

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques**  
Département des Sciences Vétérinaires

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Microbiologie Médicale Vétérinaire

**CARACTERISATION DES SALMONELLES DETECTEES  
PAR UNE MÉTHODE ALTERNATIVE À LA MÉTHODE  
CLASSIQUE DANS LES TUERIES AVICOLES DE LA  
WILAYA DE BLIDA**

Par

**Mohand MEDJBAR**

Devant le jury composé de :

M. OUMOUNA	Maître de Conférences A, U. de Blida	Président.
N. MENOUEI	Maître de Conférences A, U. de Blida	Examineur.
M. BACHIR PACHA	Professeur, U. de Blida	Examineur.
A. BOUYOUCEF	Professeur, U. de Blida	Promoteur.

Blida, Janvier 2012

## RESUME

Cette étude nous fournit les premières données des taux de contamination par les salmonelles des tueries avicoles de poulet de chair dans la wilaya de Blida. Les souches de salmonelles sont isolées par deux méthodes : classique et alternative.

Un total de 360 prélèvements a été effectué au niveau de 5 tueries réparties sur trois communes de la wilaya de Blida. Chaque tuerie est visitée deux fois, à un intervalle de 15 jours au minimum, pendant une période de 6 mois (de décembre 2007 à mai 2008), ce qui nous a permis d'étudier 10 lots différents de poulet de chair destinés à l'abattage.

Nous avons identifié 12 isolats de salmonelles dont 10 sérotypés et 2 non sérotypés, ce qui porte le taux de contamination globale à **3.33%**.

Les sérovars qui ont été les plus fréquemment isolés lors de notre étude sont par ordre de fréquence décroissant : *S. Hadar* (40%), *S. Infantis* (30 %), *S. Typhimurium*, *S. Virchow* et *S. Enteritidis* (10%).

La méthode classique nous a permis d'identifier 3 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=2), *S. Infantis* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1).

La méthode alternative nous a permis d'identifier 5 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=4), *S. Infantis* (n=3), *S. Virchow* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1), *S. Enteritidis* (n=1).

Cette méthode nous a permis d'isoler deux sérotypes non isolés par la méthode classique, à savoir *S. Virchow* et *S. Enteritidis*.

Il ressort de cette étude que la nouvelle méthode alternative ISO 16 140 s'est avérée beaucoup plus sensible que la méthode classique.

Mots clés : *Salmonella*, poulet de chair, sérotype, milieux chromogéniques.

## ملخص

تزودنا هذه الدراسة بالمعطيات الأولى لعدد الحالات السائدة و لنسبة الإصابة بالسالمونيلا داخل المذابح الخاصة لدجاج اللحوم لولاية البليدة. لقد تم تحديد أنواع المصلية للسالمونيلا بطريقتين: الطريقة الكلاسيكية المستعملة في معظم المخابر و الطريقة البديلة. تم جمع 360 عينة على مستوى 5 مذابح خاصة موزعة على 3 بلديات من ولاية البليدة. قمنا بزيارة كل مذبح خاص مرتين في فترة 15 يوم أو أكثر مما سمح لنا بلمس 10 حصص مختلفة من دجاج اللحم الموجه للذبح.

تم تشخيص 12 سلالة بكتيرية معزولة منها 10 سلالات حددت أنواعها السيرولوجية و سلالتين غير محددة هذا ما يدل على نسبة الإصابة ب 3.33%.

الأنواع المصلية التي تم عزلها في دراستنا حسب الترتيب التنازلي هي:

S. Hadar (40%), S. Infantis (30 %), S. Typhimurium, S. Virchow et S. Enteritidis (10%).

سمحت لنا الطريقة الكلاسيكية بتشخيص 3 أنواع مصلية هي :

S. Hadar (n=2), S. Infantis (n=1), S. Typhimurium (n=1).

بينما سمحت لنا الطريقة البديلة بتشخيص الأنواع المصلية التالية:

S. Hadar (n=4), S. Infantis (n=3), S. Virchow (n=1), S. Typhimurium (n=1), S. Enteritidis (n=1).

هذه الطريقة سمحت لنا بعزل نوعين مصليين لم يمكن عزلهما بالطريقة الكلاسيكية ألا و هما

.S. Enteritidis, S. Virchow

تبين من هذه الدراسة أن الطريقة البديلة OSI 16140 أكثر دقة و اقتصادية بالنسبة للطريقة الكلاسيكية.

**الكلمات المفتاحية:** سالمونيلا، دجاج اللحوم، المصل، المحيطات الكروموجينية

## ABSTRACT

This study provides the first data about the rate of contamination by *Salmonella* from poultry slaughteries of broiler chicken of the wilaya of Blida. *Salmonella* strains were isolated by two methods: Classic and alternative..

A total of 360 samples was carried out during 5 slaughteries divided over three towns of the province of Blida. Each slaughterie was visited twice, with a gap of 15 days, this allowed us to deal with 10 different packages of broil chicken to be slaughtered.

We could spot 12 isolates of salmonella out of 10 serotyped and 2 *Salmonella* non serotyped, which bears the contamination rate at **3.33%**.

The serotypes which were the most frequently isolated during our study are by decreasing order of frequency: *S. Hadar* (40%), *S. Infantis* (30 %), *S. Typhimurium*, *S. Virchow* and *S. Enteritidis* (10%).

The classic procedure allowed us to identify 3 isolates of salmonella: *S. Hadar* (n=2), *S. Infantis* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1).

The alternative procedure allowed us to identify 5 isolates of salmonella.

*S. Hadar* (n=4), *S. Infantis* (n=3), *S. Virchow* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1), and *S. Enteritidis* (n=1).

This method allowed us to isolate two non isolated serotypes by the classic procedure, namely *S. Virchow* and *S. Enteritidis*.

Out of this study we come up with the new procedure ISO 16 140 which turned out to be more sensitive than the classic procedure.

**Key words :** *Salmonella*; broiler chicken; serotype; chromogenic medium.

## REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements :

### A **Monsieur A. Bouyoucef**

Professeur à la Faculté des Sciences Agrovétérinaires et biologiques de l'Université Saad Dahleb de Blida, d'avoir accepté d'être mon promoteur, de m'avoir proposé ce sujet d'actualité, pour sa présence, sa disponibilité, sa confiance et pour son aide et ses corrections tout au long de ce travail.

### A **Monsieur M. Oumouna**

Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de Blida qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ce mémoire. Hommage respectueux.

### A **Monsieur M. Bachir-Pacha**

Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de Blida, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

### A **Monsieur N. Menoueri**

Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de Blida d'avoir bien voulu participer au jury de ce mémoire et d'examiner ce travail.

A **Monsieur Ferrag A.**, Directeur du Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique, Ben Aknoun, Alger ainsi que **Monsieur Benayad T.**, Chef de service de Section Contrôle de Qualité et Sécurité Alimentaire, de m'avoir accueilli et mis à ma disposition tout le matériel et consommable nécessaire pour effectuer ma partie expérimentale au sein de leur Laboratoire ;

Je tiens à remercier également **Madame Zerrouki K.**, Ingénieur de Laboratoire à La section susnommée, pour ses nombreux conseils et orientations, notamment pour le sérotypage, sa gentillesse et disponibilité ainsi que toute l'équipe du service.

A **Monsieur Ben Abdelkader M.**, Chef de Service des milieux de culture à l'Institut Pasteur d'Alger et toute son équipe, pour leur disponibilité et leur rigueur dans la préparation des milieux de culture spécialement destinés à ce travail.

Aux Docteurs Vétérinaires, **Reguieg Abdelkrim**, **Kari Hamid** et **Benzerga Abdelkader**, vétérinaires inspecteurs des tueries Chiffa, Boufarik et Bougara respectivement, pour m'avoir permis d'effectuer mes prélèvements au niveau des tueries avicoles de leurs communes.

