-espèce	supplément		
		1998 ^a	2001 ^b	2007 ^c
		Nombre des sérovars		
<i>S.enterica</i>	<i>enterica</i>	1454	1492	1547
	<i>salamae</i>	489	500	513
	<i>arizonae</i>	94	95	100
	<i>diarizonae</i>	324	331	341
	<i>housteane</i>	70	71	73
	<i>indica</i>	12	13	13
<i>S.bongri</i>		20	21	23
Total		2463	2523	2610

a (Popoff et al, 2000)

b (Popoff et al, 2003)

c (Guibourdenche et al, 2010)

1. Habitat :

Les salmonelles peuvent être isolées de l'intestin de nombreuses espèces animales. Il s'agit d'agents zoonotiques. Les animaux constituent un réservoir et la dissémination dans l'environnement provient essentiellement de contaminations fécales (Hanes, 2003). L'habitat habituel de différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* est les intestins des animaux à

sang chaud et froid (Brenner et al, 2000). Ces bactéries peuvent également être trouvées dans l'environnement naturel. Même si *Salmonella* ne peut pas se multiplier en dehors du tube digestif de l'hôte, les bactéries peuvent vivre de nombreuses semaines dans l'eau et quelques années dans le sol si les conditions sont favorables tels que la température, le pH et l'humidité (Todar, 2008).

2. Caractères cultureux :

Les Salmonelles sont des germes mésophiles aéro-anaérobies et hygrophiles qui se présentent sous forme de bâtonnets de deux à trois microns de long et de 0,6 à 0,8 microns de large. La plupart d'entre elles ne sporulent pas et ne possèdent pas de capsule (Bertrand, 2003).

La température de la croissance varie de 8 ° C à 45 ° C, les souches peuvent se développer à des valeurs de pH entre 4 à 9, et à des activités de l'eau au-dessus de 0,94. *Salmonella* est thermolabile de sorte que ce microorganisme peut être détruit à la température ordinaire de cuisson (> 70 ° C) bien que le temps de refroidissement, les valeurs température et le temps peut varier en fonction du sérotype et de la matrice alimentaire. En outre *Salmonella* montre une tolérance à des concentrations en sel jusqu'à 20% (Bell et al, 2002). La plupart des Salmonelles sont capables de croître sur milieu minimum, sans facteur de croissance. Quand elles sont adaptées à un hôte pour lequel elles ont un pouvoir pathogène manifeste, elles peuvent exiger un ou plusieurs facteurs de croissance pour croître (Bertrand, 2003).

3. Caractères biochimiques :

Les Salmonelles possèdent les caractères généraux de la famille des Entérobacteriacees : bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche, ou immobiles, non sporulés, et sont anaérobies facultatives. *Salmonella* fermentent principalement du glucose avec la formation de gaz et réduisent également le nitrate en nitrite (Bertrand, 2003).

Les Salmonelles croissent de façon optimale entre 35 ° C à 37 ° C et catabolisent une variété d'hydrates de carbone en acide et en gaz. Ils utilisent le citrate comme seule source de carbone, et décarboxylent la lysine et l'ornithine à la cadavérine et la putrescine respectivement. Ils sont des microorganismes chimioorganotrophes car ils obtiennent leur énergie à partir des réactions d'oxydation et de réduction à partir de sources organiques. La plupart des espèces de *Salmonella* produisent H₂S, qui peut être facilement détecté par leur culture sur un milieu contenant du sulfate ferreux comme le fer de trois sucres (STI) où *Salmonella* est capable de produire du H₂S thiosulfate. La production de H₂S sur le milieu STI est l'une des caractéristiques biochimiques communes qui sont largement utilisés dans

l'identification des bactéries (Renatus, 2014). Des biotypes atypiques tels que *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis qui ne peuvent décarboxyler la lysine (Morita et al., 2006), et *Salmonella enterica* sérovar Typhi qui utilise facilement le lactose (Kohbata et al, 1983) et *Salmonella enterica* sérovar Mbandaka qui a la capacité à fermenter le saccharose (Reid et al, 1993) ont été isolés.

Tableau 2: Caractéristiques biochimiques des espèces et sous espèces de *Salmonella* (Le Minor et al, 1982 ; Le Minor et al, 1986).

Propriétés et caractères biochimiques	<i>Salmonella enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	Habitat	Hommes et animaux à sang chaud		Animaux à sang froid et environnement			
Sous-espèce	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>dianizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indiana</i>	
Nombre de sérovars (2005)	1504	502	95	333	72	13	22
<u>Caractères biochimiques :</u>							
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Gélatinase à 36°C	-	+	+	+	+	+	-
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
γ-glutamyl transférase	d	+	-	+	+	+	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
L(+)-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	+

4. Marqueurs épidémiologiques :

La grande diversité du genre *Salmonella*, tant au niveau de son habitat naturel qu'au niveau de l'expression de son action sur l'hôte rend insuffisante l'identification de l'espèce seule pour comprendre la pathogénie de cette bactérie. Le réseau de surveillance des Salmonelles

procède à la subdivision des espèces en entités infrasubspécifiques, ou types, correspondant à des aptitudes pathogéniques associées.

a. Biotype :

La détermination du biotype est basée sur les réactions biochimiques caractéristiques du genre *Salmonella*. Celle-ci est utilisée dans certaines études épidémiologiques mais la discrimination apportée par la biotypie n'est généralement pas très importante (Millemann, 1998).

b. Sérotype :

L'identification des sérotypes selon le schéma de Kaufmann-White est fondée sur la formule antigénique. Comme toutes les entérobactéries, les salmonelles possèdent potentiellement trois types d'antigènes ayant un intérêt diagnostique. On distingue des antigènes somatiques (O), des antigènes flagellaires (H) et des antigènes de surface. Dans ce schéma, les antigènes O sont chiffrés de 1 à 67 et les antigènes H sont représentés par une lettre pour la phase 1 et un nombre ou une lettre pour la phase 2. Par exemple, la formule antigénique du *Salmonella paratyphi C* est :6,7,(Vi) :c :1,5 ; avec : les antigènes « O » O :6 et O :7 ; l'antigène « Vi », qui peut être présent ou absent (indiqué par les crochets) ; l'antigène « H » H :c pour la première phase ; les antigènes « H » H :1 et H :5 pour la seconde phase.

❖ Les antigènes O : antigènes de paroi ou antigènes somatiques.

Cet antigène provient de la paroi cellulaire et les principaux composants sont des polysaccharides, des protéines et des phospholipides. L'antigène « O » est très robuste et peut résister à des températures pouvant atteindre 100°C pendant 150 min, à un traitement avec de l'éthanol à 95 % (fraction volumique) ou avec de l'acide dilué (Poppof et al, 2001). La réaction de l'antigène « O » avec les immuns-sérums crée une agglutination granulaire. D'un point de vue historique, les antigènes « O » ont été classés dans des groupes d'antigènes « O » individuels dans le schéma de Kauffman-White le Minor (Grimont et al, 2007).

Les groupes étaient nommés avec l'alphabet latin, en commençant par le groupe A qui comprend l'antigène O : 2, jusqu'au groupe Z qui comprend l'antigène O : 50. Comme il y'avait plus d'antigènes « O » que de lettres, les antigènes restants n'étaient pas classifiés sous forme de groupe, mais étaient dénommés antigènes « O » O : 51 à O : 67. Aujourd'hui, il

est préférable de désigner chaque groupe « O » selon le facteur « O » caractéristique. Les lettres ont été conservées et sont indiquées entre parenthèse, par exemple, O : 4 (B) (Grimont et al, 2007).

Le tableau 3 résume les nomenclatures anciennes et nouvelles des sérotypes :

Tableau 3: Sérotypage de *Salmonella* (ancienne désignation) et antigène « O » correspondants (nouvelle désignation) (Grimont et al, 2007).

Groupe	Antigène « O »	Groupe	Antigène « O »	Groupe	Antigène « O »
A	2	G ₁ -G ₂	13	Q	39
B	4	H	6,14	R	40
C ₁ (,C ₄) ^a	6,7	I	16	S	41
C ₂ ,C ₃	8	J	17	T	42
D ₁	9	K	18	U	43
D ₂	9,46	L	21	V	44
D ₃	9,46,27	M	28	W	45
E ₁ (,E ₂ ,E ₃) ^b	3,10	N	30	X	47
E ₄	1,3,19	O	35	Y	48
F	11	P	38	Z	50

a : C₄ est désormais inclus dans C₁.

b : E₂, E₃ sont désormais inclus dans E₁.

❖ Les antigènes flagellaires ou antigènes H.

Cet antigène se situe sur le flagelle et se compose principalement de protéines. Il est moins robuste que les antigènes « O ». Il peut facilement être décomposé par de l'alcool, de l'acide et à une température supérieure à 60°C, mais il résiste à une solution de formol de fraction volumique de 0,5 % (Poppof et al, 2001).

La réaction de l'antigène « H » avec les immuns-sérums crée une agglutination floconneuse. De nombreuses espèces de *Salmonella* possèdent deux phases d'antigène « H », mais des variantes monophasiques et triphasiques sont également connues. La première phase est indiquée par une lettre minuscule, allant de a à z. toutefois, depuis l'identification de

l'antigène z, de nombreux nouveaux antigènes « H » ont été identifiés et nommés z₁, z₂, z₃...z₉₁.

Voici quelques exemples de sérovars monophasiques :

- *Salmonella paratyphi A* : 1, 2,12 : a(1,5) ; avec H : a pour la première phase et ou les crochets indiquent que la seconde phase (H : 1,5) peut être présente ou absente ;
- *Salmonella typhi* : 9,12, (Vi) : d :- ; avec H : d pour la première phase ;
- *Salmonella derby* : 1,4, (5)12: f,g(1,2) ;avec H :f,g pour la première phase et ou la seconde phase (H :1,2) peut être présente ou absente;
- *Salmonella enteritidis* : 1, 9,12 : g,m :- ; avec H :g,m pour la première phase. Outre les facteurs H :g,m, certaines souches peuvent avoir le facteur H :p, H :f ou H :t. des souches exceptionnelles peuvent avoir l'antigène H :1,7 comme seconde phase ;
- *Salmonella dublin* : 1, 9,12, (Vi) : g,p :- ; avec H :g,p pour la première phase.

❖ Antigènes de capsule.

Cet antigène est un antigène (capsulaire) de surface et peut masquer les antigènes « O » de façon à ce que les bactéries ne s'agglutinent pas avec les sérums anti-« O ». L'antigène « Vi » se compose essentiellement de polysaccharides. Les souches de salmonella qui possèdent un antigène « Vi » sont plus virulentes que les souches qui ne l'ont pas. L'antigène « Vi » peut être présent dans seulement trois sérovars de salmonella :

- *Salmonella typhi* : 9,12, (Vi) : d :- ;
- *Salmonella paratyphi C* : 6,7, (Vi) :g,p :- ;
- *Salmonella dublin* : 1, 9,12, (Vi) :g,p:-.

c. Lysotypie :

La lysotypie étudie la sensibilité des souches ou leur résistance, à une série de bactériophages sélectionnés qui ne se multiplient qu'en utilisant le matériel génétique des bactéries infectés et causent ainsi la lyse de ces dernières. La plupart des bactériophages sont sauvages, isolés d'eaux d'égouts, mais ils peuvent aussi provenir de bactéries lysogéniques (Anderson et al, 1977).

d. Bactériocinotypie :

La bactériocinotypie repose sur la recherche de la production de bactériocines ou de la sensibilité aux bactériocines. Cette technique est peu discriminante.

e. Antibiotypie :

La sensibilité ou la résistance des salmonelles aux antibiotiques permet de parler d'antibiotypes. Généralement les Salmonelles sont sensibles au Chloramphénicol et à beaucoup d'antibiotiques à large spectre, comme l'ampicilline (Betrand, 2003).

Chez les salmonelles, la résistance est en général codée par des gènes plasmidiques. Connaissant l'utilisation abusive des antibiotiques en médecine vétérinaire et surtout l'instabilité des plasmides et des transposons, les antibiogrammes ne peuvent pas être considérés comme une méthode fiable de typage. Néanmoins, si c'est une résistance à un nouvel antibiotique ou un nouveau mécanisme de résistance à un antibiotique déjà largement utilisé, elle peut être utile et satisfaisante du point de vue épidémiologique (Millemann, 1998).

III. Physiopathologie:

1. Pathogénie des *Salmonella* :

Salmonella est un genre de bactéries zoonotiques qui est capable de provoquer une maladie chez une large gamme d'espèces. Chez l'homme, l'infection est le résultat de l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminés. Il ya trois types d'infection associés à *Salmonella*: gastro-entérite, maladie systémique et un état de porteur.

Les caractéristiques essentielles de la pathogénie de ces bactéries sont la capacité des salmonelles à entrer dans la cellule-hôte et à y demeurer comme parasite intracellulaire facultatif. Les salmonelloses représentent un modèle d'infection entéro-invasive. Nous nous attarderons donc sur la pathogénie des entérites salmonelliques. Grâce à la biologie cellulaire et la génétique moléculaire, des progrès significatifs ont été récemment accomplis dans la compréhension des mécanismes d'invasion de l'épithélium intestinal et de survie et multiplication au sein des macrophages. Cependant, de nombreuses incertitudes demeurent et le mécanisme exact responsable de la diarrhée au cours des salmonelloses demeure inconnu (Amélie, 2006).

2. Voies de transmission :

La contamination de l'homme se fait par voie orale. La fréquence des infections à *Salmonella* est en augmentation. Elle est favorisée par le développement des repas pris en collectivité ou les aliments qui sont préparés bien avant d'être consommés et souvent sans aucun respect de la chaîne de froid.

S. enteritidis peut contaminer le contenu des œufs au cours de leur formation dans l'oviducte et plus souvent la surface de la coquille lors de la ponte. Elle a diffusé dans le monde entier au cours des années 1980 à la faveur d'une intensification de l'élevage industriel et du commerce international des volailles (Rodrigue et al, 1990).

Les viandes de volailles, charcuteries, coquillages et produits à base d'œufs non cuits (Glaces, mayonnaise) sont la source de contamination par les salmonelles (Baird-Parker et al, 1990; Haeghebaert et al, 2002) car elles colonisent le tube digestif des animaux d'une manière asymptomatique (Blaser et al, 1996) et sont donc responsables de la majorité des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). C'est pour cela qu'elles sont considérées comme un exemple classique de zoonoses (Groisman et al, 2000).

3. Manifestations extra-digestives :

Elles surviennent chez des personnes atteintes de maladies intercurrentes ou immunodépressives. Les salmonelles pourront alors provoquer des septicémies, des infections ostéo-articulaires, des endocardites, des atteintes artérielles sur anévrisme, des cholécystites, etc.... (Gledel, 1996).

La dissémination sanguine des salmonelles non typhiques est rare voir exceptionnelle. Elle concerne les personnes fragilisées : les nouveau-nés, les vieillards, les sujets atteints de dénutrition, de cancer, d'hémopathie maligne, de déficit immunitaire congénital ou acquis. Le passage dans le sang provoque des septicémies avec un ensemencement possible de foyers secondaire. Certaines études ont même montré qu'ils s'agissaient d'un marqueur d'immunodépression (Brown et al, 2000 ; Hohmann, 2001).

4. Facteurs de virulence :

a. Pili ou fimbriae :

Fimbriae sont des structures de surface filamenteuses, elles sont composées principalement de protéines répétées disposés en hélice appelés Fimbrines (Collinson et al, 1996). Les 8-11 gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse, la structure et l'assemblage sont généralement regroupés dans un opéron de 7-9 kb (Fernandez et al, 2000). Chez *Salmonella*, 13 opérons fimbriaires ont été identifiés jusqu'à maintenant. Pour certains, le rôle dans la virulence n'a pas encore été identifié (McClelland et al, 2001).

L'attachement aux cellules cibles, étape nécessaire à la colonisation et à la pénétration dans les cellules, est sous la dépendance de trois types d'appendices : les pili de type 1 qui sont les pili communs ; ils se fixent sur des résidus de D-mannose portés par les cellules eucaryotes; les pili se fixant sur des ligands différents du D-mannose et enfin les pili plus courts, identifiés chez *Salmonella typhimurium* (Betrand, 2003).

b. Invasion et colonisation de l'organisme :

Deux voies de pénétrations s'offrent aux Salmonelles. Elles pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin par un mécanisme dépendant de l'actine. Cette invasion est sous le contrôle d'un locus chromosomique *inv* regroupant au moins 4 gènes. L'expression de ce locus est favorisée par des conditions d'anaérobiose.