Au **Professeur Georges Daubes**,

Professeur à la Faculté des Sciences Vétérinaires Université de Liège, pour la précieuse documentation qu'il m'a envoyée et d'avoir toujours répondu à mes nombreuses questions.

A mes parents, tout simplement, je vous dis merci, que Dieu vous garde pour moi.

A mon épouse, Nedjma, qui n'a jamais cessé de m'encourager pour finaliser la rédaction de mon mémoire de magistère, qui était toujours présente à mes côtés, avant et après notre mariage, quelle trouve ici tous mes remerciements les plus chaleureux.... Merci ma chère femme.

A ma maman ; si tu étais un astre, tu serais l'étoile polaire : unique, reconnaissable entre toutes, infaillible point de repère, toujours là pour éclairer mon chemin quel qu'il soit. Heureusement, tu es là pour veiller sur moi chaque jour et, m'apprendre à voler de mes propres ailes, mais toujours indispensable à mon équilibre. Avec toute mon admiration et tout mon amour, merci.

A toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

## TABLES DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	13
1. GENERALITES SUR LE GENRE SALMONELLA	15
1.1. Historique	15
1.2. Taxonomie et évolution de la nomenclature	16
1.3. Caractères bactériologiques	21
1.3.1. Caractères morphologiques	21
1.3.2. Caractères cultureux	21
1.3.2.1. La température	22
1.3.2.2. Le pH	22
1.3.2.3. L'activité de l'eau (Aw)	23
1.3.2.4. Autres paramètres	23
1.4. Caractères biochimiques	24
1.5. Caractères antigéniques	25
1.5.1. Antigène de la paroi ou antigène somatique O	26
1.5.2. Antigène flagellaire H	28
1.5.3. Antigène d'enveloppe ou antigène capsulaire K	29
1.5.4. Schéma de Kauffmann-White, détermination et classification des sérovars	30
2. LES SALMONELLOSES	34
2.1. Généralités	34
2.2. Clinique	35
2.2.1. Chez l'homme	35
2.2.1.1. Les formes septicémiques	36
2.2.1.2. Les formes extra digestives localisées	37
2.2.1.3. Les formes purement digestives	37
2.2.2. Chez la volaille	40
2.2.2.1. Symptômes	41
2.2.2.2. Lésions	42
2.3. Epidémiologie	42
2.3.1. Chez la volaille	43
2.3.2. Sur les carcasses de poulet	50

2.4.	Sources et transmission	52
2.4.1.	Sources de contamination	52
2.4.1.1.	Au niveau des couvoirs	52
2.4.1.2.	Au niveau des élevages	52
2.4.1.3.	Au niveau de l'abattoir	54
2.4.2.	Transmission	56
2.4.2.1.	Transmission verticale	56
2.4.2.2.	Transmission horizontale	57
2.5.	Prophylaxie	57
2.5.1.	Prophylaxie sanitaire	57
2.5.2.	Mesures générales d'hygiène	58
2.5.3.	Système de surveillance en Algérie	58
3.	METHODES DE DETECTION ET DE CARACTERISATION	61
3.1.	Techniques classiques de détection	61
3.1.1.	La première étape	61
3.1.2.	La deuxième étape	61
3.1.3.	Troisième étape	62
3.1.4.	L'étape de confirmation	62
3.2.	Méthodes microbiologiques de référence	62
3.3.	Nouvelles techniques de détection de <i>Salmonella</i>	63
3.4.	Méthodes de caractérisation des souches de <i>Salmonella</i>	63
3.5.	Méthodes alternatives	68
3.5.1.	Lysotypie	68
3.5.2.	Méthodes immunologiques	68
3.5.3.	Méthodes moléculaires	69
3.5.3.1.	Electrophorèse des protéines	69
3.5.3.2.	Méthodes génotypiques	69
3.6	Conclusion	70
4.	PARTIE EXPERIMENTALE	71
4.1.	Problématique et objectifs	71
4.2.	Cadre de l'étude	72
4.3.	Matériels et Méthodes	73
4.3.1	1 <sup>ère</sup> Etape : Sur le terrain	73
4.3.1.1.	L'échantillonnage	73
4.3.1.2.	Fiche d'enquête/abattage	74
4.3.1.3.	Prélèvements	74
4.3.2.	2 <sup>ème</sup> Etape : Au laboratoire	77
4.3.2.1.	Protocole d'analyse des prélèvements	77
4.3.2.2.	Méthodes d'analyses bactériologiques pour la recherche des Salmonelles	78
4.3.2.2.1.	Méthode d'analyses bactériologiques classique	79
4.3.2.2.1.1.	Prise d'essai et pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide	
4.3.2.2.1.2.	Enrichissement en milieux sélectifs liquides	79
4.3.2.2.1.3.	Isolement sur milieux sélectifs solides	79
4.3.2.2.2.	Méthode alternative ISO 16 140	81

4.3.2.2.2.1.	Prise d'essai et pré-enrichissement	82
4.3.2.2.2.2.	Enrichissement en milieux sélectif liquide et semi solide	82
4.3.2.2.2.3.	Isolement sur milieux sélectifs solides	83
4.3.2.3.	Identification biochimique	86
4.3.2.4.	Identification sérologique des salmonelles isolées	86
4.3.2.4.1.	Technique	86
4.3.2.4.2.	Interprétation	88
4.3.2.5.	Étude de la sensibilité aux antibiotiques	91
4.3.2.5.1.	Antibiotiques testés	91
4.3.2.5.2.	Technique	91
4.3.2.5.3.	Lecture	92
4.3.2.6.	Conservation des souches de salmonelles	92
4.4.	Base de données	93
4.5.	Résultats	94
4.5.1.	1 <sup>ère</sup> étape : Enquête sur terrain	94
4.5.2.	2 <sup>ème</sup> étape : Résultats du laboratoire	95
4.5.2.1.	Méthode Classique	95
4.5.2.1.1.	Résultat des isolements	95
4.5.2.1.2.	Résultat de la galerie bichimique par type de prélèvement et milieu d'isolement	97
4.5.2.2.	Méthode altarnative	101
4.5.2.2.1.	Résultat des isolement sur milieux chromogénique RAPID' <i>Salmonella</i>	101
4.5.2.2.2.	Résultat de la galerie bichimique par type de prélèvement.	102
4.5.2.3	Résultats de l'identification sérologique	104
4.5.2.3.1.	Résultats du sérotypage des isolats de salmonelles par la méthode classique	104
4.5.2.3.2.	Résultats du sérotypage des isolats de salmonelles par la méthode alternative	107
4.5.2.4.	Étude de la sensibilité des sérotypes isolés aux antibiotiques	110
4.6.	Discussion	111
CONCLUSION		120
RECOMMANDATIONS		122
APPENDICE		131
A.	Fiche d'enquête/abattage	123
B.	Matériel	125
C.	Liste des abréviations	127
D.	Textes réglementaires spécifiques aux salmonelloses aviaires	129
E.	Publication	130
F.	Identification biochimique	136
REFERENCES		144

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Représentation schématique de l'Ag O sur le LPS	27
Figure 2.1	Cycle de diffusion des salmonelles dans l'environnement	57
Figure 2.2	Schéma du système d'information en surveillance sanitaire vétérinaire	60
Figure 3.1	Méthode de référence ISO 6579	64
Figure 4.1	Répartition des tueries avicoles échantillonnées sur le territoire de la wilaya de Blida	73
Figure 4.2	Prélèvements de l'eau d'échaudage dans des flacons stérile	75
Figure 4.3	Prélèvements de peau de cou dans des boites de Pétri stériles ou sachets stériles	75
Figure 4.4	Aspect des colonies de <i>Salmonella</i> sur milieu XLD (à gauche) et milieu Hektoen (à droite)	80
Figure 4.5	Diagramme d'analyse selon la méthode alternative ISO 16 140	81
Figure 4.6	Zone de migration de <i>Salmonella</i> sur milieu MSR/V (à gauche : positif, à droite : négatif)	83
Figure 4.7	Préparation du milieu MSR/V	83
Figure 4.8	Ensemencement du milieu MSR/V	83
Figure 4.9	Principe du milieu chromogène	84
Figure 4.10	Différence de couleur des colonies sur RAPID' <i>Salmonella</i>	84
Figure 4.11	Colonies caractéristiques de salmonelles sur milieu RAPID' <i>Salmonella</i>	85
Figure 4.12	Diagramme comparatif de la méthode classique et la méthode Alternative	85
Figure 4.13	Test des sérums polyvalents OMA et OMB	87

		10
Figure 4.14	Aspect d'une réaction négative (à gauche) et d'une réaction positive (à droite) d'une agglutination sérologique sur lame	89
Figure 4.15	Diagramme du mode opératoire de l'identification sérologique de <i>Salmonella</i>	89
Figure 4.16	Schéma du sérotypage	90
Figure 4.17	Antibiogramme : à gauche : ensemencement, à droite : résultats de la lecture après 24h	92
Figure 4.18	Fréquence des salmonelles par type de prélèvement isolées par la méthode classique	105
Figure 4.19	Fréquence d'isolement des sérotypes par la méthode classique	105
Figure 4.20	Fréquence d'isolement des sérotypes par la méthode alternative	107
Figure 4.21	Fréquence des isollements par les deux méthodes, classique et alternative	109
Tableau 1.1	Classification des espèces et des sous-espèces du genre <i>Salmonella</i> , l'habitat de la majorité des sérovars isolés et leur nombre selon la 9 <sup>ème</sup> édition des formules antigéniques	19
Tableau 1.2	Différents groupes épidémiologiques du genre <i>Salmonella</i>	20
Tableau 1.3	Formules antigéniques des sérovars de <i>Salmonella enterica</i> les plus fréquentes	33
Tableau 4.1	Répartition des prélèvements pendant la 1 <sup>ère</sup> visite	76
Tableau 4.2	Répartition des prélèvements pendant la 2 <sup>ème</sup> visite	76
Tableau 4.3	Récapitulatif des pools de prélèvements des dix lots étudiés	78
Tableau 4.4	Interprétation des tests biochimiques pour la recherche de <i>Salmonella</i> sur une galerie classique	92
Tableau 4.5	Résultats de la fiche d'enquête/abattage	94
Tableau 4.6	Nombre de boîtes de pousse préemptive de <i>Salmonella</i> sur Milieu Hektoen par type de prélèvement	95
Tableau 4.7	Nombre de boîtes de pousse préemptive de <i>Salmonella</i> sur Milieu XLD par type de prélèvements	96
Tableau 4.8	Récapitulatif du nombre de boîtes de pousse préemptive de <i>Salmonella</i> sur Hektoen et XLD par type de prélèvements	96

		11
Tableau 4.9	Nombre de colonies présomptives sur Hektoen et XLD par type de prélèvement.	97
Tableau 4.10	Résultats de la galerie biochimique des colonies présomptives <i>Salmonella spp.</i> isolées de l'eau d'échaudage sur Hek et XLD	97
Tableau 4.11	Résultats de la galerie biochimique des colonies présomptives <i>Salmonella</i> sur Hektoen et XLD isolées des peaux de cou	98
Tableau 4.12	Résultats de la galerie biochimique des colonies présomptives <i>Salmonella</i> isolées des caeca	98
Tableau 4.13	Récapitulatif de la galeri biochimiques par lots et type de prélèvements	99
Tableau 4.14	Récapitulatif de nombre de salmonelles confirmées par galerie biochimique selon les deux milieux Hektoen et XLD	99
Tableau 4.15	Récapitulatif de nombre de vrais et faux positifs par type de prélèvement	100
Tableau 4.16	Récapitulatif du nombre de <i>Salmonella</i> isolées par type de prélèvement par la méthode classique	100
Tableau 4.17	Nombre de boites de pousse caractéristique de <i>Salmonella</i> sur milieu chromogénique RAPID' <i>Salmonella</i> par type de Prélèvements	101
Tableau 4.18	Nombre de colonies caractéristique de <i>Salmonella</i> de couleur magenta isolées sur milieu RAPID' <i>Salmonella</i> par type de prélèvement	101
Tableau 4.19	résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de <i>Salmonella</i> isolées de l'eau d'échaudage	102
Tableau 4.20	Résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de <i>Salmonella</i> isolées des peaux de cou	102
Tableau 4.21	Résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de <i>Salmonella</i> isolées des caeca	103
Tableau 4.22	Récapitulatif de la galerie biochimiques des salmonelles par lots et type de prélèvements	103
Tableau 4.23	Récapitulatif de nombre de vrais et faux positifs par type de prélèvement	104
Tableau 4.24	Récapitulatif de isolats de salmonelles confirmées par les deux Méthode	104

Tableau 4.25	Sérotypage de salmonelles isolées par type de prélèvement	104
Tableau 4.26	Récapitulatif du sérotypage des isolats, par visite, lot et type de prélèvement isolés par la méthode classique	106
Tableau 4.27	Sérotypage des isolats de salmonelles par type de prélèvement	107
Tableau 4.28	Récapitulatif du sérotypage des isolats par visite, lot et type de prélèvement isolés par la méthode alternative	108
Tableau 4.29	Nombre total des sérotypes isolés par les deux méthodes	109
Tableau 4.30	Caractéristiques de l'antibio-résistance des sérotypes isolés	110

## INTRODUCTION

La fonction d'abattage des produits avicoles en Algérie apparaît complexe et fait intervenir une multitude de circuits et d'agents. En effet, outre les abattoirs des entreprises publiques dont la part de marché est modeste, l'abattage dans les tueries privées implique un nombre important et varié d'opérateurs (grossistes, collecteurs - livreurs) qui évoluent dans le cadre de circuits informels. Le potentiel d'abattage du poulet de chair en Algérie est estimé à 334 000 tonnes de viandes blanches par an, dont 93% est pris en charge par le circuit privé [1].

Le prix ainsi que la qualité nutritionnelle de la viande de volaille en font un produit attractif pour le consommateur ; cependant, cette viande s'est révélée une des principales causes de nombreux cas de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC), souvent liées aux mauvaises conditions d'hygiène dans certains abattoirs et tueries avicoles. Ces structures, échappent souvent aux contrôles sanitaires, constituant ainsi un danger potentiel pour la santé publique. Par ailleurs, la viande de volaille constitue le réservoir principal du germe *Salmonella spp.* qui est pathogène pour l'Homme.

La Direction des Services Vétérinaires note depuis ces trois dernières années la recrudescence de foyers de salmonelloses dus à *Salmonella* Enteritidis (SE), espèce pathogène pour l'Homme, par rapport au sérotype Pullorum Gallinarum (SPG) qui est non pathogène pour l'Homme, le sérotype SE est la cause principale de nombreux cas de Toxi-infections Alimentaires Collectives d'origine bactérienne [2, 3, 4].

Cette situation inquiétante ainsi que l'importance économique et sanitaire de cette pathologie nous ont incités à nous intéresser à l'étude du germe *Salmonella* chez le poulet de chair produit au niveau des tueries avicoles de la wilaya de Blida.

Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectif principal lors de ce travail, de caractériser le germe *Salmonella* chez le poulet de chair, destiné à la consommation, au niveau des tueries avicoles de cette wilaya.

Dans cette perspective nous avons utilisé au laboratoire une méthode alternative à la méthode classique de routine, validée ISO 16 140, pour l'isolement et la caractérisation des salmonelles.

## CHAPITRE 1

### GENERALITES SUR LE GENRE SALMONELLA

#### 1.1. Historique :

L'histoire des *Salmonella*, depuis l'isolement de la première souche jusqu'à la compréhension du groupe et des inter-relations entre ses membres, est longue et compliquée et s'étale sur une période de plus de 50 ans [1].

En 1880, Eberth mis en évidence le premier bacille typhique à partir de coupes de rate et de ganglions lymphatiques prélevés d'un malade mort de fièvre typhoïde [2; 3 ; 4; 5]. Actuellement *Salmonella Typhi*, il a été connu sous l'appellation d'*Eberthella typhosa* [2]; Gaffky en réussit la culture en 1884 [5].

Le nom *Salmonella* fût, pour la première fois évoqué par Lignières en l'an 1900, en reconnaissance aux travaux menés par le bactériologiste américain Daniel Elmer Salmon (1850-1914). En collaboration avec Smith, ce dernier décrivit en 1886 aux États-Unis, l'agent causal de « Hogcholera », *Bacterium suipestifer* appelé par la suite, *Salmonella Choleraesuis* [6; 1; 5; 7].

En 1888, Gærtner isola *Bacterium enteritidis* (actuellement, *Salmonella Enteritidis*), à l'occasion d'une épidémie de gastro-entérite [8], à partir de la viande d'une vache abattue d'urgence ainsi que des organes d'un être humain ayant consommé cette viande avariée et mort 36 heures après [6; 1; 5; 11; 12].

En 1892, Loeffler isola *Salmonella Typhimurium* à partir du rat [1].

De Nobelé l'isola à la suite d'un cas d'intoxication alimentaire chez l'homme, en 1898 [13; 14]. À cette époque, la rareté des caractères permettant le diagnostic différentiel avec d'autres bacilles a mis en doute toutes les observations précédentes ; ce n'est qu'en 1896 que Pfeiffer et Kolle d'une part et Gruber et Durham d'autre part, montrèrent que le sérum d'un animal immunisé par une culture de bacille typhique acquérait des propriétés agglutinantes pour celle-ci.

En Juin de la même année, Widal à Paris et Grunbaum à Londres, découvrirent indépendamment que les sérums de malades atteints de fièvre typhoïde agglutinaient les cultures de bacilles typhiques ; ce fût la naissance du sérodiagnostic (test de Widal).

Par ailleurs, et au courant de la même année, Achard et Bensaude attribuèrent l'appellation de bacilles paratyphiques aux bactéries isolées de malades développant un syndrome typhique mais avec un sérodiagnostic de Widal négatif. La même observation fût décrite par Gwynn en 1898 [5].

L'analyse des antigènes somatiques et flagellaires appelés respectivement O et H par Weil et Felix en 1918, se basa sur la méthode d'absorption des agglutinines développée par Castellani en 1902 [5;15]. En 1922, Andrews démontra que les antigènes flagellaires pouvaient exister dans une même culture sous deux spécificités différentes [5].

L'antigène d'enveloppe Vi dont la présence peut masquer l'agglutinabilité de l'antigène somatique O, fût découvert en 1934 chez *Salmonella* Typhi par Felix et Pitt [5 ; 14 ; 15 ; 16].

En se basant sur l'identification des facteurs antigéniques, White établi en 1925 les premières règles de la classification des souches de *Salmonella* ; ce travail fût repris et amélioré par Kauffmann dès 1930 et est, jusqu'à ce jour, connu sous l'appellation de schéma de Kauffmann-White [1; 5; 6].

## 1.2. Taxonomie et évolution de la nomenclature :

La nomenclature du genre *Salmonella* est complexe et ne cesse d'évoluer ; toutefois, une uniformité dans cette nomenclature s'impose afin qu'une communication s'établisse entre les scientifiques, les organismes de santé et le public [17 ; 18].

Selon la seconde édition du *Bergey's manual of systematic bacteriology* La classification des *Salmonella* est la suivante [23 ; 19] :

Domaine : Bacteria.

Embranchement XII ou phylum BXII : Proteobacteria.

Classe III : Gammaproteobacteria.

Ordre XII : Enterobacteriales.

Famille I : *Enterobacteriaceae*.

Genre XXXII : *Salmonella*.

En raison de leur importance en pathologie, l'ancien système de nomenclature a arbitrairement attribué des noms d'espèces aux premières souches isolées [20] et les sous-espèces étaient considérées comme des sous-genres [21].

En effet, en 1975 [22] Kauffmann avait décrit sur la base de quelques caractères biochimiques, quatre sous-genres qu'il avait appelés I, II, III, IV ; le sous-genre III correspondant aux bactéries appelées autrefois *Arizona hinshawii* aux États-Unis [15].

Il a été ultérieurement démontré que ces sous-genres avaient en réalité le rang taxonomique de sous-espèces et que le sous-genre III comprenait deux sous-espèces, les *arizonae* monophasiques et les *diarizonae* diphasiques ; Pour ne pas bouleverser la nomenclature de Kauffmann, elles ont été respectivement dénommées IIIa et IIIb [5 ; 15].

Suite aux travaux dirigés par Crosa et *al.* en 1973 [7 ; 23 ; 24], le genre *Salmonella* comptait une seule espèce : *Salmonella choleraesuis*, actuellement *Salmonella enterica*, dans laquelle 7 sous-espèces ont été individualisées à la base de caractères phénotypiques et génomiques [20 ; 23] ; l'appellation *enterica* qui prête moins à confusion, puisque *choleraesuis* est aussi le nom d'un sérovar (*Choleraesuis*), a été proposée en 1987 par Le Minor et Popoff [24 ; 25] et reprise par Euzéby en 1999 [3 ; 4 ; 7 ; 9].

Bien que non encore publiée, cette proposition a été largement adoptée par certains pays [26].

Les résultats de recherches en taxonomie basées principalement sur les hybridations ADN-ADN, ont ultérieurement montré, que le genre *Salmonella* comprenait deux espèces génomiques (Tableau 1.1) : *Salmonella enterica*, la plus fréquente, est subdivisée sur la base de caractères biochimiques, en 6 sous-espèces :

- *Salmonella enterica subsp. enterica*,
- *Salmonella enterica subsp. salamae*,

- *Salmonella enterica subsp. arizonae*,
- *Salmonella enterica subsp. diarizonae*,
- *Salmonella enterica subsp. houtenae*,
- *Salmonella enterica subsp. Indica*,

Correspondant respectivement aux anciens sous-genres I, II, IIIa, IIIb, IV et VI), et *Salmonella bongori*, espèce rare (ex-sous-genre V) [3; 8 ; 15 ; 26 ; 28] et infestant les animaux à sang froid mais rarement les humains, a été pour la première fois isolée chez un lézard, au Bongor, ville située dans le désert tchadien [18].

Jusqu'en 2005, l'officialisation des appellations *enterica* et *bongori*, de même que la validation de la description d'une possible nouvelle espèce, *Salmonella subterranea* isolée d'un sédiment acide et proposée en mai 2004 par Shelobolina et al., n'ont pas été effectuées par les instances *ad hoc* de la taxonomie internationale [03].

Récemment, il a été démontré que l'organisme dit « *Salmonella subterranea* », n'appartient pas en fait, au genre *Salmonella* [21].