Dans les cellules, les bactéries sont présentes dans les vacuoles d'endocytoses qui progressent vers le pôle basal, elles atteignent la lamina propria et déclenchent une réponse inflammatoire. Dans les vacuoles, les Salmonelles se multiplient à partir de la sixième-huitième heure et provoquent la destruction de la cellule infectée (Betrand, 2003).

c. Survie dans les phagocytes :

Les salmonelles, pour la plupart, se comportent comme parasite intracellulaire et sont véhiculées dans l'organisme par les macrophages circulants, puis sont retrouvées dans les macrophages spléniques et hépatiques. Elles résident à l'intérieur de vacuoles qualifiées de phagosomes spaciaux. *In vitro*, les Salmonelles survivent dans les macrophages en inhibant la fusion phagosomes-lysosomes. De plus, elles se protègent de l'action toxique des radicaux oxygénés produits par les macrophages grâce à la synthèse de différents enzymes : catalase, superoxyde dismutase, glutathion-réductase. La synthèse d'une douzaine de protéines leur permet de se protéger des défenses et de s'adapter à un environnement acide (Bertrand, 2003).

d. Complexe lipopolysaccharidique :

Le lipopolysaccharide (LPS) est un des constituants de la membrane externe de la paroi bactérienne des Gram négatif. Le LPS est constitué de trois structures qui, allant de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule bactérienne, sont le lipide A (responsable d'un pouvoir pathogène et appelé également endotoxine), un core dont la structure est semblable pour toutes les salmonelles et des chaînes spécifiques de nature polysaccharidique et exposées à la surface de la bactérie. Ces chaînes polysaccharidiques sont des polymères de chaînons répétés et

identiques pour un même sérovar. Les différences antigéniques des chaînes spécifiques sont liées soit à la nature des sucres qui composent le chaînon répété soit à leur mode de liaison. *In vivo*, différentes études ont montré que le LPS favorise la colonisation intestinale chez la souris, le veau et le poulet (Lawley et al, 2006).

e. Synthèse de toxines :

En plus de l'endotoxine (LPS), les salmonelles peuvent synthétiser au moins deux autres types de toxine : une cytotoxine et une entérotoxine (Popoff et Norel, 1992). Une activité cytotoxique a été mise en évidence dans les lysats de *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* et *S. typhimurium*. Cette cytotoxine est thermolabile. Elle inhibe la synthèse des protéines chez les cellules Vero, HeLa et chez les cellules isolées de l'épithélium intestinal du lapin. Elle possède également une activité hémolytique pour les globules rouges du mouton. Elle est associée à la membrane externe des *Salmonella* et est codée par le gène *cyx*. Cette cytotoxine est capable de chélater les ions Ca^{++} et Mg^{++} . Cette chélation avec la membrane des cellules de la muqueuse intestinale change probablement la structure de la membrane cellulaire, permettant l'introduction de la bactérie dans la cellule hôte et une fuite sélective de molécules. Cet effet est réversible et non létal (Desprez, 1992).

f. Systèmes de captation du fer :

Le fer est un des facteurs de croissance indispensable pour la multiplication des salmonelles chez l'hôte. Or, chez les organismes supérieurs, le fer est étroitement séquestré dans des molécules telles que la transferrine et la lactoferrine. Le fer libre est alors en concentration trop faible ($10^{-18}M$) dans les liquides biologiques pour permettre cette multiplication (seuil de $10^{-4} M$). Cet abaissement de la concentration en fer libre constitue un moyen de défense non spécifique de l'hôte. Les salmonelles synthétisent alors des sidérophores afin de capter le fer. Il s'agit de protéines appelées entérobactines codées par le gène *ent* situé sur le chromosome bactérien (Popoff et Norel, 1992).

2. Principales étapes des infections à *Salmonella* :

Après une phase de colonisation, les salmonelles se multiplient dans le tube digestif. Le caecum, lieu de multiplication, semble jouer un rôle important dans l'infection (Contag et al, 1995). Dans l'intestin les bactéries interagissent avec la face apicale des cellules épithéliales, formant des appendices appelés invasomes (Ginocchio et al, 1994) ; elles provoquent

simultanément une dégénérescence des microvillosités et de la bordure en brosse, et induisent des ondulations membranaires des cellules épithéliales (Gahring et *al*, 1990).

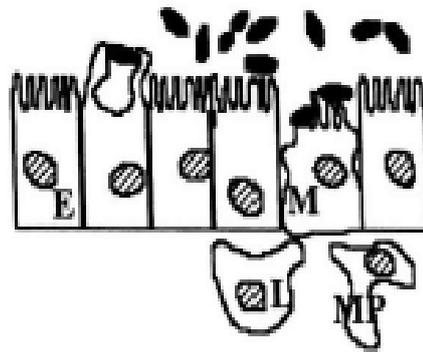
Les salmonelles sont alors observées entre et dans les cellules épithéliales, à l'intérieur d'une vacuole (figure 1). La bordure en brosse se régénère ensuite et les bactéries sont observées dans des vacuoles, dans les phagocytes de la lamina propia. La majorité des bactéries s'associent préférentiellement dans l'intestin aux cellules M des plaques de Peyer (Clark et *al*, 1996) ; l'internalisation est rapidement suivie de la destruction des cellules M (Lee et *al*, 1996). Une période de latence de plusieurs heures précède la phase de multiplication intracellulaire, la plupart des cellules présentent de larges vacuoles remplies de salmonelles.

Les phagocytes recrutés dans la réaction inflammatoire intestinale sont principalement des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, ainsi que des monocytes. Les bactéries phagocytées ne sont pas détruites par les macrophages.

Après une bactériémie transitoire. Les bactéries sont retrouvées dans les nœuds lymphatiques régionaux et dans les macrophages du foie et de la rate (Dunlap et *al*, 1992), organes pour lesquels les salmonelles ont un tropisme particulier. Il s'agit d'un parasite intracellulaire facultatif. Les salmonelles peuvent se multiplier dans ces organes avant d'être disséminées par voie sanguine (Finlay et *al*, 1988).

Lumière intestinale
-anaérobie
-nutriments

Salmonella



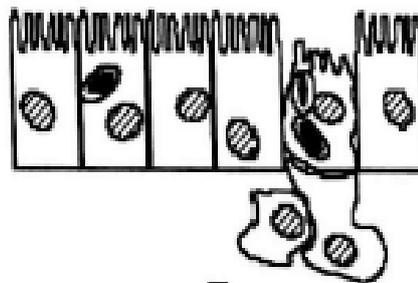
ETAPE 1

Adhésion et invasion

gènes *inv* et *prgH*
induits
gènes *spv* et *pagC*
réprimés



Epithélium
-anaérobie
-carence en
nutriments



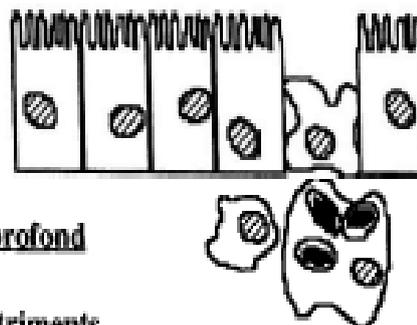
ETAPE 2

Pénétration de l'épithélium

gènes *inv*, *prgH* et *pagC*
réprimés
gènes *spv* induits



Tissu lymphoïde profond
-oxygène
-carence en nutriments



ETAPE 3

Infection du tissu lymphoïde

gènes *inv* et *prgH*
réprimés
gènes *spv* et *pagC*
induits

Figure 1: Représentation schématique de l'expression séquentielle des gènes lors des différentes étapes de la pathogénie après infection orale par *Salmonella* (Chen et al, 1995).

E : Cellules épithéliales ; M : Cellules M des plaques de Peyer ; MP macrophages ;
L : Lymphocytes.

1. Influence de la dose et de la voie de contamination :

Il existe une variété de facteurs qui vont influencer le développement de la salmonellose clinique. Certains de ces facteurs sont liés au micro-organisme lui-même, tel que la dose infectieuse de bactéries et la virulence de la souche individuelle. Autres facteurs qui influent sur l'infectiosité sont liés à l'hôte et sa susceptibilité individuelle. Des études chez des souris ont démontré que le nombre d'organismes de *Salmonella enteritidis* nécessaire pour infecter des animaux élevés de façon conventionnelle est 10^6 ou plus. Cependant, chez la souris sans germes, seulement 10 bactéries ont été nécessaires pour aboutir à la diarrhée, la septicémie et la mort (Collins et al, 1978). Toutefois, l'exposition à une dose infectieuse de $1,5 \times 10^{11}$ a donné lieu à des signes cliniques de colite aiguë (fièvre, diarrhée, dépression mentale) (Collins et al, 1978).

IV. Isolement et identification des salmonelles :

1. Echantillonnage :

Les plans d'échantillonnage sont conçus de façon qu'on obtienne des résultats d'une exactitude comparable entre les catégories de produits visés malgré que ceux-ci aient des taux de prévalence différents pour *Salmonella*. Le nombre d'échantillons à prélever varie selon les catégories de produits pour des raisons statistiques.

Les échantillons sont analysés le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

Deux objectifs principaux doivent être visés lors du prélèvement des échantillons (LEAA-REF-MIC-540):

- Obtenir un échantillon représentatif, c'est-à-dire qui est une image fidèle de l'ensemble d'un lot homogène ou hétérogène, afin de conclure sur ce lot.
- obtenir un échantillon intègre afin d'assurer le maintien de l'état du produit tel qu'il existe au moment de l'échantillonnage jusqu'à l'analyse.

2. Technique d'isolement :

L'isolement des salmonelles se fait en suivant le schéma de figure 2:

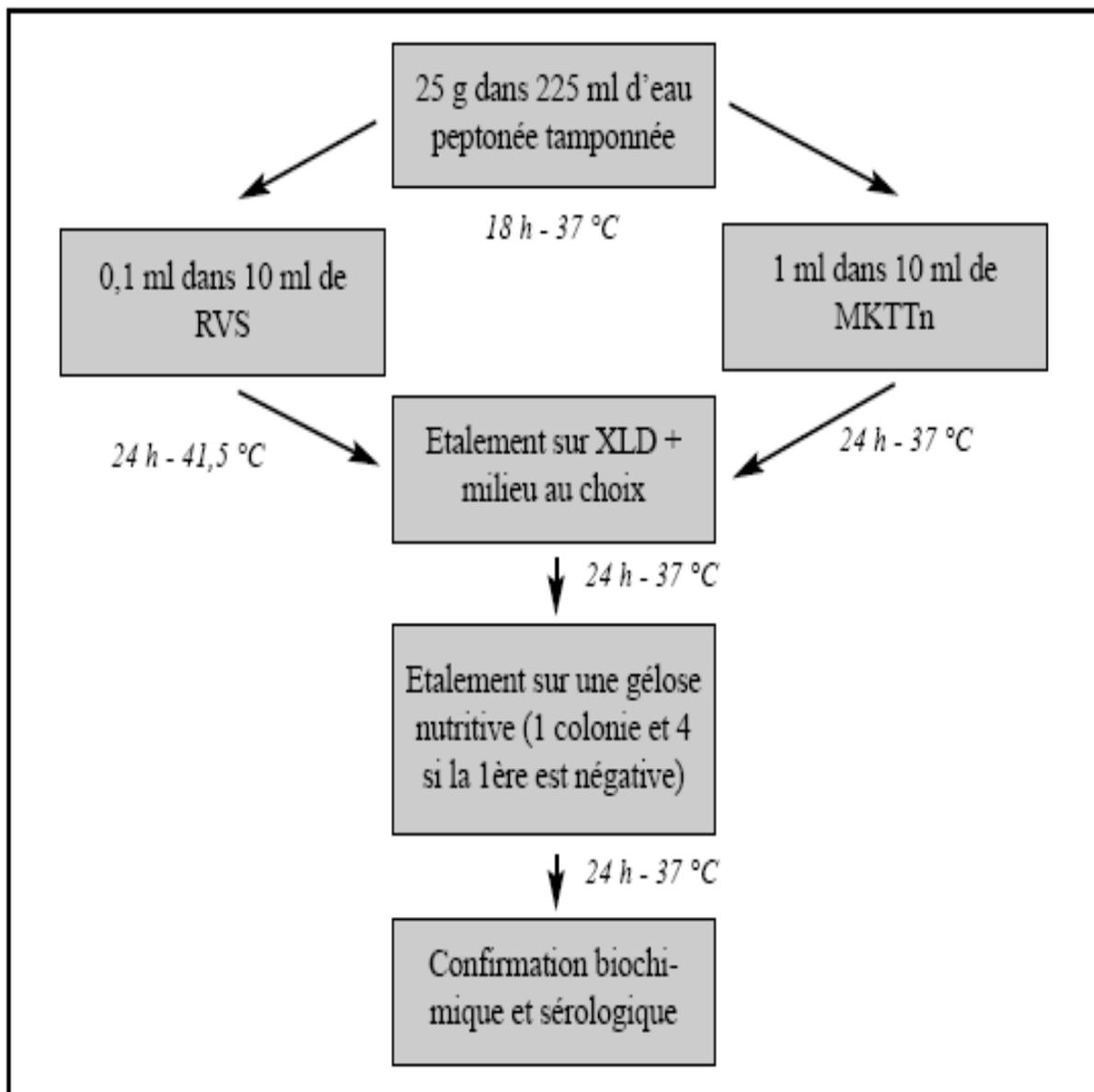


Figure 2: Schéma résumant la procédure pour l'isolement de *Salmonella* (ISO 6579:2002).

3. Identification biochimique :

La détermination de ces caractères peut être effectuée grâce à des galeries classiques en tubes ou des systèmes d'identification standardisée du type galeries API 20_E, ID 32_E ou RAPID ID 32_E. L'utilisation d'une galerie minimum comprenant un milieu de Hajna-Kligler, un milieu lysine-fer et une gélose nutritive en pente permet d'avoir les caractères principaux d'identification.

4. Identification sérologique (schéma de Kauffman-White) :

Les salmonelles isolés selon la norme ISO 6579: 2002 et confirmés biochimiquement sont par la suite sérotypés afin de déterminer le sérotype selon le schéma de Kauffmann-White. La recherche des antigènes, O (somatiques), H (flagellaires) et Vi (somatiques d'enveloppe) des *Salmonella* est effectuée par des agglutinations sur lames avec les sérums appropriés à partir de souches bactériennes identifiées comme étant *Salmonella*.

Tableau 4: Extrait de scéhma de kauffman-white indiquant la formule antigénique de quelques sérotypes (Grimont et all, 2007).

Sérotype	Antigène O	Antigène H	
		Phase I	Phase II
<i>S. Paratyphi A</i>	Groupe A 1, 2, 12		a
<i>S. Paratyphi B</i> <i>S. Typhimurium</i>	Groupe B 1, 4, [5], 12 1, 4, [5], 12	b l	1, 2 1, 2
<i>S. Infantis</i> <i>S. Virchow</i>	Groupe C1 6, 7 6, 7	r r	1, 5 e, n, x
<i>S. Typhi</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Dublin</i>	Groupe D 9, 12, [VI] 1, 9, 12 1, 9, 12, [VI]	d g, m g, p	- - -

B. IMPACT DES SALMONELLES SUR LA SANTE PUBLIQUE (salmonellose et TIAC):

I. Salmonelloses :

Chez l'homme et les animaux, les salmonelles peuvent être responsables, selon leur sérotype, d'une colonisation intestinale avec absence de symptôme (portage asymptomatique), de gastro-entérite ou d'une infection généralisée, parfois mortelle.

1. Portage asymptomatique :

Chez l'homme, le portage asymptomatique de séovars adaptés à l'homme est un phénomène courant et une excrétion asymptomatique par l'intermédiaire de l'urine ou des fèces peut se prolonger pendant des semaines voire des années (Varnam and Evans, 1991). Cela contribue à entretenir le réservoir de *Salmonella*. Chez les animaux, et notamment chez le porc et la volaille, l'infection par des sérotypes ubiquistes se traduit très souvent par du portage asymptomatique. Dans ce cas, les animaux infectés peuvent excréter jusqu'à plus de 10^7 bactéries par gramme de fèces en l'absence de symptôme.

2. Gastro-entérites :

Il s'agit d'une diarrhée aigue fébrile dont l'incubation est de 6 à 72 heures. La fièvre est quasi-constante, supérieure à $38,5^{\circ}\text{C}$ dans la plupart des cas. Elle est souvent accompagnée de céphalée intense pouvant faire croire à une méningite quand l'apparition des troubles digestifs est différée de 12 à 24 heures. Les troubles digestifs débutent par des nausées et/ou vomissements, et des douleurs abdominales souvent diffuses. Ils sont rapidement suivis par la diarrhée caractérisée par plus de 5 selles liquides par 24 heures. La déshydratation engendrée par la diarrhée constitue le seul facteur de gravité notamment aux âges extrêmes de la vie. L'évolution est spontanément résolutive : la fièvre disparaît en 2 à 3 jours et la diarrhée en une semaine. La mortalité, faible, concerne uniquement les sujets dénutris, les enfants et les personnes âgées (Aubry et al, 1992 ; Gendrel ,1997).

Les gastro-entérites sont provoquées par des *Salmonella* ubiquistes telles que *S. enteritidis* et *S. typhimurium* présentes chez l'homme et les animaux. Comme un grand nombre d'animaux sont porteurs de *Salmonella*, la contamination humaine peut se faire par le biais de divers produits alimentaires (viande, et particulièrement volaille, produits carnés, oeufs et produits laitiers). Les gastro-entérites affectent 1,3 milliards de personnes et 3 millions des personnes touchées en périssent (Crump et al, 2004). Parmi les cas de salmonelloses déclarées dont la cause étiologique a été établie en Europe, 2 sérotypes seulement se partagent 70 % des infections humaines : *S. enteritidis* et *S. typhimurium*. En 2008, 131 000 cas de salmonelloses ont été recensés en Europe (Rapport EFSA, 2010). Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants.

3. Infections systémiques ou fièvre typhoïde :

Chez l'homme, il s'agit de fièvre typhoïde ou paratyphoïde et elles sont respectivement dues à *S. typhi* et *S. paratyphi*. Ces sérotypes sont strictement adaptés à l'homme. La maladie se transmet par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par l'urine ou les fèces de personnes infectées (malades, convalescents ou porteurs asymptomatiques). La plupart des personnes infectées sont infectieuses jusqu'à la première semaine de convalescence mais 10% des personnes non-traitées excrètent la bactérie pendant plus de 3 mois. De plus, 2 à 5% des personnes non-traitées deviennent des porteurs asymptomatiques.

Cette maladie, qui constitue la forme la plus grave de salmonellose, touche chaque année 22 millions de personnes dans le monde et conduit à 217 000 décès. Elle a pratiquement disparu des pays industrialisés mais reste un vrai problème de santé publique dans les pays en voie de développement, notamment en Asie où l'on dénombre 274 cas sur 100 000 personnes (Crump *et al*, 2004). De plus, des souches *S. typhi* multirésistantes aux antibiotiques apparaissent de plus en plus, augmentant ainsi l'incidence des fièvres typhoïdes mais aussi la gravité des cas humains (OMS).

II. Toxi-infection alimentaire collective :

1. Définition :

Un foyer de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter l'origine (Bolnot *et al*, 2006).

Les TIAC sont la cause de morbidité ou de mortalité, de coût accrus en matière de soins de santé, de la perte de confiance du consommateur, de pertes économiques et de perte de productivité industrielle. C'est pour ces raisons que les TIAC représentent un véritable problème de santé publique (Guide investigation TAIC 2007). Pour chaque foyer de TIAC, une enquête épidémiologique est réalisée. L'aliment incriminé, ainsi que l'agent causal, sont systématiquement recherchés, mais pas toujours identifiés (Delmas *et al*, 2006, Catsaras ,2000).