La sous-espèce I ou *Salmonella enterica subsp. enterica*, seule pathogène pour l'homme et les animaux à sang chaud [5 ; 20], renferme près de 60% des souches isolées [21] ; on parle de sérovars. Pour les différencier des espèces et des sous-espèces, ils ne doivent plus être écrits en italique, mais en caractères romains et la première lettre est une majuscule [15 ; 27 ; 32].

Considérant chaque sérovar comme une espèce à part entière, Kauffmann proposa des noms [3 ; 4] qui s'écrivirent en italique ; c'est ainsi qu'initialement, les sérovars ont été désignés soit par la nature de leur pouvoir pathogène : Typhi, Paratyphi, Enteritidis ; soit par leur spécificité zoologique : Typhimurium, Abortusovis, Bovismorbificans isolés respectivement à partir des rongeurs, des avortons de brebis et des bovins [15 ; 24].

Tableau 1.1: Classification des espèces et des sous-espèces du genre *Salmonella*, l'habitat de la majorité des sérovars isolés et leur nombre selon la 9<sup>ème</sup> édition des formules antigéniques, 2007 [21].

Espèces	<i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmnella bongori</i>
Sous-genre de Kauffmann	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Sous - espèces	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Habitat	Homme et animaux à sang chaud	Environnement et animaux à sang froid					
Nombre de sérovars	1531 (~60%)	505	99	336	73	13	22
	2557 (~99%)						
	2579						

Le système de nomenclature se voit modifié à la suite notamment de l'isolement du sérovar Typhimurium à partir de tous les animaux à sang chaud, y compris l'homme [15] ; cette ubiquité a fait que tous les sérovars de la sous-espèce I connus après 1966 [24 ; 31], ont été désignés par le nom du lieu où ils ont été isolés pour la première fois : Heidelberg, Panama...etc. [8 ; 5 ; 15 ; 27, 33].

Il serait par ailleurs, illogique d'abandonner les noms donnés aux sérovars de la sous-espèce I pour les remplacer par des formules antigéniques (ce qui serait en accord avec les règles de nomenclature classique des autres espèces bactériennes dont les sérovars n'ont pas de noms particuliers), puisqu'ils sont rentrés dans le langage médical [3 ; 5 ; 15].

L'usage courant préconise une forme de nomenclature abrégée pour les seuls sérovars de la sous-espèce I ; par exemple, le sérovar Typhimurium s'écrit *Salmonella* Typhimurium ou S.Typhimurium alors que conformément au code international de nomenclature bactérienne, il devrait s'écrire *Salmonella enterica subsp.enterica* sérovar Typhimurium [6; 4; 15; 21; 35]. Les sérovars classés dans les autres sous-espèces de l'espèce *enterica* ainsi que ceux appartenant à l'espèce *bongori*, sont désignés par leurs formules antigéniques [21 ; 35 ; 32].

Au sein du genre *Salmonella*, différents sérovars se distinguent et constituent du point de vue épidémiologique, trois groupes (Tableau 1. 2) :

Tableau 1. 2 : Différents groupes épidémiologiques du genre *Salmonella* [03].

Sérovars	Spécifiques à un hôte particulier		Ubiquites
	Homme	Espèces animales	
	Typhi. Paratyphi A, B, C Sendai	Abortusovis. Abortusequi. Gallinarum. Typhisuis ...	Multiplés dont Typhimurim. Enteritidis. Heidelberg. Infantis ...
Répartition	Pays en voie de développement	Mondiale	
A l'origine	Typhoïde, paratyphoïde	Salmonelloses animales	Toxi-infection alimentaires

- Les sérovars responsables des formes les plus sévères de salmonelloses : les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes avec diffusion septicémique, strictement adaptés à l'homme. Ils se rencontrent principalement dans les pays en voie de développement (Afrique et Extrême-Orient). Ce sont : Typhi, Paratyphi A, B ou C et Sendai, appelés « *Salmonella* majeures » [8; 30].

Ils sont exclusivement transmis à l'intérieur de l'espèce humaine, par l'intermédiaire de l'eau de boisson ou d'aliments souillés par les déjections provenant de malades ou de porteurs sains [5; 25 ; 30].

- Les sérovars spécifiques à une espèce animale particulière : Abortusovis chez les ovins, Abortusequi chez les chevaux, Gallinarum/Pullorum chez les volailles [27 ; 15], Dublin chez les bovins et Choleraesuis et Typhisuis chez les porcs ; néanmoins, certains (Dublin et Choleraesuis) se transmettant par les aliments, peuvent être pathogènes pour l'homme [6 ; 8].

L'adaptation des sérovars de ces deux premiers groupes à un hôte particulier, les rendant particulièrement auxotrophes [30; 3; 5], serait liée à un déterminisme génétique [36].

- Les sérovars agents de Toxi-Infections Alimentaires (TIA) : ubiquistes et majoritaires, ils traversent la barrière espèce d'où une répartition mondiale et de très nombreux hôtes possibles.

Acteurs d'une gastro-entérite, ils sont également appelés « *Salmonella* mineures » ou *Salmonella* non typhoïdiques [27 ; 20]. Ils sont prototrophes [05].

### 1.3. Caractères bactériologiques :

Selon la seconde édition du *Bergey's manual of systematic bacteriology*, *Salmonella* est le 32<sup>ème</sup> genre sur les 41 que compte la famille des *Enterobacteriaceae* [17 ; 18] dont elle possède les principaux caractères [36].

#### 1.3.1. Caractères morphologiques :

Les *Salmonella* sont des bacilles de 2 à 3 µm par 0.6 à 0.8 µm [3], à Gram négatif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs [15 ; 37], habituellement mobiles suivant un trajet sinueux [38] au moyen d'une ciliature péritriche à l'exception de sérovars d'origine aviaire, *S. Gallinarum* [36] et *S. Avium*, de rares mutants paralysés dont les flagelles sont immobiles, ainsi que de mutants dépourvus de flagelles de sérovars normalement mobiles [5].

La longueur des flagelles dépend des conditions de culture et peut atteindre 20 µm, le diamètre moyen est de 20 nm et la longueur d'onde des ondulations 2.3 µm [39].

Les pili communs ou fimbriæ, appendices externes, sont des composants responsables du pouvoir d'adhésion des *Salmonella* aux cellules eucaryotes hôtes [20 ; 39 ; 40].

#### 1.3.2. Caractères culturaux :

Les *Salmonella* sont chimiotrophes [37 ; 4] et majoritairement prototrophes ; celles qui sont auxotrophes appartiennent essentiellement aux sérovars dont le pouvoir pathogène est restreint à un hôte particulier [30; 3; 5].

Leur culture est possible sur des milieux nutritifs ordinaires à base d'extraits de viande [3 ; 15]. Après 24h d'incubation à 37°C, la culture sur la gélose Hektoen dont le pouvoir inhibiteur vis-à-vis des autres germes résulte de sa teneur en sels biliaries, donne des colonies de *Salmonella* présomptives bleues ou vertes alors que la culture sur la gélose Xylose-Lysine-Décarboxylase donne des colonies

roses [28] ; sur ces deux milieux sélectifs, les colonies productrices de H<sub>2</sub>S y présentent un centre noir plus ou moins volumineux [15]. Elles ont un diamètre de 3 à 4 mm, mais certaines peuvent être naines soit exceptionnellement à la suite de mutations [05], soit de manière constante chez certains sérovars : Abortusovis, Typhisuis [22; 38; 41] et Abortusequi [20 ; 22] ; elles sont, dans la majorité des cas, bombées, lisses [ou smooth, S en abrégé], brillantes, rondes à bords nets.

En milieu liquide, elles donnent une culture homogène sur toute la hauteur du tube [15].

La croissance des *Salmonella* est favorisée lorsque des valeurs optimales des paramètres suivants sont réunies [8] :

#### 1.3.2.1. La température :

Les *Salmonella* sont mésophiles ; leur croissance est optimale entre 35 et 37°C [43 ; 20], reste possible de + 5 à + 46°C, ralentie mais significative entre + 5 et + 10°C [28]. Les températures de réfrigération  $\leq$  + 5°C bloquent leur multiplication [44; 37] mais permettent leur survie. Néanmoins, D'aoust a conclu qu'elles peuvent proliférer dans les viandes fraîches à 2°C pendant 6 jours et dans les oeufs, à 4°C pendant 10 jours [43].

La congélation ou la surgélation provoque une réduction du nombre de *Salmonella* sans pour autant en assurer leur disparition [3; 20; 37]. Les plus basses températures de croissance rapportées sont 5.3°C pour *S. Heidelberg* et 6.2°C pour *S. Typhimurium* [08].

Non sporulées, elles sont relativement sensibles à la chaleur [36] ; dans le lait, une pasteurisation (72°C/15s) suffit pour les détruire [8; 20; 36; 43; 45]. Elles sont toutefois, plus thermorésistantes quand le pH du milieu se rapproche des valeurs optimales [08] ; Humphrey (1991) l'a démontré avec des souches de *S. Enteritidis* dans le blanc d'oeuf, dont le pH est voisin de 9.2 [20]. Les *Salmonella* disparaissent au bout de 8h d'exposition aux rayons solaires [46].

#### 1.3.2.2. Le pH :

Les *Salmonella* sont capables de se multiplier dans une plage de pH allant de 3.8 à 9.5 [6 ; 28 ; 36] avec un optimum entre 6.6 et 8.2 [8]. Certains auteurs rapportent

une valeur minimale de pH égale à 4.05 [8; 43] alors que d'autres l'estime à 4.50 [20]; cette variation dépend du type de l'acide utilisé pour abaisser le pH [acide citrique, pH min : 4.05 ; acide lactique, pH min : 4.40 ; acide acétique, pH min : 5.04], mais aussi du sérovar : *S. Typhimurium* et *S. Thompson* semblent plus résistantes à la destruction acide que *S. Seftenberg*. Le milieu aérobie semble également favoriser leur croissance à des pH acides [8] ; en définitif, il a été observé une croissance de *Salmonella* à un pH de 4.1 lorsque le reste des paramètres sont les plus favorables [31]. Ce paramètre revêt un intérêt particulier avec l'apparition de toxi-infections alimentaires liées à la consommation de mayonnaises contaminées par *S. Enteritidis* préalablement présente dans les oeufs ; une acidification convenable (utilisation de l'acide acétique ou de l'acide citrique) assurant un pH inférieur à 3.6 aboutit à leur élimination [20].

Selon Lerche, les *Salmonella* contaminant les mayonnaises sont détruites lorsque le pH du milieu est au dessous de 4.0 ; ceci nécessiterait plusieurs jours si le niveau de contamination est élevé et seulement 24h s'il y a présence d'un petit nombre de bactéries [8]. Il importe de noter que l'adaptation ou la survie des *Salmonella* à des pH faibles est nécessaire au rôle pathogène puisque l'infection se produit *via* l'estomac ; à partir d'un pH voisin de 6, *S. Typhimurium* semble traiter ses lésions induites par le suc gastrique en synthétisant des protéines dites «de choc acide » [40], elles sont codées par des gènes spécifiques de tolérance à l'acidité [47].

#### 1.3.2.3. L'activité de l'eau (Aw) :

Les *Salmonella* prolifèrent bien pour des valeurs d'Aw allant de 0.945 [28 ; 44 ; 37] à 0.999 [6 ; 20 ; 36] ; elles peuvent toutefois survivre longtemps dans les produits déshydratés [20]. Leur croissance est inhibée pour des valeurs d'Aw inférieures à 0.94 dans un milieu à pH neutre [8].

#### 1.3.2.4. Autres paramètres :

Généralement, le chlorure de sodium (NaCl) possède des propriétés inhibitrices sur les bacilles à Gram négatif [37]. Les *Salmonella* ne tolèrent pas des concentrations élevées [3 ; 8] ; à 3%, leur croissance est inhibée [47]. Néanmoins,

elles peuvent parfois contaminer les saumures [20 ; 4]. Ces variations dépendent du sérovar mis en cause et de la température de croissance, plus cette dernière se rapproche de la température optimale, plus les *Salmonella* tolèrent des concentrations élevées de NaCl (À 37°C), elles survivent à des concentrations entre 7 et 8%) [43]. *S.Typhimurium* peut survivre à des salinités allant jusqu'à 70g/l [17]. . Certaines épices (Poivre, Carvi, Cumin) ont un effet inhibiteur sur *S. Typhimurium* contrairement à d'autres (Piment rouge, Coriandre) [17].

Les *Salmonella* sont sensibles aux rayonnements ionisants [20 ; 36] avec des doses comprises entre 5 et 7.5 KGray [8 ; 36].

Elles sont d'autant plus sensibles aux nitrites que les valeurs de pH du milieu sont basses [8].

La conservation sous atmosphère modifiée enrichie en dioxyde de carbone inhibe partiellement leur croissance [23 ; 37] ; la présence d'oxygène leur est beaucoup plus favorable [38].

Leur résistance à certains antiseptiques (vert brillant, sélénite de sodium) est utilisée à des fins diagnostiques [38].

*In vivo*, les lipides jouent un rôle protecteur notamment dans le cacao et le chocolat qui entrent dans la préparation de certains produits laitiers [20]. La croissance est inhibée par un effet barrière de la flore microbienne [4] ; au niveau du gros intestin, grâce à l'antagonisme microbien, *Escherichia coli* produit des bactériocines (colicines) qui s'opposent à la prolifération des *Salmonella* [28].

#### 1.4. Caractères biochimiques :

Les *salmonella* possèdent les caractères biochimiques généraux de la famille des *Enterobacteriaceae* :

- Dégradation du glucose par métabolisme fermentatif avec ou sans production de gaz ;
- absence d'oxydase ;
- réduction des nitrates en nitrites ;
- présence d'une catalase [3; 22 ; 33; 44 ; 49].

Le profil biochimique commun à la majorité des souches de *Salmonella* est le suivant:

- Production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir de thiosulfate de sodium (présence d'une thiosulfate réductase) et de citrate de fer inclus souvent, dans la constitution des milieux d'isolement [36] ;
- absence de fermentation du lactose et du saccharose ;
- absence d'uréase, ce qui les différencie des *Proteus* ;
- absence de tryptophane désaminase (TDA), ce qui les différencie des *Providencia*;
- absence de production d'indole, ce qui les différencie des *Edwardsiella* ;
- présence de lysine-décarboxylase (LDC), ce qui les différencie des *Citrobacter* ;
- absence de bêta-galactosidase ;
- utilisation du citrate de Simmons comme seule source de carbone ;
- absence d'acétoïne ;
- présence fréquente d'ornithine-décarboxylase (ODC) ;
- absence d'arginine-déshydrogénase (ADH) [15].

Néanmoins, des exceptions existent pour certains sérovars :

- *S. Seftenberg* peut fermenter le lactose ou le saccharose ;
- les souches appartenant aux deux sous-espèces *arizonae* et *diarizonae* possèdent une bêta-galactosidase et peuvent également fermenter le lactose [44; 20];
- *S. Paratyphi A* ne produit pas de H<sub>2</sub>S, ne possède pas de LDC et n'utilise pas le citrate de Simmons ;
- *S. Typhi* est agazogène, produit peu de H<sub>2</sub>S, ne possède pas d'ODC et n'utilise pas le citrate de Simmons ;
- *S. Choleraesuis*, *S. Heidelberg* [3] et *S. Gallinarum* peuvent ne pas produire de H<sub>2</sub>S [36].