Une TIAC est dépendante de trois événements successifs (Bolnot, 2006) :

- ❖ L'aliment est d'abord contaminé par un germe ou par une substance toxique produite par ce germe. Cette condition est facilement remplie car les microorganismes sont

présents sur les aliments. Ils sont le plus souvent en quantité insuffisante pour déclencher un symptôme.

- ❖ La quantité de germes est assez importante pour déclencher les symptômes : de 10 000 à 100 000 bactéries par gramme d'aliment selon les souches. Ce chiffre est atteint dans la plupart des cas après multiplication rapide des germes.
- ❖ Enfin, l'aliment porteur du germe est consommé par l'homme.

2. Agents responsables :

Des germes tels que *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, etc. sont les germes principales responsables de TIAC comme montre le tableau 5 :

Tableau 5: Principales causes des TIAC (Bolnot,2006 ; Corpet ,2005)

Agent de contamination	Données épidémiologiques	Incubation	Symptômes majeurs	Origine de la contamination et/ou facteurs favorisant la contamination
<i>Salmonella typhimurium</i> et <i>enteritidis</i>	Première cause de TIAC avec 60 pour cent des TIAC déclarées en France, soit 3 à 4000 cas déclarés/an	12-24h après ingestion (parfois 24h)	Diarrhées fébriles liquides et fétides avec douleurs abdominales, nausées céphalées et vomissements	Ce sont surtout les œufs et ovoproducts mais aussi les viandes (contaminées lors de l'abattage) et les produits de la mer (eaux polluées, lavage à l'eau sale). A ces aliments à risque s'ajoutent toutes les préparations ayant nécessité des manipulations humaines : Salades, pâtisseries (crème à base d'œuf), sandwichs, etc.
<i>Clostridium perfringens</i>	Deuxième cause de TIAC en nombre de malades avec 1500 cas déclarés/an.	Brève, de 8 à 16h après ingestion	Violentes diarrhées « en chasse d'eau », douleurs abdominales, nausées, sans fièvre ni vomissements.	Le matériel, les sols et les personnels (intestins) peuvent être porteurs de la bactérie sous forme de spores et contaminer les viandes.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Troisième cause de TIAC avec 1000 cas déclarés par an.	Incubation brève de 2 heures en moyenne (30 minutes à 6h après ingestion)	Vomissements incoercibles accompagnés de diarrhées indolores et symptômes nerveux (céphalée). Syndrome de « choc » par déshydratation.	La bactérie se retrouve dans les plats cuisinés et manipulés par l'homme qui les contamine par l'appareil respiratoire supérieur (cavités nasales, narines, rhinopharynx) et la peau infectée (panaris, furoncle).
<i>Listeria monocytogenes</i>	300 cas par an portant sur des individus immunodéprimés (personnes âgées, femmes enceintes)	Incubation variable (quelques jours à plusieurs semaines)	Septicémie et symptômes nerveux (méningite, encéphalite) avec mortalité importante chez les immunodéprimés. Avortements chez la femme enceinte et septicémie précoce (mortelle à 75 pour cent) chez le nouveau né.	Les aliments consommés crus sont en cause, en particulier la charcuterie et les fromages à pâte molle

3. Aliments identifiés ou suspectés :

Les aliments les plus fréquemment incriminés lors de salmonellose sont les oeufs et ovoproduits, les viandes crues ou peu cuites, le lait (figure 3). Un défaut de conservation, comme une rupture de la chaîne du froid, peut provoquer la multiplication de quelques salmonelles initialement présentes et déclencher la maladie lors de l'ingestion de l'aliment. Notons qu'au niveau microbiologique, la réglementation exige l'absence de germe dans 25 grammes d'aliment, même si 10^5 à 10^8 de salmonelles par gramme sont nécessaires pour provoquer la pathologie (Moll *et al*, 2002 ; Zelvelder *et al*, 2002 ; Leclerc, 2003).

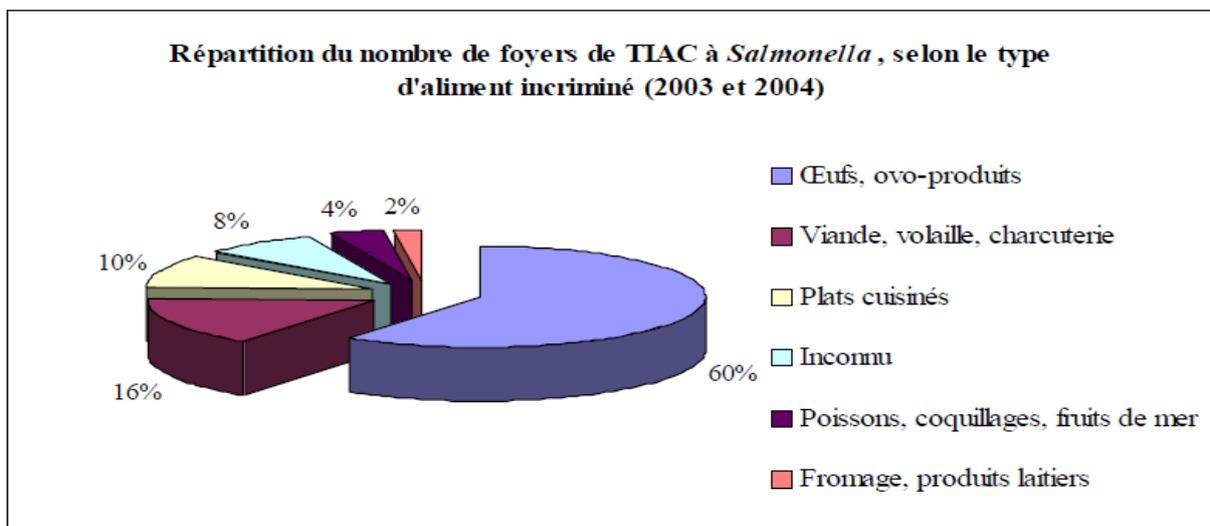


Figure 3: Répartition du nombre de foyers de TIAC à *Salmonella*, selon le type d'aliment incriminé (2003 et 2004), d'après les données de l'Institut de Veille Sanitaire.

C. METHODES DE TYPAGE DES SALMONELLES :

I. Méthodes phénotypiques:

1. Le sérotypage classique par agglutination :

Il nécessite l'emploi d'environ 200 antisérums (polyvalents et monovalents) polyclonaux absorbés, préparés chez le lapin. Le 1/3 des sérums est d'origine commerciale (principalement BioRad). Le sérotypage classique par agglutination reste le sérotypage de référence (ISO/TR 6579-3) et permet de mettre en évidence plus de 2500 sérotypes.

2. Le sérotypage moléculaire d'une souche de *Salmonella* :

Trois techniques permettent de compléter le typage ou de suppléer le sérotypage classique :

a. L'analyse MLST (Multilocus sequence typing) :

Il s'agit de déterminer après amplification génomique, la séquence de 7 gènes conservés (dits « de ménage »). Cette méthode pouvant être une alternative future au sérotypage permet également de comprendre les relations phylogénétiques entre sérotypes. Les données issues du MLST sont basées sur des séquences et sont donc facilement échangeables entre laboratoires ayant accès à cette technologie de plus en plus utilisée. Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Corkn (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman et al, PloS Pathogens 2012).

b. Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fljB* :

La plupart des souches de *Salmonella* ont deux gènes de structure (*fliC* et *fljB*) qui codent Les flagellines. Les souches non mobiles présentent généralement ces gènes de structure, mais sont incapables d'accumuler un flagelle fonctionnel (Paiva et al, 2009, Kwon et al, 2000). Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*.

c. L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage :

Il existe deux loci CRISPR chez *Salmonella* : CRISPR1 et CRISPR2. Le locus CRISPR1 se situe en aval du gène *iap*, tandis que le locus CRISPR2 se trouve en amont du gène *ygcF*. Les DR de ces deux loci font 29 paires de base de longueur et la séquence consensus est la suivante : 5'-CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC-3'. Une analyse des CRISPR par PCR et séquençage de 783 souches appartenant à 130 sérotypes a révélé la présence de 3 800 espaceurs mesurant en moyenne 32 pb (Fabre et al. 2012).

I. Méthodes génotypiques:

1. L'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) :

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est actuellement considérée comme la méthode de sous typage moléculaire de référence pour *Salmonella*. Des protocoles standardisés ainsi que des bases de données publiques sont développées pour permettre une comparaison des profils rapides et à grande échelles (Swaminathan et *al.*, 2001). Le PFGE est le résultat de la combinaison d'une gestion par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure et d'une électrophorèse adaptée à la grande taille des produits de digestion. Le résultat est un profil de restriction intéressant tout le génome du microorganisme. L'intérêt majeur de cette technique réside dans le fait qu'elle permet d'étudier l'ensemble du génome et présente donc un pouvoir discriminant potentiellement important (Boulouis et *al.*, 2001).

2. L' analyse MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) :

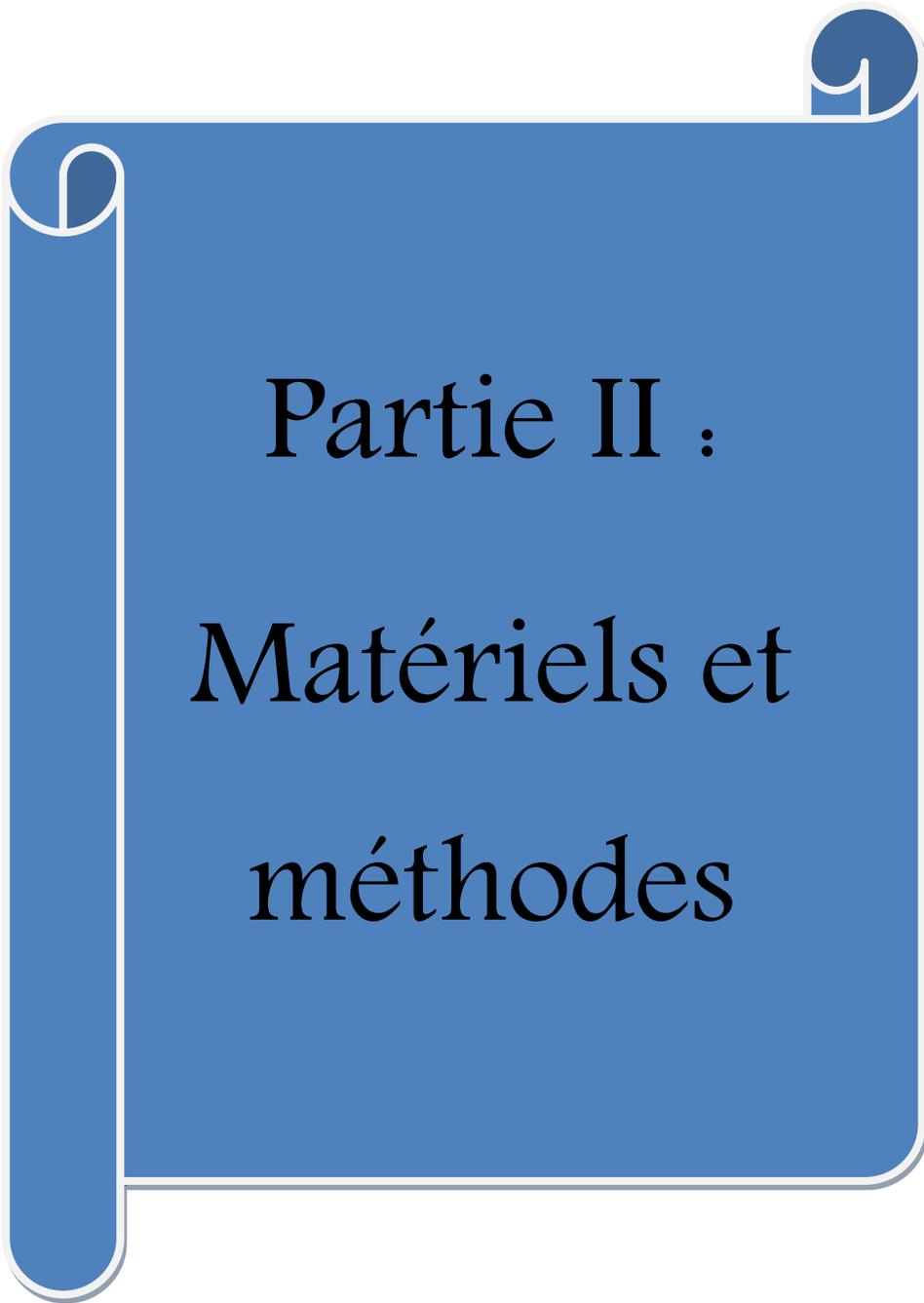
C'est une méthode pour les sérotypes Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011). Des schémas MLVA pour les sérotypes Enteritidis, Derby, Dublin, Typhi, Paratyphi A et Newport existent et sont en cours de validation et/ou harmonisation.

3. La méthode CRISPOL :

C'est une méthode de sous-typage à haut débit de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques basée sur le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein de CNR-ESS de Paris en 2009, repose sur la détection de 68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes (68 spacers et 4 variants de spacers) fixées sur des microbilles grâce à la technologie xMAP de Luminex®.

4. Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles :

- a. L'antibiogramme : par diffusion en milieu gélosé de 16 à 32 antibiotiques testés (suivant les dernières recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et la détermination de la CMI par la méthode E-test®.
- b. L'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques : (caractérisation des gènes de résistance, de leur environnement génétique et de leur support.



Partie II :
Matériels et
méthodes

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES :

I. Généralités :

Avant de commencer le sérotypage, il est important de confirmer biochimiquement que l'isolat appartient au genre *Salmonella* (comme spécifié dans l'ISO 6579-1). Même si les antigènes « H » sont propres aux *Salmonella*, plusieurs antigènes « O » sont communs à différents genres d'enterobacteriaceae (par exemple, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Hafnia*).

Chaque fournisseur de sérums produit ses propres séries de sérums, avec ses propres instructions d'utilisation. Il est donc impossible de donner un ensemble général d'instructions pour le sérotypage dans la mesure où il est toujours important de suivre les instructions des fournisseurs pour obtenir des résultats optimaux. Certains fabricants fournissent des pools de sérums (mélanges de plusieurs sérums anti- « O » ou « H ») qui sont très utiles au début du sérotypage d'un type inconnu. Lorsque la souche s'agglutine avec un pool de sérums, elle peut continuer à être analysée avec des sérums du groupe et/ou des sérums à facteur unique correspondant au pool positif. Si l'objectif est de ne typer que certains sérovars et qu'il est suffisant d'indiquer les autres sérovars comme étant des *salmonella spp.* L'agglutination peut alors être immédiatement effectuée avec uniquement les sérums à facteur unique spécifiques des sérovars correspondants.

II. Matériels :

Notre travail a porté sur une collection de 362 souches, biochimiquement confirmées comme étant *Salmonella spp.*, isolées entre l'année 2006 et 2014, dont 300 souches sont sérotypés par le laboratoire et le reste (62 souches) sont sérotypées au cours de la période de stage au sein de laboratoire (MHA). Ces souches proviennent du laboratoire de Microbiologie Hygiène alimentaire (MHA) de l'institut national d'hygiène (INH) qui sont d'origine de la région de Rabat et de différentes autres villes du Maroc.

Certaines souches sont isolées lors du contrôle sanitaire de routine des aliments et lors des études qui ont été faites sur les denrées alimentaires (Volaille, Viande, produit de mer) à l'INH ; d'autres souches ont été reçues des laboratoires régionaux pour but de confirmation sérologique et en cas des investigations des toxi-infections alimentaires.

Ces isolats sont accompagnés d'une fiche contenant les informations nécessaires (tel que le lieu, la date, l'aliment incriminé...) dont les données pouvant être exploitées sous forme de base de données du point de vue statistique et épidémiologique.

III. Contrôle des sérums utilisés dans le sérotypage à l'aide des souches EQAS :

Il convient que les sérums utilisés pour l'agglutination soient limpides (sauf si les sérums sont utilisés pour les essais au latex). Avant utilisation, les sérums doivent être toujours inspectés. En cas de turbidité les instructions du fabricant doivent être suivies.

Les modes opératoires possibles pour le contrôle de la qualité du sérotypage sont les suivants (NM ISO /TR 6579-3 2015, Indice de classement NM 08.0.182).

- ❖ Deux souches sont sélectionnées (ou le nombre de souches qui correspond à environ 2 % de la charge de travail) à partir du volume de travail d'une semaine. Chacune des souches sélectionnées est mise en culture deux fois. Les souches en double sont en suite traitées comme deux nouveaux isolats reçus pour le sérotypage. A l'issue du travail, les résultats correspondant aux deux souches et à leurs duplicatas sont comparés afin d'identifier les résultats discordants. Si des résultats discordants sont obtenus, ceux-ci font l'objet d'autres essais.
- ❖ Le laboratoire conserve un stock des sérovars de *Salmonella* entièrement caractérisés (par exemple issus d'une collection de souches ou provenant d'études de comparaison inter laboratoires). A partir de ce stock, un ou deux sérovars parmi les 10 sérovars les plus fréquemment identifiés dans le laboratoire sont régulièrement (par exemple, une fois par semaine) sélectionnés afin de vérifier le mode opératoire de sérotypage. Le ou les sérovars utilisés pour effectuer le contrôle qualité peuvent varier d'une semaine à l'autre afin de s'assurer que différents sérums sont soumis à essai au cours du temps.

IV. Culture des souches étudiées sur milieu approprié :

Afin de cultiver les souches à sérotyper, le procédé est le suivant:

- A l'aide d'une anse stérile, une goutte de BHI qui contient la souche conservée estensemencée sur milieu Muller Hinton.
- Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h.

V. Sérotypage des souches :

La détermination du sérotype des *Salmonella* se fait par la recherche des antigènes somatiques O, flagellaires H et de surface (Vi) à l'aide des sérums commercialisés selon le schéma de Kauffmann et White (Kaufmann F, 1966 ; Grimont et Weill, 2007).