### 1.5. Caractères antigéniques :

Les *Salmonella*, comme toutes les entérobactéries, possèdent trois types d'antigènes [5] hormis l'antigène commun (Enterobacterial Common Antigen :

ECA) appelé antigène de Kunin, présent chez la grande majorité des entérobactéries [44 ; 15], mais aussi chez quelques espèces appartenant à d'autres familles [33] ; non immunogène, sa recherche reste superflue pour être utilisée dans le diagnostic.

Seuls les antigènes somatiques **O**, les antigènes flagellaires **H** et éventuellement, les antigènes capsulaires **K** ont un intérêt diagnostique; ils permettent d'individualiser différents sérovars et sont mis en évidence par agglutination au moyen de sérums spécifiques [15].

#### 1.5.1. Antigène de la paroi ou antigène somatique O :

Du mot allemand **Ohne hauch** qui signifie sans film [8 ; 33 ; 50], l'antigène **O**, est porté par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharidique (LPS), composant majoritaire de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif [3]. Ancrée à la membrane par une structure peptidique rigide [31] qui ne possède aucun rôle antigénique [14], la fraction lipidique du LPS ou lipide A, identique chez toutes les entérobactéries [20] et correspondant à l'endotoxine qui rend le complexe toxique [3; 17; 44] et pyrogène [15; 17]. Il est liée à la fraction polysaccharidique centrale, commune à toutes les *Salmonella*, appelée core ou noyau [31 ; 44]. Ce dernier porte les chaînes latérales spécifiques **O** [31 ; 17] constituées par polymérisation d'unités oligosaccharidiques linéaires ou ramifiées [3 ; 40] et responsables du pouvoir antigénique [17] (Figure 1).

La variabilité de l'antigène **O** propre à chaque sérovar est déterminée par la composition de ces chaînes latérales en osides terminaux et leur enchaînement [47 ; 8 ; 31 ; 33 ; 17] ; au nombre de 2 à 6 [3], l'étude systématique a montré que le glucose et le galactose étaient toujours présents [14]. L'antigène **O** est :

- Thermostable, résiste au chauffage 2h à 100°C ;
- alcoolostable (non détruit par l'alcool à 50%);
- inhibe par le formol à 5‰, sans pour autant empêcher son agglutinabilité [16 ; 15 ; 14].

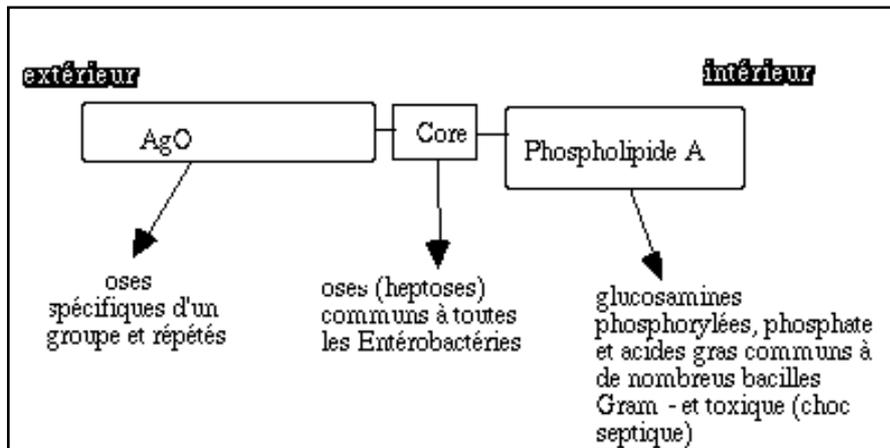


Figure 1.1 : Représentation schématique de l'Ag O sur le LPS [17].

L'agglutination par les sérums correspondants est fine, lente, granulaire et polaire c'est-à-dire difficilement dissociable par agitation puisque les bactéries sont accolées corps à corps par les anticorps [16; 15; 20; 44]. Cette agglutination est spécifique des bactéries en phase S (Smooth) dont les LPS sont complets.

Les modifications par suite de mutation portant notamment sur les chaînes latérales polysaccharidiques (Ag O) s'expriment phénotypiquement en donnant des colonies plates, rugueuses à bord irréguliers ; ces bactéries dites en phase R (Rough) et autoagglutinables en eau salée - NaCl à 20‰ - [22 ; 14] ou en eau physiologique [20], ne possèdent plus de pouvoir pathogène [20 ; 33].

Il est important de distinguer deux types de facteurs antigéniques O :

- **Les facteurs O majeurs**, caractéristiques des sérovars classés dans le tableau de kauffmann-white dans un même sérotype O, tels les facteurs O:2 du sérotype A, O:4 du sérotype B, O:9 du sérotype D,...etc. Ils sont liés à la présence de certains sucres (abéquose pour O:4, tyvélose pour O:9 ...) [3].
- **Les facteurs O mineurs ou accessoires** diffèrent selon les souches appartenant à un même sérotype. Toujours associés à un facteur O majeur, ils peuvent soit :
  - être sans intérêt diagnostique quand ils ne sont pas liés de manière constante à un ou plusieurs facteurs O ; c'est le cas du facteur O:12 qui est présent chez tous les sérovars des groupes A, B et D [5; 20 ; 22; 15].
  - avoir un intérêt de marqueur épidémiologique résultant de la modification du facteur O majeur par une enzyme à déterminisme chromosomique,

comme c'est le cas du facteur O:[5] indiqué entre crochets dans le tableau de *Kauffmann-White* (chez des sérovars du groupe B tel que Typhimurium, le facteur O:[5] résulte de la synthèse d'une acétylase qui ajoute un radical acétyl sur le facteur O:4) ; ou par une information codée soit par un plasmide (cas du facteur O:54) [4], soit plus souvent, par un bactériophage (conversion lysogénique) : c'est le cas, par exemple, du facteur O:1 qui s'écrit souligné [4 ; 34].

### 1.5.2. Antigène flagellaire H :

Du mot allemand **H**auch qui signifie film [8 ; 33 ; 50], l'antigène **H** présent chez les formes mobiles des bactéries, est un polymère de flagelline, la protéine de structure des flagelles [3 ; 27] dont la composition en acides aminés est constante pour un type antigénique [20] ; il est :

- Thermolabile, détruit après chauffage 30 minutes à 100°C ;
- Détruit par l'alcool à 50% [14 ; 44] ;
- Résistant au formol à 5‰. [3 ; 16 ; 14].

En se fixant sur les flagelles, les anticorps anti-**H** induisent rapidement la formation d'agglutinats floconneux et facilement dissociables par agitation car les bactéries sont attachées entre elles par leurs flagelles [14; 38]; ils entravent par conséquent, la mobilité des bactéries [3; 5; 15].

Il existe deux éventualités quant à la spécificité de l'antigène **H** :

- L'une rare : certains sérovars de *Salmonella*, tel que Typhi et Enteritidis, ne peuvent synthétiser la flagelline qu'à partir d'une seule spécificité antigénique ; leur antigène **H** est monophasique.
- L'autre fréquente : la majorité des sérovars de *Salmonella*, tel Typhimurium, sont aptes à exprimer alternativement les deux spécificités de l'antigène **H** ; ce dernier est diphasique [5; 33; 44].

Cette aptitude à exprimer l'antigène flagellaire sous deux spécificités différentes, est particulière aux *Salmonella* des sous-espèces I, II, IIIb, VI ; les sérovars de *Salmonella* de ces sous-espèces qui ont un antigène **H** monophasique sont en

fait, des variants des sérovars diphasiques dont le système de variation de phase est bloqué. L'antigène **H** des sous-espèces IIIa, IV, et V est toujours monophasique [4 ; 15].