1. Principe :

Le sérotypage des salmonelles repose sur la détermination d'une formule antigénique par agglutination rapide sur lame, à l'aide de sérums spécifiques dirigés principalement vers les antigènes de parois (« O ») ou de flagelles (« H ») ; le sérum dirigé contre « Vi » étant utile pour le sérovar Thyphi, Paratyphi et Dublin. Il est fortement recommandé de rechercher les caractères antigéniques après avoir préalablement identifié la famille, le genre, l'espèce et la sous-espèce sur la base de caractères morphologiques et biochimiques. Il existe en effet de nombreuses communautés antigéniques « O » au sein des Entérobactéries, et en particulier entre *Salmonella* et *Citrobacter freundii* et *Hafnia alvei*. En revanche, les antigènes « H » sont spécifiques de *Salmonella* (Danan , 2009).

2. Appareillage :

Le matériel utilisé au cours de la manipulation est figuré dans l'annexe A.

3. Milieux de culture :

La liste des milieux de la culture utilisée au cours de la manipulation et la méthode de leur préparation sont figurés dans l'annexe B.

4. Liste des sérums utilisés dans le sérotypage:

Les sérums anti-« O », « H », « Vi » sont commercialement disponibles auprès de différents fournisseurs. Des informations concernant les sérums polyvalents et monovalents pertinentes figurent à l'annexe C.

5. Technique :

- Une goutte d'antisérum est déposée sur une boîte ou lame de verre parfaitement propre.
- A l'aide d'une anse, un peu de culture bactérienne prélevée sur gélose Muller Hinton (après l'incubation pendant 24h) est émulsionnée de façon à obtenir un trouble homogène dans la goutte (pour l'identification des antigènes H, l'eau de condensation présente à la base de la gélose inclinée est prélevée).

- La boîte est agitée par mouvements lents et circulaires.
- La lecture des résultats est réalisée par l'observation de l'apparition d'agglutinats: fins, granulaires et difficiles à dissocier dans le cas des antigènes O et Vi; floconneux, faciles à dissocier dans le cas des antigènes H (s'aider éventuellement d'un fond noir pour une meilleure visualisation des agglutinats).

6. Recherche de souche auto-agglutinante :

La détermination des souches auto-agglutinante se fait en testant les souches par une solution de NaCl.

- Une goutte de solution saline (il peut s'agir d'une solution de NaCl de concentration comprise entre 8.5 g/l et 35 g/l) est ajoutée sur une boîte vide.
 - Une petite quantité de culture de bactéries (par exemple, la quantité pouvant être prélevée avec une anse jetable de 1 µl) est transférée sur la boîte de pétri et mélangée avec la goutte de solution saline.
 - la boîte d'avant est inclinée doucement en arrière. Selon le fabricant et/ou la concentration de la solution saline, il convient d'effectuer cette étape pendant 5s à 60s.
 - la suspension est examinée. La présence de granules dans la suspension indique une auto-agglutination.
 - Pour le sérotypage, il est difficile d'analyser davantage les souches démontrant une réaction positive à l'essai d'auto-agglutination. Pour les souches démontrant une auto-agglutination, il n'est pas possible de réaliser des essais pour la recherche d'antigènes « O ». Néanmoins, il est parfois encore possible de réaliser des essais pour la recherche d'antigènes « H ».
- S'il n'y a pas agglutination, la souche n'est pas auto-agglutinable et on peut poursuivre le sérotypage.
 - S'il y a agglutination, la souche est auto-agglutinable. Il faut la repiquer et recommencer le sérotypage.

7. Recherche de l'antigène d'enveloppe avec l'antisérum Vi :

Une goutte d'antisérum Vi est mélangée avec un peu de la culture de la souche pure de salmonelle :

- S'il n'y a pas d'agglutination, le sérotypage est poursuivie.
- S'il y a agglutination, l'orientation se fait vers les souches susceptibles de porter l'antigène Vi: *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. dublin*. L'antigène Vi est détruit par chauffage 10 min à 100°C pour poursuivre.

8. Détermination du groupe par identification des facteurs antigéniques somatiques "O" :

L'utilisation de sérum polyvalent sert à orienter le typage vers un nombre restreint de sérums monovalents caractérisant un groupe. En cas d'agglutination à partir d'un sérum polyvalent, l'opération est répétée avec les sérums monovalents entrant dans la composition initialement testée. S'il n'y a pas d'agglutination avec le mélange testé, l'opération est répétée avec d'autres sérums polyvalents jusqu'à obtention d'une agglutination.

- Les antisérums O mélanges (polyvalents): OMA et OMB sont testés tout d'abord.
 - Si l'antisérum OMA donne l'agglutination (inutile de tester OMB si l'agglutination est franche): la souche appartient à l'un des groupes O:2(A), O:4(B), O:9(D), O:3(E), O:21(L).
 - S'il y a absence d'agglutination dans OMA, l'antisérum OMB est testé: une agglutination avec OMB permet de conclure que la souche appartient à l'un des groupes O:8(C), O:11(F), O:13(G), O:6,14(H).
- Par la suite les antisérums mono- ou divalents sont testés par ordre de fréquence des groupes :
 - S'il y a agglutination dans OMA:
 - L'antigène majeur du groupe O:4 (B) est d'abord recherché, donc l'antisérum O4,5 est testé .
 - En absence d'agglutination, l'antigène majeur du groupe O:9 (D1) est recherché avec l'antisérum O9
 - En absence d'agglutination, l'antigène majeur du groupe O:3,10 (E1) est recherché avec l'antisérum O3,10,15

- En absence d'agglutination, l'antigène majeur du groupe O:2 (A) est recherché avec l'antisérum O1,2.
- S'il y a agglutination dans OMB:
 - l'antigène majeur du groupe O:8 (C2-C3) est d'abord recherché en testant l'agglutination dans le sérum O8
 - Puis, si nécessaire, le groupe O:7 (C1) est testé avec le sérum O7.

9. Détermination du sérotype par identification des facteurs antigéniques flagellaires "H" :

Les *Salmonella* présentent généralement 2 phases flagellaires. Les phases flagellaires sont déterminées en mettant en suspension des bactéries obtenues à partir d'une culture pure sur MH dans une goutte de sérum, comme décrit pour la recherche des facteurs antigéniques somatiques. L'agglutination est plus rapide que pour les facteurs « O », floconneuse et facilement dissociable par agitation du fait de la rupture des flagelles.

Lors de l'obtention d'un résultat positif pour un sérum monovalent, il est vérifié, à l'aide de la classification de Kauffmann-White, s'il s'agit d'une *Salmonella* diphasique ou monophasique. La détermination de sérotype H se fait en testant les antisérums H adaptés au groupe déterminé précédemment en testant la phase 1 puis la phase 2 (phase 1 la plus fréquente) :

- Les sérums H mélanges sont testés en fonction des antigènes H possibles.
- Puis les sérums H monovalents sont recherchés en fonction des résultats des mélanges H et dans l'ordre de fréquence des sérovars.

10. Vérification de la présence de la deuxième phase par la méthode d'inversion de phase :

S'il s'agit d'une *Salmonella* diphasique, la phase flagellaire identifiée est bloquée suivant la procédure suivante :

Une à deux gouttes de sérum spécifique de la phase flagellaire déterminée précédemment, sont disposées dans une boîte de Pétri et recouvertes de gélose SG fondue et maintenue en surfusion à $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

La gélose et le sérum sont homogénéisés par un mouvement tournant lent. La gélose refroidie est ensuiteensemencée abondamment au centre de la boîte avec une culture pure obtenue sur gélose Muller Hinton.

La boîte est mise en incubation à 37 °C pendant $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ sans être retournée.

Après l'incubation, s'il y a diffusion de la souche sur la boîte, la recherche de la deuxième phase flagellaire est entreprise par la méthode d'agglutination précédemment décrite, à partir de colonies prélevées à la périphérie de la zone d'envahissement de la gélose SG.



Figure 4: Présence de la diffusion de la souche.

En l'absence d'agglutinats ou en présence de la même phase flagellaire, l'opération d'inversion de phase est refaite au moins trois fois, en repartant chaque fois de la dernière culture obtenue sur le milieu de SG. Si aucun résultat positif n'est trouvé, la souche est considérée comme monophasique.



Figure 5: Absence de la diffusion de la souche.

Une approche séquentielle des différents tests sérologiques pour la recherche de facteurs antigéniques somatiques et flagellaires est représentée dans la figure suivante :

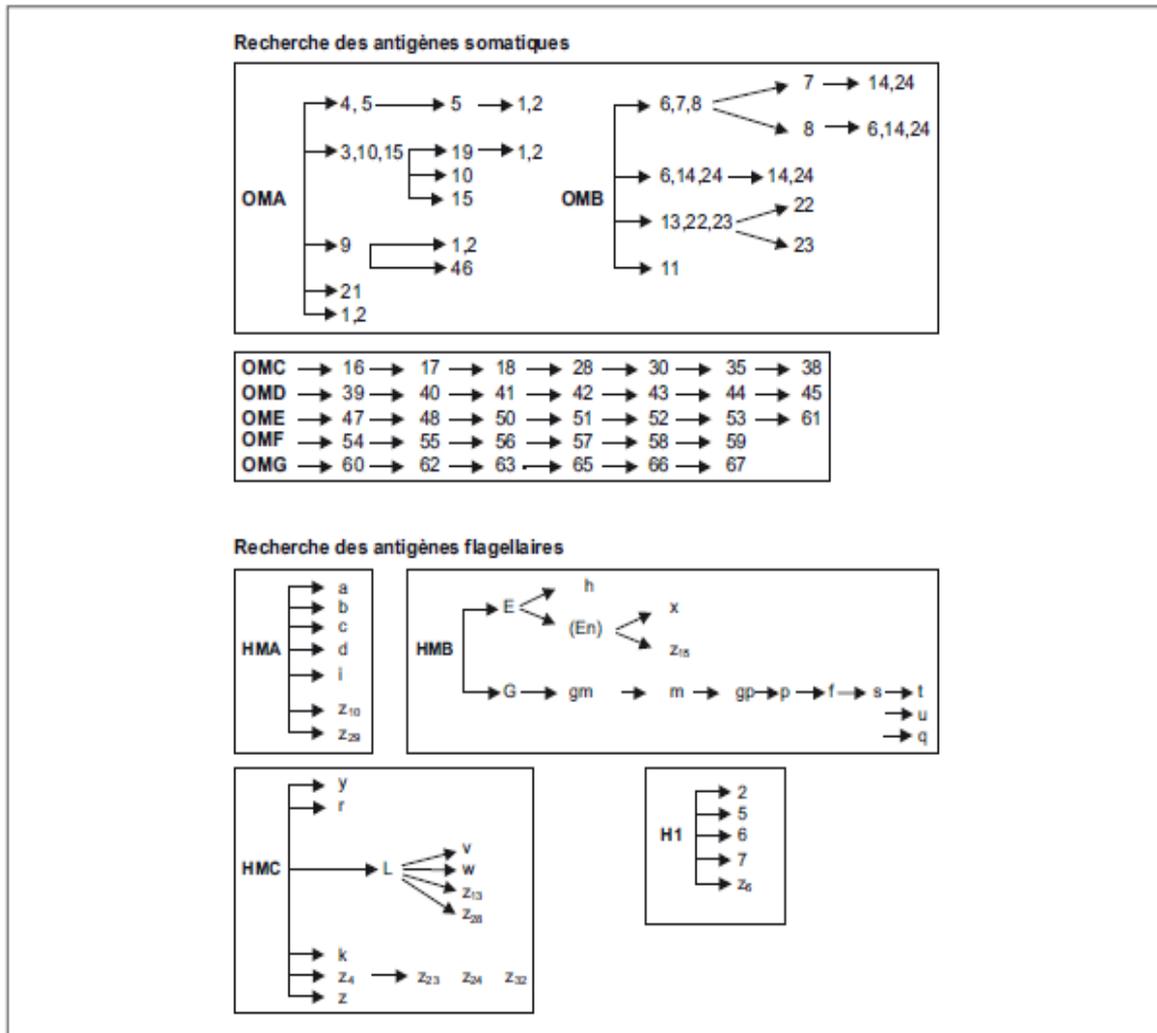
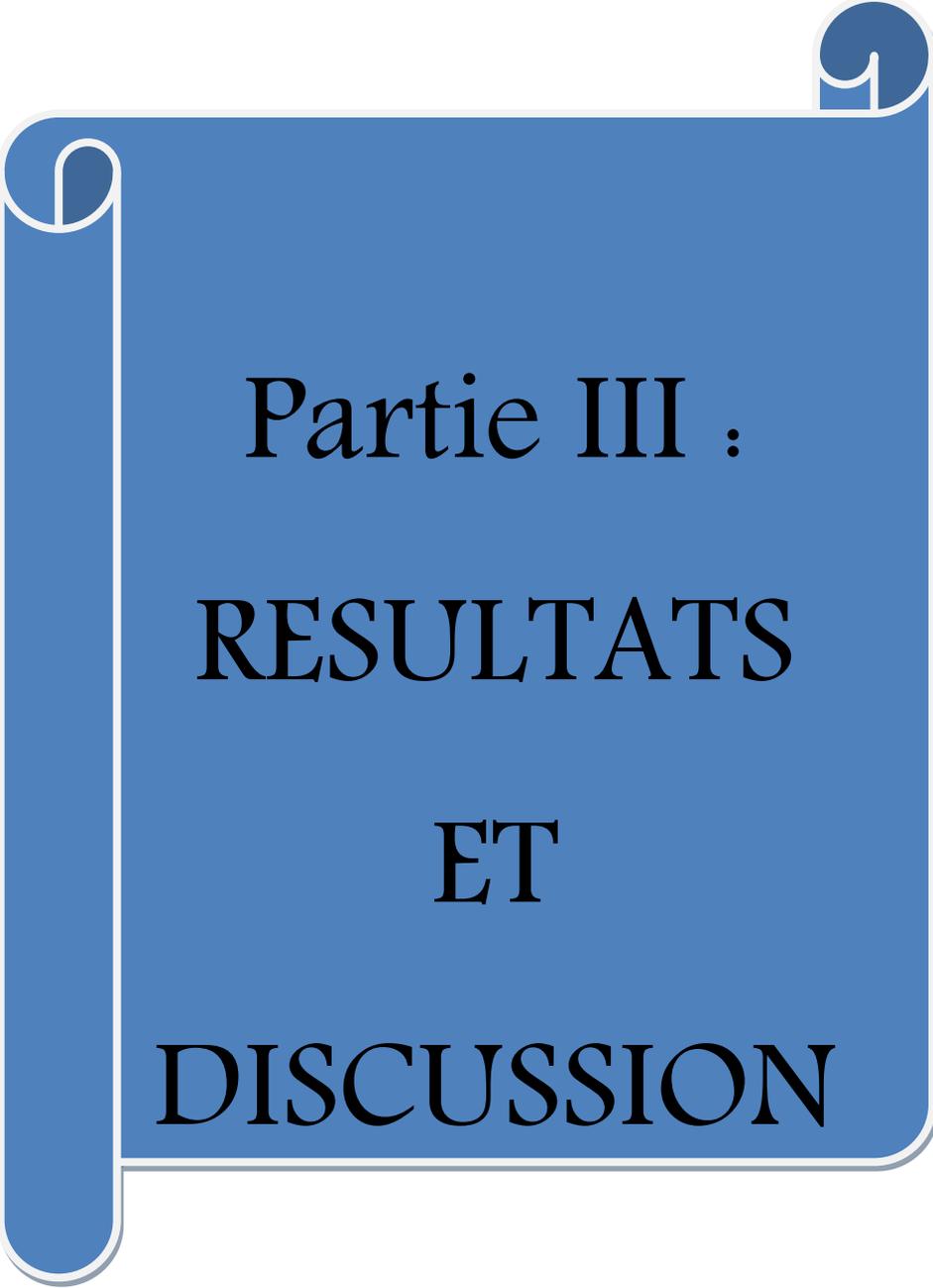


Figure 6: Tests séquentiels de sérums polyvalents et monovalents pour la recherche des antigènes somatiques et flagellaires des *Salmonella*.

11. Lecture et expression des résultats :

Plus de 2 500 sérovars, identifiés par leur formule antigénique, sont classés selon le schéma de White-Kauffmann-Le Minor ; cette classification, établie dans un but de diagnostic, est mise à jour par le centre collaborateur de référence de l'organisation mondiale de la santé pour les *Salmonella* à l'Institut Pasteur de Paris. Seuls les sérovars de la sous-espèce *Salmonella enterica* subsp. *enterica* portent un nom, assigné à la formule antigénique (Grimont et Weill, 2007). Cette formule distingue les facteurs « O » caractéristiques d'un groupe, des facteurs « O » accessoires, qui peuvent être absents ou présents. Sur la forme, les

facteurs accessoires liés à une conversion bactériophagique sont soulignés, les autres apparaissent entre crochets. La présence de facteurs accessoires n'intervient pas dans le diagnostic du sérovar, mais présente un intérêt comme marqueur épidémiologique.



Partie III :
RESULTATS
ET
DISCUSSION

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION :

1. Distribution annuelle des souches de salmonelles reçus à l'INH entre 2006 et 2014 :

Les informations enregistrées dans le laboratoire de microbiologie et hygiène alimentaire (MHA) de l'institut national d'hygiène (INH), nous ont permis de caractériser les 362 souches de *Salmonella*. La répartition annuelle des souches est représentée dans la figure suivante :

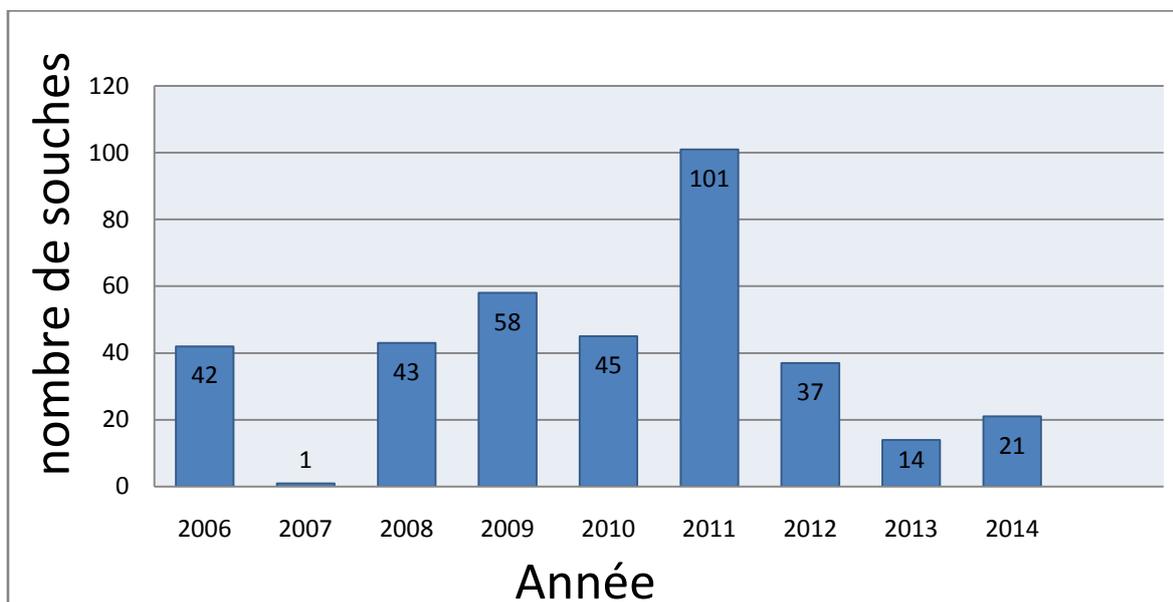


Figure 7: Distribution annuelle des souches de salmonelles reçus à l'INH entre 2006 et 2014

On remarque que le nombre des souches diffère d'une année à l'autre (figure7) avec un nombre élevé en 2011 (101), alors qu'en 2007, nous n'avons trouvé qu'une seule souche stockée.

Ce décalage du nombre des souches entre l'année 2011 et 2007 est dû au nombre élevé des études qui ont été faite au cours de l'année 2011 sur des aliments incriminés et qui sont source de contamination par les salmonelles (volailles, dindes..), alors qu'en 2007, les souches isolées n'ont pas été stockées et le chiffre ne reflète pas le nombre réel trouvé par année.

2. Distribution des souches selon leur origine géographique :

Concernant la distribution des souches selon leur origine géographique (figure 8), on remarque que la majorité des souches proviennent de la région « Rabat Salé Kenitra » (49,72%, 180/362) alors que le reste des souches (50,28%, 182/362) (souches envoyées par des laboratoires régionaux de la santé publique pour but de confirmation sérologique et en cas des TIAC) ont comme origine différents régions du Maroc (Fès, Marrakech, Tata, Taza, Tétouan...).

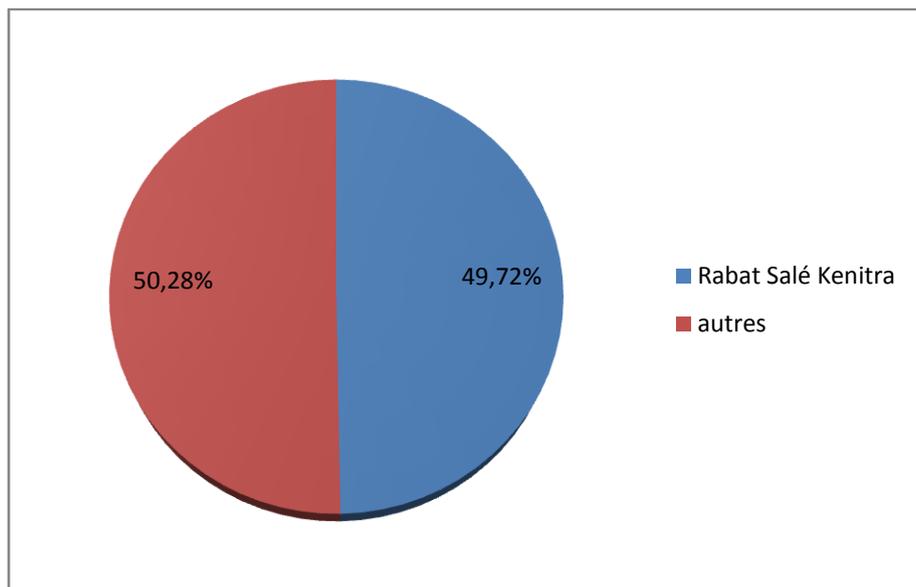


Figure 8: Distribution des souches selon leur origine géographique.

3. Prévalence de *Salmonella* dans les aliments analysés de la collection 2006-2014 de l'INH :

Un total de 167 souches de salmonelle sur 15084 échantillons (1,1%), de produits alimentaires analysés au cours des analyses de routine au laboratoire MHA à l'INH entre 2006 et 2014 ont été trouvés positifs pour *Salmonella*. Le tableau 6 montre la prévalence des souches de *Salmonella* isolées à partir d'une variété de produits alimentaires (Plat cuisiné, laits et produits laitiers, volaille, jus, viandes, poissons, pâtisseries, salades, fruits, charcuteries, sauces ...).

Tableau 6: Prévalence des salmonelles dans les aliments analysés au cours de contrôle de routine à l'INH entre 2006 et 2014.

Année	Nombre des échantillons analysés	Nombre des souches trouvées	Prévalence (%)
2006	2350	42	1,78
2007	2327	1	0,04
2008	2174	13	0,59
2009	1957	36	1,83
2010	1810	14	0,77
2011	1411	26	1,84
2012	958	4	0,41
2013	1032	12	1,16
2014	1065	19	1,78
Total	15084	167	1,1

Nos résultats (1,1%) sont similaires à ceux rapportés par une étude sur les aliments menée par Bouchrif et *al.* (2009) dans lequel la prévalence est de 0,91%.

La prévalence globale de *Salmonella* a été constamment inférieure à celle signalée dans d'autres pays d'Afrique (Stevens et al, 2006 ; McEvoy et al, 2003).

Cette observation peut être corrélée aux habitudes culinaires marocaines, qui sont la forte cuisson, et le respect d'hygiène des mains et des ustensiles, que dans d'autres pays de l'Afrique étudiés. Cependant, d'autres facteurs, y compris les diversités des catégories d'aliments, échantillonnage et isolement bactérien auraient pu influencer sur la faible prévalence.

4. Prévalence des sérovars provenant des analyses de routine des aliments :

Un total de 135 souches ont été isolées à partir des aliments au cours des analyses de routine à l'INH entre 2006 et 2014, le sérotypage de ces souches montre la présence de 52 sérovars dont la distribution des principaux sérovars est figurée dans le tableau 7:

Tableau 7: distribution des principaux sérovars isolés au cours des analyses de routine des aliments à l'INH entre 2006 et 2014.

Sérogroupe	Sérovar	Nombre	Pourcentage(%)
D1	<i>S.enteritidis</i>	32	23,7% (32/135)
B	<i>S.groupe II</i>	16	11,85% (16/135)
C2	<i>S.kentucky</i>	7	5,18% (7/135)
B	<i>S.typhimurium</i>	4	2,96% (4/135)
C1	<i>S.djugu</i>	4	2,96% (4/135)
C2	<i>S.duesseldorf</i>	4	2,96% (4/135)
E4	<i>S.sao</i>	4	2,96% (4/135)
C2	<i>S.warnow</i>	4	2,96% (4/135)
E4	<i>S.vilvorde</i>	3	2,22% (3/135)
B	<i>S.saintpaul</i>	3	2,22% (3/135)
E4	<i>S.sanktmark</i>	3	2,22% (3/135)
C2	<i>S.newport</i>	2	1,48% (2/135)
C1	<i>S.tounouma</i>	2	1,48% (2/135)
P	<i>S.III b</i>	2	1,48% (2/135)
C1	<i>S.kastrup</i>	2	1,48% (2/135)
	<i>Autres</i>	47	34,81% (47/135)

Le sérotypage de 135 isolats de *Salmonella* de la collection 2006-2014 de l'INH, isolés à partir des aliments, permet d'indiquer les 15 sérovars les plus dominants, cette distribution montre la forte prévalence des sérovar *S.enteritidis*, *groupe II*, *kentucky*, *typhimurium*... au Maroc. Nos résultats sont semblables à ceux trouvés par le centre de référence de *Shigella* et *Salmonella* (CNR, Paris) dont les sérovars *S.typhimurium*, *S.enteritidis* et *S.kentucky* sont successivement les principaux sérovars isolés en 2010 (CNR Paris, 2011).

Les mêmes sérotypes figurent parmi les cinq principales sources non-humaines signalées, mais dans un ordre différent. En Afrique, *S. enteritidis* et *S. anatum* sont les sérotypes les plus courants. En Europe, *S. infantis* suivi par *S. enteritidis* et *S. typhimurium* ont constitué la plus grande proportion d'isolats (Galanis et al, 2006)

Au Maroc, l'Institut national d'hygiène a rapporté les sérotypes Gallinarum, Enteritidis, Typhimurium et Infantis comme les plus isolés à partir d'animaux en 2003 (OMS, Global Salm-Surv).

En Italie, une étude sur la prévalence des salmonelles dans les aliments, montre la dominance de trois sérovars *S. typhimurium*, *S. derby* et *S. enteritidis* dans les différentes catégories des aliments (Busani et al, 2005).

En Tunisie, Neuf sérotypes ont été identifiés parmi les souches isolées à partir des aliments avec une prédominance de *Salmonella typhimurium* suivie de *Salmonella kentucky* et de *Salmonella Suberu* (Abbassi-Ghozzi et al, 2012).

5. Détermination de l'origine des principaux sérovars :

Les informations enregistrées à l'INH nous ont permis de caractériser les principaux sérovars par leur origine comme montre le tableau 8.

Tableau 8: Origine de principaux sérovar isolés à partir des aliments analysés à l'INH entre 2006 et 2014.

sérovar	Nombre des souches par origine													
	Plats cuisiniers	Œufs	Poulet	Dinde	viande rouge	salade crue	poissons	fromages	patisserie	légumes	Sauces	Jus	indeterminé	total
<i>S. enteritidis</i>		9	2			4	1	2	8		3		3	32
<i>S. groupe II</i>	1		1	1	5		1					1	6	16
<i>S. kentucky</i>					3	1	1	1					1	7
<i>S. typhimurium</i>					1					1	2			4
<i>S. djugu</i>					3								1	4
<i>S. duesseldorf</i>				1	3									4
<i>S. sao</i>				1							3			4
<i>S. warnow</i>											4			4
<i>S. vilvorde</i>				2	1									3
<i>S. saintpaul</i>		2											1	3
<i>S. sanktmark</i>				1	1						1			3
<i>S. newport</i>													2	2

<i>S. tounouma</i>	2		2
<i>S. III b</i>		2	2
<i>S. kastrup</i>		1	1 2

D'après le tableau 8, on remarque que la forte contamination par *S. enteritidis* est due principalement à la consommation des œufs et des aliments qui sont préparés à base de ces produits, alors que la forte contamination par les autres sérovars (*S. groupe II, S. kentucky...*) est due à la consommation de viande et de volaille ainsi que les produits de mer contaminés par l'eau. Des auteurs ont montrés que cette forte contamination par les sérovars de salmonelle est du à l'augmentation de la consommation de volailles et de leurs ovo produits, des mayonnaises et des aliments préparés à base d'œufs crus ou légèrement cuits, et au voyages international dans les pays d'Europe du Sud et d'Asie (Molbak et al, 2002 ; Threlfall et al, 2000).

En Europe, Amérique du Nord et d'autres pays développés, *S. enteritidis* a été établi comme le sérotype principal associée avec les poules pondeuses et les oeufs qui est l'origine de salmonellose mondiale (CDC, 2013 ; Doorduyn *et al.* , 2006 ; EFSA, 2009a ; EFSA/ECDC, 2013 ; Esaki *et al.* , 2013 ; Hara-Kudo and Takatori, 2009; Kist and Freitag, 2000 ; Wang *et al.* , 2010).

Ce constat reflète en partie la capacité de *S. enteritidis* de contaminer les oeufs et la difficulté de l'isoler de l'aliment ou l'environnement.

6. Prévalence des sérovars provenant des eaux analysées à l'INH :

Un total de 27 souches ont été isolées à l'INH entre 2006 et 2014 à partir des eaux analysées, la figure 9 montre la prévalence des sérovars de salmonelle qui ont été identifiées.

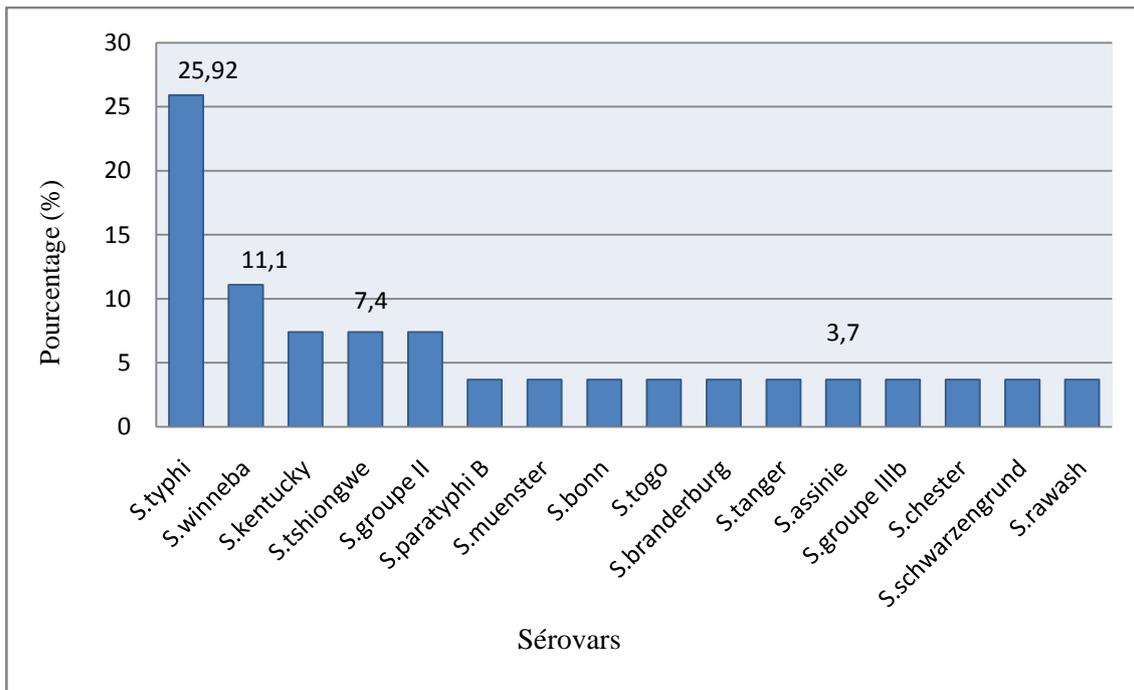


Figure 9: Prévalence des sérovars isolés à partir des eaux analysées

Le taux important de la contamination par les salmonelles typhiques est du principalement à la consommation des eaux non traitées contaminées par ce microorganisme, du fait que le sérovar Typhi est un contaminant majeur des eaux non chlorée, à cause de la présence de la matière fécale des personnes atteintes de typhoïde.

Levantesi et al montrent que les infections à *S. typhi* sont plus fréquentes et associées à une source d'eau contaminée par rapport à le *S. paratyphi A* (Levantesi et al. 2012).

Dans le monde, les mortalités humaines engendrées par la fièvre typhoïde sont évaluées à 600.000 par an (Hu et Kopecko, 2003).

Dans les pays à ressources limitées, dont l'Inde, l'eau de surface est utilisée pour boire, se laver, et pour des activités récréatives et saints (Ram et al, 2007), en effet la prévalence de l'infection à *S. Typhi* a été élevée et rapporté dans le nord de l'Inde (Singla et al, 2013 ; Bhunia et al, 2009).

Ces résultats montrent que la transmission hydrique de *S.typhi* est favorisée par le péril fécal, le manque d'hygiène et l'insuffisance de traitement chlorée, ce qui pose un grand risque sur la santé des consommateurs. Ce problème oblige les autorités sanitaires responsables à améliorer les systèmes de traitement des eaux destinées à la consommation humaine.

7. Prévalence des sérovars provenant des études qui ont été faites à l'INH entre 2006 et 2014 :

Entre 2006 et 2014, plusieurs études ont été faites au laboratoire MHA à l'INH en collaboration avec d'autres établissements et avec des universités dans le cadre des stages visant plusieurs filaires (Halieutique, volaille...).

▪ Secteur Halieutique :

Plusieurs produits halieutiques (moule, huitre...) ont été analysés pour la présence de la salmonelle et envoyés à l'INH pour sérotypage dans le cadre des études de recherche, la figure 10 montre la prévalence des sérovars qui ont été isolés à partir de ces produits de pêches :

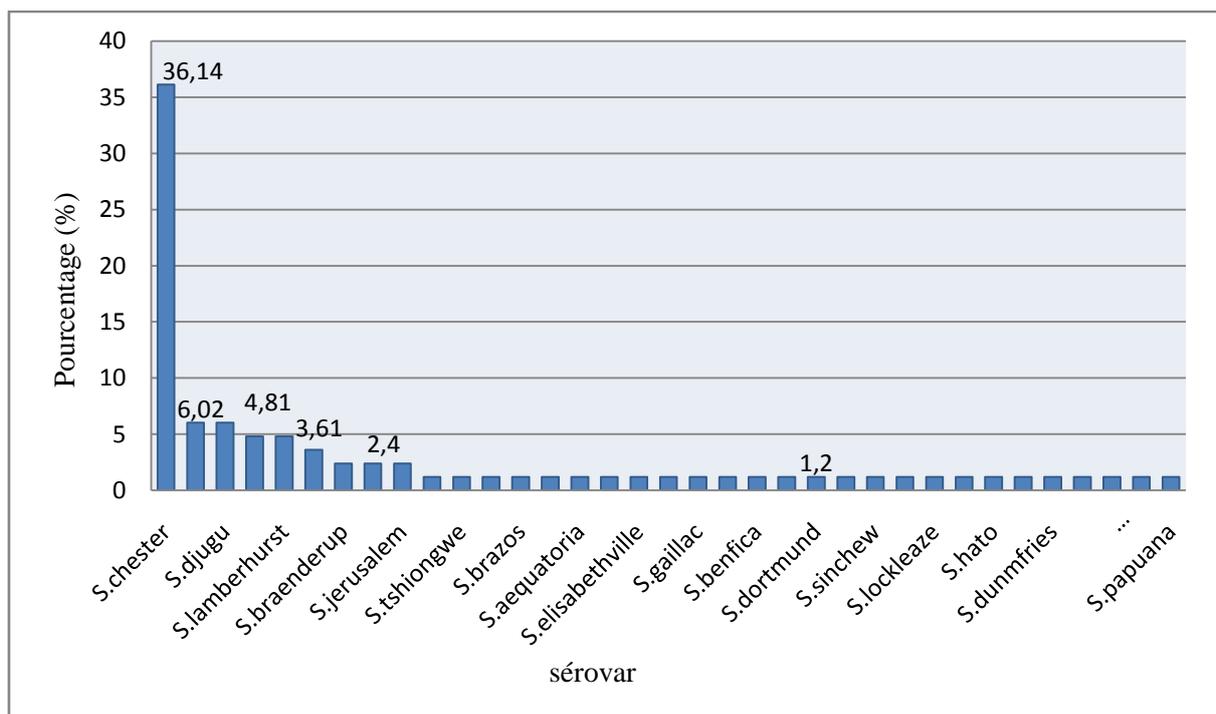


Figure 10: Distribution des sérovars isolés à partir des produits de pêche au cours des études faites à l'INH entre 2006 et 2014.

Cette figure montre la contamination des produits de mer par différents sérovars avec une prédominance de *S.chester* (36,14 %, 30/83) qui est un sérovat rare, alors que certains par les sérovars trouvés font parti des 15 serovars les plus fréquents surveillés mondialement et recommandée par l'OMS. Une autre étude a montrée que *Salmonella Chester* est un sérotype

inhabituel qui a été impliqué rarement comme une cause d'infection humaine (MacCready et al, 1957). En effet en 2010 selon le CDC *Salmonella chester* a causé une TIAC internationale, Quarante-quatre personnes infectées par la souche épidémique ont été signalés dans 18 États. Le laboratoire régional de santé a déclaré avoir trouvé la souche épidémique dans un emballage non ouvert de fromage, poulet et riz trouvé dans les maisons des gens malades.

L'apparition des sérotypes inhabituels au Maroc est le résultat de l'augmentation de la consommation des aliments importés et des voyages internationaux.

La contamination peut aussi provenir de l'eau contient la matière fécale. En effet la consommation des produits de mer crus ou insuffisamment cuis ou contaminés pendant la manipulation, est une préoccupation majeure de santé publique.

Le taux de survie de *Salmonella* dans les milieux aquatiques est très élevé; il survit que *Vibrio cholerae* dans l'eau très eutrophe de la rivière (Spector, 1998).

Salmonella est également un agent causal important pour les maladies d'origine alimentaire chez les humains qui ont consommé des produits de mer. L'incidence de salmonellose causée par la consommation de fruits de mer contaminés, tels que fruits de mer crus, est une préoccupation majeure des agences de santé publique dans de nombreux pays (Feldhusen, 2000).

Aux États-Unis, les fruits de mer et les crustacés représentaient 7,42% pour toutes les intoxications alimentaires des causes de décès liés à des infections de *Salmonella* entre 1990 et 1998 (Heinitz et al, 2000). Avec l'augmentation de la consommation de produits de mer, les risques potentiels de l'exposition à des agents pathogènes d'origine alimentaire ont également augmenté.

- Secteur volaille :

Concernant les produits de volaille, une étude de recherche a porté sur 300 échantillons de volaille cru et abats, ainsi que dindes. 79 souches ont été isolées à l'INH dans ce cadre, la figure 11 représente la prévalence des sérovars de *Salmonella* identifiés.

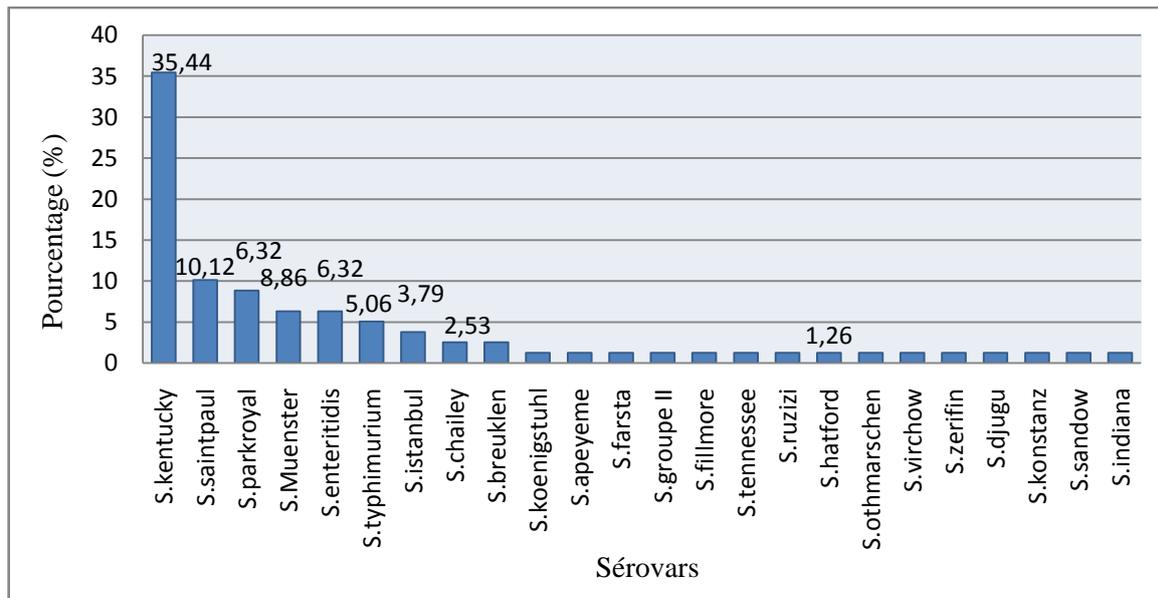


Figure 11: Distribution des sérovars isolés au cours des études sur les volailles.

On observe que *S.kentucky* est le sérovar principal incriminé dans les produits de volaille avec un pourcentage de 35,44 % (28/79), alors que les autres sérovars présentent le reste (Saintpaul, Parkroyal, Muenster...). De plus il y a une prédominance de serovars surveillés mondialement et qui présentent un risque élevé de salmonellose.

Ces résultats sont en accord aussi avec les résultats d'une étude marocaine sur les volailles menée par El Allaoui et al qui ont montré une prédominance de Kentucky (33,8%), suivie par les sérotypes Parkroyal (16,3%), Agona (11,3%), Saintpaul (9,6 %), Typhimurium (8%), Enteritidis (6.4%) (El Allaoui et al, 2014).

En outre, nos résultats sont similaires à ceux rapportés par une étude antérieure menée pour estimer la prévalence, la sensibilité aux antibiotiques et la distribution des sérotypes et les gènes de virulence de *Salmonella*, dans la viande hachée crue de dinde à Casablanca, où 15 sérotypes différents ont été identifiés, parmi lesquels *S. kentucky* (20,5 %) était le plus fréquent, suivi par, *S. corvallis* (15,3 %), *S. muenster* (12,8 %), *S. newport* (12,8 %), *S. typhimurium* (5,1 %) et 1 % pour les autres sérovars (Karraouan et al, 2010).

Une autre étude épidémiologique préliminaire de la contamination par *Salmonella* dans les poules pondeuses a été effectuée dans les régions de Annaba et Eltarf, l'Algérie, de Mars à Octobre 2008 et Mars à Novembre 2009, le sérotypage des 19 souches de *Salmonella* a

révélé la dominance de six sérovars qui sont *S. kentucky*, *S. enteritidis*, *S. hadar*, *S. virchow*, *S. heidelberg* and *S. manhattan* (Bouzidi et al,2012).

Au Maroc, la production de viande de volaille, en particulier de dinde, est passée de 10,5 à 50 millions de tonnes ces dernières années (Anonymous, 2003), ce qui explique la forte consommation de ces viandes, vu leur coût accessible.

Au Maroc, une évaluation de la sensibilité des germes aux antibiotiques a montré des taux de résistance très élevés aux quinolones chez *Salmonella* sérovar Kentucky et des *Salmonella* sérovar Typhimurium résistantes aux céphalosporines de 3ème génération (Aitmhand et al, 2002 ; Bouchrif et al, 2009). Notre collection a présenté des taux élevée de résistance et surtout aux fluoroquinolones (100% pour *S.kentucky*). Cette forte demande de ces types de viande blanche par la population et la présence des *Salmonella* multi-résistantes constituent un sujet d'inquiétude tant des instances officielles que des consommateurs.

Ces dernières années, l'isolement des *Salmonella kentucky* dans différentes denrées alimentaires (viande de dinde, produits à bases d'œufs...), constitue probablement un réservoir de dissémination de cette espèce. La contamination humaine, causée par *Salmonella kentucky* peut avoir des conséquences lourdes sur la santé publique.

- Secteur viande rouge et charcuterie :

Le sérotypage des 15 souches isolées à partir des échantillons de viande analysés montre la présence de 10 sérovars, dont la distribution est indiquée dans la figure 12 :

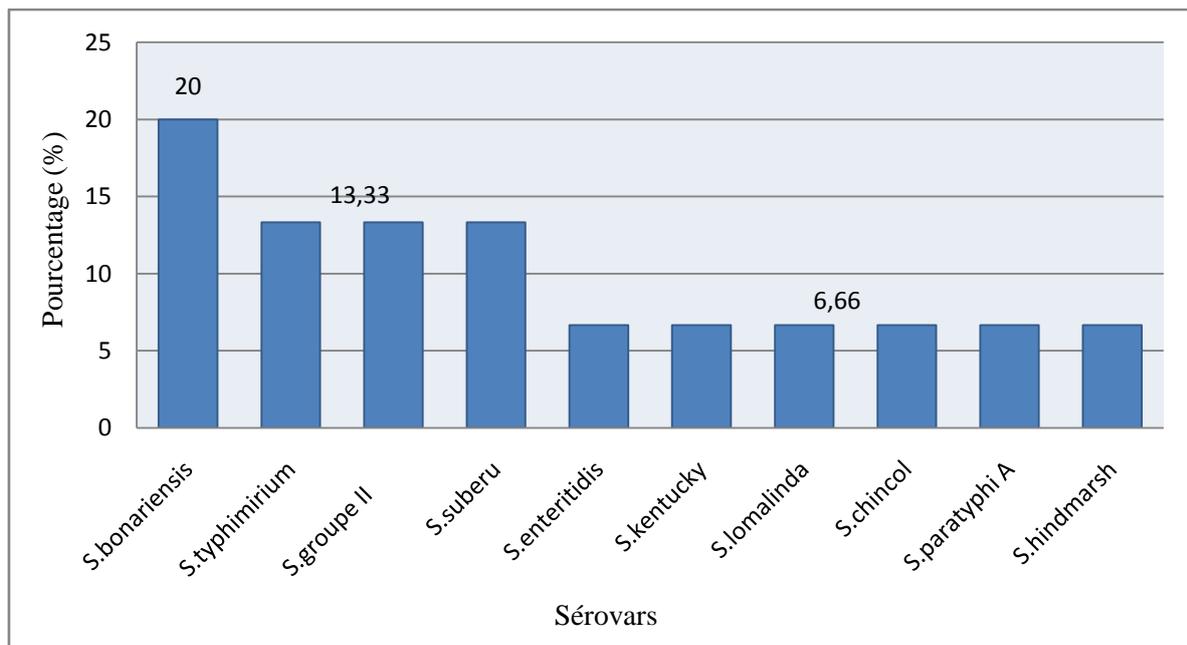


Figure 12: Distribution des sérovars de salmonelle isolés au cours des études sur les viandes rouges et charcuterie.

On remarque la prédominance de sérovar *S. bonariensis* avec un pourcentage de 20% suivi de 3 sérovars *S. typhimurium*, *S. groupe II*, *S. suberu* avec la même valeur pour les trois (13,33%). Alors que les autres sérovars (*S. enteritidis*, *S. kentucky*, *S. paratyphi A*...) représentent le reste.

Six isolats de *Salmonella* ont été sérotypés à l'Institut national de l'alimentation danoise (de Danemark), les sérotypes identifiés comprenaient une *Salmonella corvalis*, deux *Salmonella kentucky* et trois *Salmonella rissen* (Tafida et al, 2013).

Au Sénégal, une étude a été faite sur la contamination de viande de bovin par *Salmonella*, Les 286 isolats de *Salmonella* ont été divisés en 51 sérotypes. Les sérotypes les plus fréquents étaient *Salmonella bredeney* (25%), *S. muenster* (8%), *S. waycross* (7%), *S. corvallis* (4%) et *S. kentucky* (4%).

La présence de certains sérovars (exp : *S.enteritidis*, *S.kentucky*, *S.paratyphi A*) dans les échantillons de viande présente un problème pour la santé des consommateurs, ce qui exige le contrôle des *Salmonella* dans le secteur viande rouge et charcuterie en faisant appel à tous les partenaires du secteur, réunis dans un plan de lutte intégral, incluant des mesures hygiéniques, des vaccinations, un choix très sélectif de matières premières et d'additifs pour les aliments ainsi qu'une vigilance permanente.

1. Prévalence des sérovars incriminés dans les TIAC à *Salmonella* confirmées à l'INH entre 2006 et 2014 :

Un total de 31 foyers de TIAC regroupées à *Salmonella* ont été confirmées à l'INH entre 2006 et 2014, dont leur répartition est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 9: Répartition des TIAC confirmées *Salmonella* à l'INH entre l'année 2006 et 2014.

Année	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
nombre des TIAC	0	0	0	3	6	2	2	7	11

On remarque que le grand nombre a été confirmé en 2014, alors qu'en 2006, 2007 et 2008 aucune TIAC à *Salmonella* n'a été confirmée. Le nombre élevé en 2014 est dû à l'amélioration de la surveillance de salmonelle, mais aussi à la sensibilisation des laboratoires régionaux à envoyer les souches pour confirmation. Ceci peut expliquer la défaillance du système de surveillance des salmonelles, tout en sachant que les salmonelloses, source de TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire à compléter par la réglementation.

En générale, les TIAC qui arrivent à l'INH sont les plus médiatisées et sont graves avec des nombres de cas élevés et /ou décès,

L'absence de TIAC à salmonelle en 2006 jusqu'au 2008 peut être expliquée par un échantillonnage d'aliments qui n'est pas basé sur des investigations épidémiologiques du terrain, ou un manque d'aliments incriminés et envoi d'autres aliments qui se révèlent propres à la consommation par la suite

La figure 13 montre la prévalence des sérovars de salmonelle qui sont incriminés dans les TIAC confirmées à l'INH entre 2006 et 2014 :

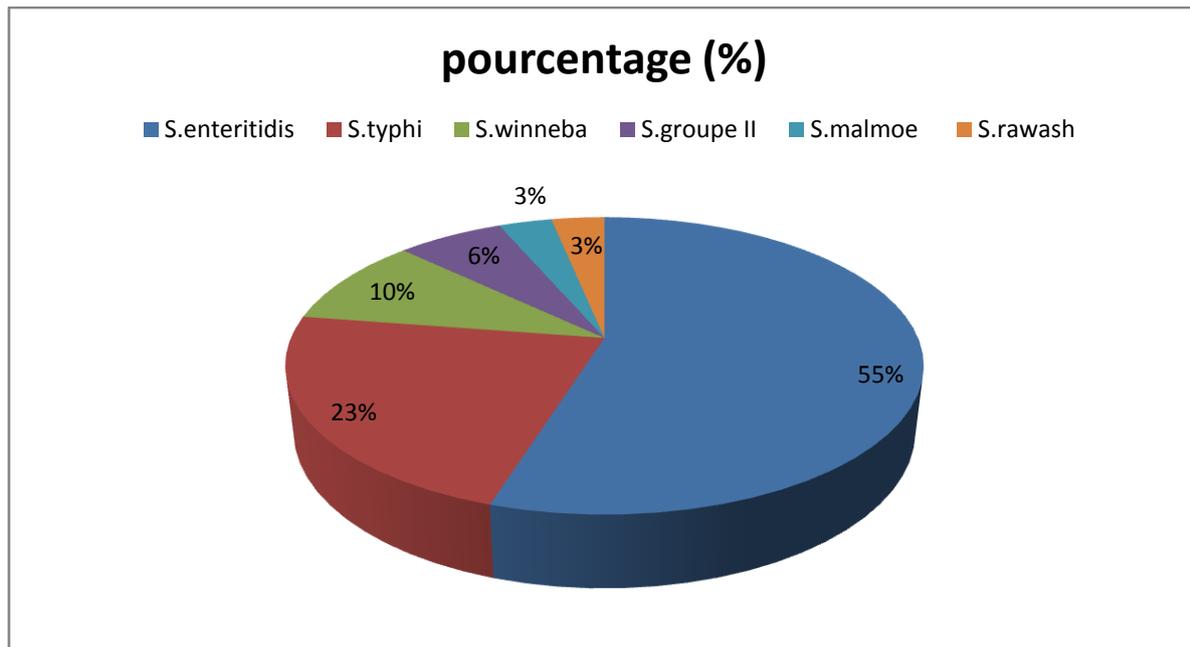


Figure 13: Répartition des sérovars responsables des TIAC enregistrées à l'INH entre 2006 et 2014.

On remarque que le sérovar *S. enteritidis* est le sérovar le plus incriminé dans les TIAC avec un pourcentage de 55% (17/31), suivi par le sérovar *S. typhi* avec un pourcentage de 23% (7/31).

La prévalence accrue de *S. enteritidis* dans les toxi-infections alimentaires collective (TIAC) diagnostiqués à l'INH, permet de déduire que ce sérotype semble constituer une menace suffisante pour inciter les autorités sanitaires à se pencher sur la connaissance de l'épidémiologie de cette bactérie aussi bien dans les cas sporadiques que dans les cas des toxi-infections alimentaires collectives.

Le comité scientifique des mesures vétérinaires payé montre que *Salmonella enteritidis* et *typhimurium* sont les plus incriminées dans les salmonelloses humaines (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health, 2003)

En France, Parmi les TIAC pour lesquelles l'agent responsable était confirmé, Salmonella était le plus fréquemment isolé (64% des TIAC) et le sérotype Enteritidis était prédominant (52% des TIAC à salmonella) (Haeghebaert et al, 2001).

En 2013, 203 foyers sont regroupés à *Salmonella* en France, dont 38 sérovars sont impliqués dans ces foyers, bien que 46 foyers sont à l'origine de *Salmonella enteritidis* (CNR Paris, 2013).

Pour le sérovar Typhi, Dans des nombreuses régions du monde, la fièvre entérique (typhoïde) causée par le sérovar *S.typhi* reste un problème important de santé publique (Song et al, 1993). Au Maroc, la typhoïde est une maladie endémique avec des poussées épidémiques limitées dans le temps et dans l'espace. L'incidence annuelle de cette maladie est passée de 49,2 cas pour 100.000 habitants en 1988 et 1,1 cas pour 100.000 habitants en 2011 (BE, DELM, 2005 ; MS/DPRF, 2012).

Toutefois, la limitation de l'infection causée par *S.typhi* à l'homme a été attribuée à la capacité de survie intracellulaire de ce sérovar pendant une longue durée dans les macrophages humains (Harris et al, 2006) permettant à la bactérie de diffuser dans les organes réticuloendothélial, incluant le foie, la rate et la moelle osseuse (Pégues et al, 2004 ; Haris et al, 2006).

De plus, l'existence chez *S.typhi* d'une séquence génomique unique codant pour une série de protéines inclut celle présumées être les fimbriae et les protéines de régulations, pouvant contribuer à la spécificité de l'hôte et de la maladie du microorganisme (Townsend et al, 2001).

Concernant les aliments incriminés dans les TIAC, le tableau 10 représente les catégories des aliments incriminés dans TIAC qui sont causées par les deux sérovares prédominants : *S.enteritidis* et *S.typhi*.

Tableau 10: Catégories des aliments incriminés dans les TIAC causées par *S.enteritidis* et *S.typhi*.

<i>S.enteritidis</i>	<i>S.typhi</i>
Œufs (3)	Eau non traité (7)
Pâtisserie (7)	
Sauce (4)	
Salade (1)	
Plats cuisinés (1)	
Poisson (1)	

On remarque que les œufs et les aliments qui sont préparés à base des ses produits (pain, mayonnaise...) sont les responsables majeurs des TIAC causées par le sérovar *S.enteritidis*, alors que la totalité des TIAC regroupés à *S.typhi* sont causées par les eaux non traité.

En Belgique, le sérotype Enteritidis est particulièrement associé à la plupart des cas de salmonelloses associées à la consommation d'œufs ou de volailles, (Wybo *et al.*, 2004).

Une étude montre que les œufs et les produits à base d'œufs (52,3% en 1998), ainsi que les viandes et les volailles (24% en 1998) apparaissent comme les aliments les plus fréquemment en cause dans les TIAC à salmonelles (Haeghebaert *et al.*, 2001).

Une autre étude montre que les deux sérovares *S.enteritidis* et *S.typhimurium* peuvent contaminer les produits alimentaires dès l'origine via les œufs, les viandes et les coquillages ainsi qu'à chaque étape de la chaîne alimentaire (Buisson, 1992 ; Rodrigue *et al.*, 1990).

L'incrimination accrue des produits de volaille dans les TIAC au Maroc, oblige les autorités sanitaires à établir des directives qui recommandent : la pasteurisation des œufs destinés à la restauration collective, des œufs destinés à l'utilisation pour la préparation des aliments qui ne sont pas destinés à la cuisson tels que les glaces et le mayonnaise par exemple, le respect des règles de bonnes pratiques d'hygiène, l'autocontrôle par le producteur pour assurer une bonne qualité de produit par l'utilisation des système de suivie de la chaine de production pour éviter les différents dangers biologiques qui peuvent contaminer le produit alimentaire final.

La plupart des épidémies de fièvre typhoïde déclarées au Maroc étaient liées à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. En effet l'eau non traitée a été incriminée dans la recrudescence des cas de typhoïde au niveau de la commune de Béni Amar à la préfecture e de Meknès en 2004 et le secteur sanitaire d'Itzer, province de Khénifra en 2005(Ghenghesh, 2009). Cette forte contamination des eaux par *S.typhi* au Maroc oblige les autorités sanitaires à améliorer les systèmes de traitement des eaux destinées à la consommation humaine

Afin de diminuer les risques de fièvre typhoïde sur les consommateurs.

CONCLUSION

L'augmentation des infections causées par les salmonelles est un problème observé dans les divers pays du monde. Lors de cette étude la distribution des salmonelles a montré la prédominance de *S. enteritidis* parmi les sérovars de salmonelle signalés entre 2006 et 2014 à L'INH Rabat, ainsi que la forte incrimination de ce sérovar dans les TIAC. Cette forte fréquence de *S. enteritidis* est due à la grande adaptation de cette bactérie au parasitisme des intestins de toutes les espèces animales dans lesquelles il peut rester pendant longtemps, et se transmettre facilement d'un animal à un autre et aussi à l'homme par le biais des aliments qui en dérivent. Les analyses qui ont été fait sur les eaux montrent la forte contamination de ces derniers par *S. typhi*. De plus les études qui ont été faites sur différentes catégories de viandes (volaille, viande rouge et produits halieutique) révèlent la présence de différents sérovars avec prédominance de *S. kentucky* pour la volaille, *S. bonariensis* pour les viandes rouges et charcuterie et *S. chester* pour les produits halieutiques.

L'apparition des sérotypes inhabituels au Maroc est le résultat de l'augmentation de la consommation des aliments importés, et la consommation très remarquable des produits de volaille et de leur ovo produits, en relation avec le développement de l'industrie avicole, ayant constitué la stratégie envisagée pour répondre à une démographie citadine sans cesse croissante et à une demande en protéine en constante augmentation, pour fournir la viande la moins chère aux consommateurs marocains. Par conséquent devant l'ampleur de la contamination de la filière avicole par les salmonelles, nous pouvons conclure que des mesures de prophylaxie sanitaire et de désinfection pour diminuer les risques de contagion des élevages avicoles doivent être obligatoires et strictes, afin d'éviter la contamination de leurs produits et par conséquent un risque pour l'homme. La méthodologie HACCP seule garante du contrôle des risques, mais l'application intempestive des mesures réglementaires en faveur de l'éradication des salmonelloses de tout le cheptel contaminé se voit nécessaire et l'Etat s'est fixé comme objectif de diminuer le risque salmonellique à un seuil tolérable, quant aux zoonoses salmonelliques provoquées par *S. enteritidis* et *S. typhimurium* et *S. kentucky*, il faut multiplier les contrôles microbiologiques au différents maillons de la chaîne surtout pour les reproducteurs qui doivent être indemnes ; pour les carcasses de poulets de chairs de consommation, on est loin du contrôle du risque salmonellique atteint par les pays industrialisés qui parlent d'un seuil de tolérance ZERO!

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

L'éradication des salmonelles est probablement une utopie. Cependant l'objectif à long terme des programmes de lutte est sans aucun doute l'élimination de toute infection à *Salmonella* dans les œufs et, si possible, aussi dans la viande de volaille et autres filières. Ceci devrait fortement réduire les cas humains de salmonellose. Néanmoins nous recommandons :

- Réalisation d'un Programme de surveillance nationale de la distribution des sérovars de salmonelle pour la gestion de leurs risques.
- Réalisation des rapports annuels sur les salmonelles.
- Partage des informations entre les laboratoires (INH et ONSSA...) et le ministère de la santé.
- Réalisation des études de recherche sur les salmonelles et leur impact sur la santé public par filaires touchées.
- Création de base de données nationale de salmonelle d'origine humaine, animale et alimentaire pour comparaison.
- Application de la charte sanitaire au secteur avicole tout en veillant à minimiser les points critiques menant au risque salmonellique.
- Initier des programmes de vaccinations contre *Salmonella enteritidis* au niveau des reproducteurs ponte.
- Par ailleurs il faut respecter les règles d'utilisation de l'antibiothérapie afin d'éviter de sélectionner des souches microbiennes multi résistantes aux antibiotiques.
- Au niveau des abattoirs, effectuer des traitements des carcasses au moment de l'échaudage, l'éviscération et la réfrigération.
- Application aux œufs, incriminés dans la contamination humaine par *S.enteritidis*, des programmes de contrôles d'assurance qualité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abbassi-Ghozzi I., Jaouani A., Hammami S., Martinez-Urtaza. J., Boudabous A., Gtari. M.,** (2012). Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia. *Pathologie Biologie* 60, e49, pp e49–e54.
- **Aitmhand R., Soukri a., Moustouai N., Amarouch H., Elmdaghri N., Sirot D., Benbachir M.,** (2002). Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum beta-lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother.*, 49,169-72.
- **Amélie C.P.,** (2006). *Salmonella*, salmonelloses bovines : Etat des lieux. epidemiologie en France, thèse, pp 22,23.
- **Anderson E. S., Ward L. R., DE Saxe M. J. AND DE SA J. D. H.,** (1977). Bactériophage-typing designation of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. Camb*, 78:297_300.
- **ANONYMOUS.,** (2008). Fisa. Documentations & statistiques.
- **Aubry P.,Niyongabo T.H., Nizigiye J., Muhirwa G., Kamanfu G., Ndahiragije A.,**(1992). Les infections bactériennes à salmonelles non typhiques au cours de l’infection par le virus de l’immunodéficience humaine (VIH) chez l’adulte africain. *Med. Trop.*, 52 :447-450.
- **Bad Bug Book (BBB).**, (2009). Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook *Salmonella* spp. Retrieved January 7, 2010, from <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>.
- **Baird-Parker A.C.,** (1990). Food borne salmonellosis. *Lancet*, 336:1231-5.
- **Bell, C., & Kyriakides, A.,** (2002). *Salmonella*. p. 307-331. In C. Blackburn, P. McClure.
- **Benacer D., Kwai lin T., Haruo W., Savithri D.P.,** (2010). Characterization of drug-resistant *Salmonella enteric* serotype *Typhimurium* by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes, and PFGE. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(6): 1042-1052.
- **Bertrand R. B.,** (2003). Etude de la contamination des milieux internes de l’oeuf par salmonella sérotype Enteritidis. Thèse, École Nationale Vétérinaire D’Alfort, , 106p.

- **Bhunia R., Hutin Y., Ramakrishnan R., Pal, N., Sen T., Murhekar M.,** (2009). A typhoid fever outbreak in a slum of South Dumdum municipality, West Bengal, India. 2007: evidence for foodborne and waterborne transmission. *BMC Pub. Health* 9, 115, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-9-115>.
- **Bolnot F.H ., Quintard J.C .,(2006). Observatoire Regional de Sante d’Ile de France. Guide d’orientation pour la restauration collective.** [enligne]. Maisons-Alfort (Fr): Observatoire Risques et ALIMents (ORALIM) de l’Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort.
- **Bouchrif B., LE Hello S., Pardos M., Karraouan B., PERRIER J.D.G.C., ENNAJI M.M., TiminounI M., Weill F.X.,** (2009). Ceftazidime-Resistant *Salmonella enterica*, Morocco. *Emerging Inf Dis.*, **15**, 1693-1694.
- **Boulouis H.J., Haddad N ., Maillard R .,** (2001). Techniques d’étude moléculaire des isolats : principes et fiabilité *Epidémiol. Et santé anim.* 39, 21-29.
- **Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R. & Swaminathan B.** (2000). Guest commentary: *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (7), 2465 - 2467.
- **Bouzidi N., Aoun L., Zeghdoudi M., Bensouilah M., Elgroud R., Oucief I., Sophie A., Granier , Anne B., Loïc D., Yves M.,** (2012). *Salmonella* contamination of laying-hen flocks in two regions of Algeria. *Food Research International* ,45, 897–904.
- **Brown M., Eykyn S.J.,** (2000). Non typhoidal *Salmonella* Bacteraemia Without Gastroenteritis: a marker of underlying immunosuppression. Review of cases at St. Thomas’Hospital 1970-1999. *J.Infect.*, 41:256-259.
- **Buisson Y.,** (1992). Les toxi-infections alimentaires, Médecine et maladies infectieuses. Volume 22, Supplément 3, Pages 272–281.
- **DELM,** Bulletin épidémiologique, (2005). 61-64.
- **Busani L et al.,** (2005). Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* Contamination in Foods of Animal Origin in Italy. *Journal of Food Protection*, Vol. 68, No. 8, 1731,pp 1729–1733.
- **Castro D., Miguel A. M., Martinez- Manzanares E., Cornax R., Balebona M. C., Luque A., Chandel D. S., Caudhy R., Dhawan B., Paudey A., Dey A. B.,**(2000). Drug resistant *Salmonella enterica* serotype Paratyphi A in India. *Emrf. Infect. Dis.* 6, 420-421.

- **Catsaras M.V.**, (2000). Epidémiologie et déclaration des TIAC en 1995, 1996, et 1997. Bulletin bimestriel de la société vétérinaire pratique de France 84 (3) : 174-177.
- **CDC. Center for Disease Control and Prevention.**,(2008). Annual Report. http://www.cdc.gov/narms/annual/2008/narms_2008_annual_report.pdf. Accessed 02./22/2011.
- **CDC.**, (2013) . Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1998–2008 . *MMWR*, **62** , SS02 , 1–34 . Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6202.pdf> (Accessed 9th July 2013).
- **Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR).**, (2011). Rapport d'activité annuel 2011, Institut Pasteur, Paris, France
- **Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR).**,(2013). Rapport d'activité annuel 2013, Institut Pasteur, Paris, France.
- **Chen C. Y., Buchmeier N.A., Libby S., Fang F. C., Krause M., Guiney D.G.**, (1995). Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublia* plasmid virulence genes. *J. Bacteriol.* 177, 5303-5309.
- **Clark M.A., Jepson M.A., Simmons N.L., Hirst B.H.**, (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse peyer's patch M cells. *Res. Microbil.* 145, 543-552.
- **Cohen N., Ennaji H., Hassar M., Karib H.**, (2006). The bacterial quality of red meat and offal in Casablanca (Morocco). *Mol. Nutr. Food Res.*, 50(6): 557-62.
- **Collins F., et al.**, (1978). Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect Immun.* **21**(1): p. 41-7.
- **Collinson S.K., Liu S.-L., Clouthier S.C., Banser P.A., Doran J.L., Sanderson K.E. and Kay W.W.**, (1996). The location of four fimbrin-encoding genes, agfA, fimA, sefA and sefD, on the *Salmonella enteritidis* and/or *S. typhimurium* XbaI–BlnI genomic restriction maps. *Gene* 169, 75–80.
- **Contag C. H., Contag P.R., Mullins J. I., Spilman S.D., Stevenson D.K., Benaron D.A.**,(1995). Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts, *Mol . Microbiol.* 18, 593-603.
- **Corpet (D).**, (2005). TIAC, Risques Sanitaires des Aliments Dangers Chimiques & Toxi-infections Alimentaires Collectives. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Unité pédagogique de l'Hygiène et l'Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale. 28p.

- **Crump J.A., Luby S.P. and Mintz E.D.,** (2004). The global burden of typhoid fever. *bull world health organ* **82**, 346-353.
- **Danan C., Fremy S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A.,** (2009). Determining the serotype of isolated *Salmonella* strains in the veterinary sector using the rapid slide agglutination test, cahiers de la Référence, No. 2, CR2 09M01. Décembre 2009 disponible sur :<http://www.afssa.fr/cahiersdelareference/numero2/PN60I0.htm>
- **Delmas G., Gallay A., Espie E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F.X., DE Valk H., Vaillant V., Desenclos J.C.,** (2006). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005 - Bulletin Epidémiologique hebdomadaire n° 51-52 du 26 décembre 2006 : 418-422.
- **Desprez C.,** (1992). La salmonellose du porc. Thèse Méd. Vét., Alfort, 130p.
- **Doorduyn Y. , Van den Brandhof W. E. , van Duynhoven Y. , Wannet W. J. B. and van Pelt W.,** (2006). Risk factors for *Salmonella enteritidis* and *typhimurium* (DT104 and non-DT104) infections in The Netherlands: predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections. *Epidemioln Infect* , **134** , 617 – 626
- **Dunlap N.E., Benjamin Jr W.H., Berry A.K., Eldridge J.H., Briles D.E.,** (1992). A safe-site for *Salmonella typhimurium* is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb. Pathog.* **13**, 181-190.
- **EFSA/ECDC.,** (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 . *EFSA J* , **11** (4) Article 3129, 250 pp . DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3129 .
- **EFSA.,** (2009). Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus* . *EFSA J* , **7** (4) Article 1036, 68 pp . DOI: 10.2903/j.efsa.2009.1036 .
- **El Allaoui A., Rhazi F.F., Ameur N., Nassri I., Oumokhtar B., Aboukacem A., Essahale A., Derouich A and Bouchrif B.,** (2014). Prevalence, Antibio-Resistance and Risk Factors for *Salmonella* in Broiler Turkey Farms in the Province of Khémisset (Morocco), *J. World's Poult. Res.* **4**(1): 22, 20-29.
- **Esaki H. , Shimura K. , Yamazaki Y. , Eguchi M. and Nakamura M.,** (2013) National surveillance of *Salmonella enteritidis* in commercial eggs in Japan. *Epidemiol Infect* , **141** , 941 – 943.

- **Euzeby J.P.**, (1997). Les salmonelles et les salmonelloses aviaires dues aux sérovars ubiquistes. *Revue Méd. Vét.*, 148, 1, 61-76.
- **Fabre L., Zhang J., Guigon G., Le Hello S., Guibert V., Accou- Demartin M., de Romans S., Lim C., Roux C., Passet V., Diancourt L., Guibourdenche M., Issenhuth-Jeanjean S., Achtman M., Brisse S., Sola C., Weill FX.**,(2012). CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of *Salmonella* Infections. *PLoS One*, 7:e36995.
- **Feldhusen F.**, (2000). The role of seafood in bacterial food-borne diseases. *Microbes Infect.* 2(13), 1651-1660.
- **Fernandez L.A. and Berenuer J.**, (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 21–44.
- **Finaly B.B., Falkow S.**, (1998). Virulence factors associated with *Salmonella* species. *Microbiol. Sci.* 5, 324-328.
- **François B, M.S.**, (2013). Laboratoire d'expertises et d'analyses alimentaires Service de microbiologie Accréditée ISO 17025 (No.131) LEAA-REF-MIC-540.
- **Gahring L.C., Heffron F., Finaly B.B., Falkow S.**,(1990). Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* 58, 443-448.
- **Galanis E., Lo Fo Wong D.M., Patrick M.E., Binsztein N., Cieslik A., Chalermchikit T., Aidara-Kane A., Ellis A., Angulo F.J., Wegener H.C.**, (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution 2000-2002. *Emerg Infect Dis* 12:381-388.
- **Gendrel D.**, (1997). Salmonelloses de l'enfant. *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, paris), 8-018-A-10.
- **Ginocchio C.C., Olmsted S.B., Wells C.L., Galan J.E.**, (1994). Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 76, 717-724.
- **Gledel J.**, (1996). Le genre *Salmonella* In: Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. Microbiologie alimentaire. *Tome 1 TecDoc* pp 61-77.
- **Gomez T.M., Motarjemi Y., Miyagawa S., Kaferstein F.K., Stohr K.**, (1997). Foodborne salmonellosis. *World Health Stat. Q.* 50:81-89.
- **Grimont P.A.D., Grimont F. et Bouvet P.J.M.**, (1994). *Salmonella* In Manuel de bactériologie clinique Freyney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C. Vol2, 2^{ème} édition Ed. Elsevier, pp1017-42.

- **Grimont P.A.D., and Weill F-X.,** (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9th edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
- **Groisman E.A., H. Ochman H.,** (2000). The path to Salmonella .ASM News 66, 21-26.
- **Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemuhl J., Grimont P.A.D. et al.,** (2010). Supplement 2003-2007 (N°.47) to the White – Kauffman-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 161, pp. 26-29.
- **Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M., Fields P.I., Bockemuhl J., Grimont P.A.D. et al.,** (2010). Supplement 2003-2007 (N°.47) to the White-Kauffman- Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*161, pp. 26-29.
- **Haeghebaert S., Le querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espie E., Vaillant V.,** (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. BEH, N° 50 :249.
- **Haeghebaert S., Le Querrec F., Vaillant V., Delarocque A., Bouvet P.,** (2001). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. Bull. Epidemiol. Hebd., 15:1-13.
- **Haeghebaert S., Sulem P., Deroudille L., Vanneroy-Adenot E., Bagnis O., Bouvet P., Grimont F., Brisabois A., Le Querrec F., Hervy C., Espie E., de Valk H., Vailant V.,** (2003). Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. Eurosurveillance 8:151–156.
- **Hanes D.,** (2003). Nontyphoid *Salmonella*. In: Miliotis N., Bier J. (Eds.) International Handbook of Food borne Pathogens, Marcel Dekker : New York, 137-149.
- **Hara-Kudo Y., and Takatori K.,** (2009). Microbial quality of liquid egg and *Salmonella* infection status in Japan . *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* , **50** , 34 – 40 .
- **Harris J. B., Baresch A. B., Rollins S. M., Alam A., Larocque R. C., Bikowski M., Peppercorn A. F., Hillman J. D., Qadri F., Calderwood S. B., Hohmann E., Breiman R. F., Brooks W. A., Ryan E., T.,** (2006). Identification of *in vivo*- induced Bacterial Protein Antigens during Human Infection with *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Infect. Imm.* 5161-5168.
- **Heinitz M.L., Ruble R.D., Wagner D.E., Tatini S.R.,**(2000). Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J. Food Prot.* 63(14), 579 –592.
- **Hohmann E.,** (2001). Nontyphoidal Salmonellosis. Clin. Infect. Dis., 32:263-269.

- **Hu L., Kopecko D., (2003).** Typhoid *Salmonella*. In: Miliotis N., Bier J. (Eds.), International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker: New York, 151-165.
- **ISO 6579., (2002).** Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- **Jay LS., Davos D., Dundas M., Frankish E., Lightfoot D., (2003).** *Salmonella*. Ch 8 In: Hocking AD (ed) Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, p. 207–266
- **Karraouan A., Fassouane A., EL ossmani H., Cohen N., Charafeddine O., Bouchrif B.,(2010).** Prévalence et gènes de virulence des *Salmonella* isolées des viandes hachées crues de dinde à Casablanca (Maroc). *Revue Méd. Vét.*, 161, 3,127,127-132
- **Kaufmann F., (1966).** The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen.
- **Kist M. J. and Freitag S., (2000).** Serovar specific risk factors and clinical features of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis: a study in South-West Germany . *Epidemiol Infect* , 124 , 383 – 392 .
- **Kohbata S., Takahashi M. & Yabuuchi E., (1983).** Lactose-fermenting, multiple drug-resistant *Salmonella typhi* strains isolated from a patient with postoperative typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology* 18 (4), 920 – 925.
- **Kwon H.J., Park K.Y., Yoo H.S., Park J.Y., Park Y.H., Kim S.J., (2000).** Differentiation of *Salmonella enterica* serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). *J Microbiol Methods*. 40(1):33–8.
- **L. Le Minor M., Véron M., Popoff B., (1982).** *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 133 B, 223-243 and 245-254.
- **L. Le Minor M.Y., Popoff B., Laurent D., Hermant.,(1986).** *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, 137 B, 211-217.
- **Lawley T. D., Chan K., Thompson L. J., Kim C. C., Govoni G. R., and Monack D. M., (2006).** Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2, e11.

- **Le Minor L. et Veron M.**, (1990). Bactériologie médicale 2ème édition Ed. Flammarion pp 411-427,1990
- **Leclerc N.**, (2003). L'assurance qualité en restauration collective : dispositif de lutte contre les toxi-infections alimentaires collectives. Exemple d'application dans une cuisine centrale - *Thèse de Doctorat Vétérinaire* - 109p.
- **Lee M.D., Curtiss R., Peay T.**, (1996). The effect of bacterial surface structures on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* infection in chickens, *Avian Dis.* 40, 28-36.
- **Levantesi C., Bonadonna L., Briancesco R., Grohmann E., Toze S., Tandoi V.**, (2012). *Salmonella* in surface and drinking water; occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45(2): 587-602.
- **MacCready R A., Reardon J. P. and Saphra 1.**, (1957). Salmonellosis in Massachusetts, N.. *J. Med.* 256, 1121- II28 (1957).
- **Mcclelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., ET AL.**, (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-856.
- **McEvoy JM., Doherty .M, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA.**, (2003). The prevalence of *Salmonella spp.* in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J. Appl. Microbiol.* 94:693–700.
- **Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V.**, (1999). Food-related illness and death in United States *Emerg Infect Dis* 5:607-625.
- **Millemann Y .**, (1998). Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles, *Vet. Res.*, **29**, 3-19.
- **Molbak K., Gerner-Smidt P ., Wegener H. C.**,(2002). Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg. Infect. Infect. Dis* . 8, 514-515.
- **Moll M., Moll N.**, (2002). Sécurité alimentaire du consommateur - 2ème édition - *Lavoisier Editions Technique & Documentation Paris, collection Sciences et techniques agroalimentaires-* 442p.
- **Morita M., Mori K., Tominaga K., Terajima J., Hirose K., Watanabe H. & Izumiya H.**, (2006). Characterization of lysine decarboxylase-negative strains of

Salmonella enterica serovar Enteritidis disseminated in Japan. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 46, 381 - 385.

- **MS/DPRF**, Santé en chiffre (2011), p.180, 2012.
- **Paiva J.B., Cavallini J.S., Silva M.D., Almeida M.A., Ângela H.L., Berchieri J.A.**,(2009). Molecular differentiation of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. *Brazil J Poult Sci.*11(4):271–5.
- **Pegues D. A., Ohl M. E., Miller S. I.**, (2004). *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*, 2636-2653. In Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. ed., principales and practice of infectious disease. Churchill-living-stone, Philadelphia.
- **Popoff M.Y., Bockemuhl J., Brenner F.W.**, (2000). Supplement 1998 (N°.42) to the Kauffman- White scheme. *Res. Microbiol.* 154 pp. 63-65.
- **Popoff M.Y., Bockemuhl J., Gheesling L.L.**, (2003). Supplement 2001 (N°.45) to the Kauffman- White scheme. *Res. Microbiol.*151 pp. 173-174.
- **Popoff M.Y., Norel F.**, (1992).Bases moléculaires de la pathogénécité des *Salmonella*. *Med. Mal.Infect.*, **22**, 310-324.
- **Poppof M.Y.**, (2001). Guidelines for the preparation of *salmonella ontisera*. Centre collaborateur OMS de reference et de recherché pour les Salmonelles. Institut Pasteur, Paris.
- **Ram S.,Vajpayee P., Shanker R.**,(2007).Prevalence of multi-antimicrobial-agent resistant, shigatoxin and enterotoxin producing *Escherichia coli* in surface waters of river Ganga.*Environ.Sci.Technol.*41,7383–7388.
- **Reid R.L., Porter R.C., & Ball H.J.**, (1993). The isolation of sucrose-fermenting *Salmonella Mbandaka*. *Veterinary Microbiology* 37, 181 - 185.
- **Renatus.**, (2014). Prevalence, serotypes and antimicrobial resistance of *salmonella* isolated from beef and animal feed in Namibia, thesis, *The University of Namibia*, p 20.
- **Rodrigue D.C., Tauxe R.V et Rowe B.**,(1990). International increase in *Salmonella enteritidis* : a new pandemic, *Epidemiol Infect*, 1, 21-27.
- **Rodrigue D.C., Tauxe R.V., Rowe B.** International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic. *Epidemiol Infect* 1990; 105:21-7..
- **Rouahi N., Zouhdi M., Benabderrazak F., Boudhan A., Hmid K., Drissi L., Zidouh A., Benkaddour K., Mahjour J., Elyachioui M., Alaoui M.A.**, (1998).

Analyse des données des trois dernières années sur les salmonelloses au Maroc (1995 – 1997). *Biologie Infectiologie Tome IV* : 3-10.

- **Salmon D. E. & Smith T.** (1886), Investigations in swine plague. In *U.S. Department of Animal Industry 1885*. 184. Washington Government Printing Office.
- **SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH** Opinion of the SCVMPH on *Salmonellae* in Foodstuffs (adopted on 14-15 April 2003) [en ligne] Adresse URL : http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf Consulté le 07/06/04.
- **Singla N., Bansal N., Gupta V., Chander J.**, (2013). Outbreak of *Salmonella typhi* enteric fever in sub-urban area of North India: a public health perspective. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 6, 167–168.
- **Song J. H., Cho H., Park M. Y., Doe Sun Na., Monn H. B., Pai C. H.**, (1993). Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. *J., Clin. Microbiol.* 1439-1443.
- **Soto S. M., Gonzalez-Hevia M. A., Mendoza M. C.**, (2003). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutations conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J. Antimicrobial chemotherapy.* 51, 1287_1291.
- **Spector M.P.**, (1998). The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv Microb Physiol.* 40, 233-279.
- **Stevens A., Kabore Y., Perrier-Gros-Claude JD., Millemann Y., Brisabois A., Catteau M., Cavin J.F., Dufour B.**, (2006). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *Int J Food Microbiol* 110:178-186.
- **Swaminathan B., T.J. Barrett et al.**, (2001). “pulsNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States.” *Emerging infectious diseases* 7(3): 382-389.
- **Tafida S.Y., Kabir J., Kwaga J.K.P., Bello M., Umohc S.E., Yakubu V.J., Nok A.J., Hendriksen R.**, (2013). Occurrence of *Salmonella* in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria, *Food Control* 32, 121, pp119e124.
- **Threlfall E. J., Ward L. R., Skinner J. A., Graham A.**, (2000). Antimicrobial drug resistance in non typhoidal *Salmonella* from humans in England and Wales in 1999:

Decrease in multiple resistances in *Salmonella enteric* serotypes Typhimurium, Virchow and Hadar . *Microb Drug Resist.* 6,319-325.

- **Todar K.**, (2008). *Salmonella* and Salmonellosis. *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [Electronic version] Retrieved December 14, 2009, from <http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html>.
- **Townsend S. M., Kramer N. E., Edwards R., Baker S., Hamlin N., Simmonds M., Stevens K., Maloy S., Parkhill J., Dougan G., Baumler A. J.**, (2001). *Salmonella enteric serovar Typhi* possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect. Immun.* 69, 2894-2901.
- **Villa L., Mammina C., Miriagou V., Tzouvelekis L. S., Tassios P. T., Nastasi A., Carattoli A.**, (2002). Multidrug and Broad- Spectrum cephalosporin Resistance among *Salmonella enterica* serotype Enteritidis Clinical Isolates in Southern Italy *J.Clin. Microbiol.* 266-2665.
- **Wang Y., Tsai Y., Laio C., Hsuan S., Yeh K., Chang C and Chen T.**, (2010). Investigation of *Salmonella* in hens and shell-eggs in central Taiwan . *Taiwan Vet J* , **36** , 38 – 44 .
- **WHO .**, (1996). The World Health Report, report of the director general WHO World Health Organisation: Geneva.
- **Wybo I., Wildemauwe C., Godard C., Bertrand S., Collard J.M.**, (2002). Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human *Salmonella* in Belgium: Trends for the period 2000-2002. *Acta Clin. Belg.*, 59, 152-160.
- **Zelvelder M., Nugon-Baudon L., Mollier P.**, (2002). La sécurité des aliments à l'INRA - *Editions de l'INRA* - 24 p.

ANNEXES :

Annexe A :

✓ Appareillage utilisé au cours de manipulation :

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si leurs spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

- ❖ **Incubateur** : pour cultiver des isolats de Salmonella, pouvant fonctionner à une température comprise entre 34°C et 38°C.
Dans la présente partie de l'ISO 6579, la température d'incubation n'est pas un paramètre différentiel.
Les isolats sont mis en culture afin d'obtenir suffisamment de matériel pour effectuer les essais sur une culture pure. La phase de culture est donc effectuée à une température de culture optimale. Pour les salmonelles, cette température est généralement comprise entre 34°C et 38°C.
- ❖ **Four** (pour la stérilisation en chaleur sèche) ou autoclave (pour la stérilisation en chaleur humide) (ISO 7218).
- ❖ **Réfrigérateur** (destiné à la conservation de milieux préparés), pouvant fonctionner à 5°C ± 3°C.
- ❖ **Boîtes de pétri en verre et en plastique stériles.**
- ❖ **Instrument d'ensemencement stérile**, par exemple des anses jetables.
- ❖ **Tubes à essai et flacons stériles**, de capacité appropriés des bouteilles ou flacons et des tubes stériles peuvent être utilisés.
- ❖ **Bain-marie(ou incubateur)**, pouvant fonctionner à 50°C ± 2°C.
- ❖ **Bain-marie**, pouvant fonctionner à 47-50°C.

Annexe B :

✓ Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs:

1. Muller Hinton :

a. Composition :

Peptones-----	3,0g
Hydrolysate de caséine-----	17,5g
Agar-----	15g
Ca ²⁺ -----	20 - 25 mg/l
Mg ²⁺ -----	10 - 12,5 mg/l
pH final-----	7,4 ± 0,2

b. Préparation :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre 35 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée.

Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Stériliser à l'autoclave à 121°C ± 1°C pendant 15 minutes.

Répartir dans des boîtes de pétri stériles.

L'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4 mm. Sécher les boîtes 30 min à 37°C. Le volume de Mueller-Hinton permettant d'obtenir exactement une épaisseur de 4 mm est de 25 ml pour une boîte de 90 mm, de 60 ml pour une boîte carrée de 120 mm, de 70 ml pour une boîte ronde de 150 mm.

2. Bouillon cœur-cerveille (BHI, Brain Heart Infusion) :

a. Composition :

Infusion de cervelle-----	12,5g
Infusion de cœur de bœuf-----	5,0g
Protéose-peptone-----	10,0g
Glucose-----	2,0g
Chlorure de sodium-----	5,0g
Phosphate disodique-----	2,5g
Eau-----	1000ml

b. Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation, il corresponde à une valeur de $7,4 \pm 0,2$ à 25°C .

Transférer le milieu de culture en volume de 5 ml dans des tubes d'une capacité nominale de 15 ml.

Stériliser par autoclave à 121°C pendant 15 min.

Conserver dans l'obscurité à 5°C pendant 2 mois maximum.

3. Milieu gélosé de migration (Sven Gard) :

a. Composition :

Extrait de viande-----	5,0g
Extrait de levure-----	1,0g
Bouillon trypto-caséine soja-----	30,0g
Glucose-----	1,0g
Désoxycholate de sodium-----	0,35g
Gélose-----	5g à 9g
Eau-----	1000ml

b. Préparation :

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation, il corresponde à une valeur de $7,6 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu de culture dans des flacons de capacité appropriée (6,6).

Stériliser par autoclave à 110°C pendant 20 min.

Refroidir la gélose à une température située entre 47°C et 50°C , ou conserver dans des flacons fermés à 5°C pendant 2 mois maximum.

Annexe C :

✓ **Composition des sérums utilisés pour le sérotypage des souches (Danane et al, 2009) :**

Facteur	Sérums polyvalents	Antigènes correspondants
O	OMA	1,2,12+4,5,12+9,12+9,46+3,10+1,3,19+,21
	OMB	6,7+6,8+11+13,22+13,23+6,14,24+8,20
H	H1	1,2+1,5+1,6+1,7+z ₆
	HE	eh+e,n,x+e,n,z ₁₅
	HG	f,g+g,p+g,m,s+g,m+m,t
	HMA	a+b+c+d+i+z ₁₀ +z ₂₉
	HMB	eh+e,n,x+e,n,z ₁₅ +G
	HMC	k+y+L+z ₄ +r