Généralement, les deux phases coexistent dans une même colonie [42]. La variation de phase résulte de l'expression alternative de deux gènes de structures distinctes **H1** et **H2** [27 ; 50 ; 49]. À un temps donné, un seul des deux gènes s'exprime ; les flagelles seront soit en phase 1 lorsque la spécificité antigénique **H1** est exprimée, soit en phase 2 lorsque la spécificité antigénique **H2** est exprimée. De manière aléatoire, le gène silencieux s'exprime toutes les 1 000 à 100 000 divisions [3].

### 1.5.3. Antigène d'enveloppe ou antigène capsulaire K :

De nature polysaccharidique, les antigènes **K** entourent la paroi bactérienne et masquent les antigènes **O** les rendant inagglutinables ; ces derniers peuvent être révélés, par solubilisation des antigènes **K** [5 ; 20] sans destruction [14], après chauffage de la suspension bactérienne pendant 30 minutes à 100°C [44] ou 1 heure à 60°C [22; 16; 14].

Le seul qui ait une importance diagnostique est l'antigène **Vi**, pour Virulence ; il existe habituellement chez *S. Typhi*, rarement chez *S. Paratyphi C* isolé essentiellement en Afrique noire et exceptionnellement chez *S. Dublin* isolé chez les bovidés, dans le nord-est de la France [15; 27; 52].

L'antigène **Vi** est résistant à l'action de l'alcool et du formol ; l'agglutination par les sérums correspondants est fine, lente et granulaire [14].

Du mot allemand **Viehl** qui signifie « beaucoup » [38 ; 42], les souches de *S. Typhi* porteuses d'antigènes **Vi** avec **O** inagglutinables sont dites *S. Typhi V* ; celles dépourvues d'antigènes **Vi** avec **O** agglutinables sont dites *S. Typhi W* [5; 42], du mot allemand **Wenig** qui signifie « peu » [38 ; 42]. Les cultures constituées d'un mélange des deux souches sont dites *S. Typhi VW* [5; 42].

### 1.5.4. Schéma de Kauffmann-White, détermination et classification des sérovars :

Les formules antigéniques des différents sérovars de *Salmonella*, identifiables par agglutination, sont retenues dans un tableau connu sous l'appellation de schéma

de Kauffmann-White. Initié par ces deux chercheurs, il a été par la suite revu et complété d'abord par Le Minor, puis par Popoff et dernièrement, par Grimont et weill du *Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les Salmonella* de l'Institut Pasteur, Paris.

Le premier schéma établi par Kauffmann en 1934, répertoriait 44 sérovars ; il en contenait 958 en 1964, 2267 en 1989 et 2555 en 2003 ; le dernier schéma publié en 2007, compte **2579** sérovars différents dont 2557 appartiennent à l'espèce *enterica* et seulement 22 appartiennent à l'espèce *bongori* [72].

Il comprend 4 colonnes :

- La 1ère colonne correspond aux noms donnés aux sérovars ;
- La 2ème colonne est réservée à des chiffres qui indiquent le ou les facteurs de l'antigène **O**, et éventuellement l'antigène **Vi** [5] ;
- La 3ème et la 4ème colonne sont respectivement réservées aux facteurs de l'antigène **H** des phases **1** et **2**.

Quand seul un petit nombre de sérovars était connu, les facteurs antigéniques **H** de la phase considérée comme « spécifique » étaient désignés par des lettres alors que ceux de l'autre phase dite « non-spécifique » étaient désignés par des chiffres. À l'épuisement des lettres de l'alphabet, des chiffres ont été rajoutés à l'appendice de la dernière lettre (z).

Le signe « - » indique que la phase considérée est absente (l'antigène **H** est monophasique).

Les facteurs liés à une lysogénisation sont soulignés [20;15].

Les facteurs **O** accessoires et l'antigène **Vi** indiqués entre crochets, peuvent être présents ou non [24].

Il existe 87 facteurs antigéniques **O** et 96 facteurs antigéniques **H** ; seuls ceux ayant une importance pour le diagnostic sont répertoriés dans ce schéma [24; 27].

Le diagnostic devrait suivre l'ordre logique : Espèce Sous-espèce Sérovar [15]. En pratique, sachant que plus de 60% des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud appartiennent à la sous-espèce *enterica* [3; 15; 28], la détermination de l'espèce et de la sous-espèce ne s'effectue que chez les

souches de *Salmonella* isolées à partir de l'environnement et des animaux à sang froid [15].

L'identification du sérovar par la détermination de sa formule antigénique, obéit à l'ordre suivant en s'aidant du schéma de Kauffmann-White :

- Détermination du facteur antigénique **O** majeur en opérant par ordre de fréquence (par exemple, il est plus fréquent de rencontrer un sérovar faisant partie du sérogroupe B que du sérogroupe G) ; des cas particuliers peuvent se présenter :

- Si la culture possède les caractères biochimiques du sérovar Paratyphi A (absence de LDC et de H<sub>2</sub>S), rechercher directement l'agglutinabilité dans le sérum anti-O:2 caractéristique du groupe A.
  - Si la culture possède les caractères biochimiques du sérovar Typhi (absence de gaz avec présence de H<sub>2</sub>S à l'état de traces), rechercher d'emblée l'agglutinabilité dans le sérum anti-Vi du moment que l'antigène O:9 est souvent masqué par l'antigène **Vi**.
- Détermination si nécessaire, des facteurs antigéniques **O** accessoires, tel le facteur O:[5] du sérogroupe B.
- Détermination des facteurs antigéniques **H** en opérant également dans l'ordre de fréquence des sérovars ; trois cas de figures peuvent se présenter :
- a. La souche possède et exprime une seule spécificité de flagelline ; c'est l'exemple du sérovar Enteritidis.
  - b. La souche possède et exprime alternativement les deux spécificités de l'antigène **H**. Dans ce cas, la population bactérienne est dite équilibrée et la culture est agglutinée par le sérum anti-H de la première phase et par le sérum anti-H de la seconde phase.
  - c. La souche possède les deux spécificités de l'antigène **H**, mais n'exprime qu'une seule. Dans ce cas, la population bactérienne contient une grande majorité de bactéries exprimant l'une des deux phases qui sera facilement identifiée. Pour que les bactéries minoritaires expriment la seconde spécificité inapparente, il faudra réprimer la première spécificité apparente selon la **technique de Sven-Gard dite de l'inversion de phase**.

Par association des déterminants antigéniques **O**, **H** et éventuellement **Vi**, la formule antigénique complète du sérovar est établie et son nom est aussitôt défini à partir du tableau de *Kauffmann-White* [5 ; 15].

Tableau 1.3 : Formules antigéniques de quelques sérovars de *Salmonella enterica* [21, 24].

Sérovar	Antigène O	Antigène H	
		Phase I	Phase II
	<b>Groupe A</b>		
S. Paratyphi A	<u>1</u> , 2, 12	a	-
	<b>Groupe B</b>		
S. Paratyphi B	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2
S. Wien	<u>1</u> , 4, 12, 27	b	1, w
S. Duisburg	<u>1</u> , 4, 12, 27	d	e, n, z15
S. Saint-paul	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 2
S. Derby	<u>1</u> , 4, [5], 12	f, g	-
S. Agona	1, 4, [5], 12	f, g, s	-
S. Typhimurium	<u>1</u> , 4, [5], 12	i	1, 2
S. Bredeney	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	1, v	1,7
S. Brandenburg	<u>1</u> , 4, 12	1, v	e, n, z15
S. Heidelberg	<u>1</u> , 4, [5], 12	r	1, 2
S. Coeln	4, 5, 12	y	1,2
S. Indiana	<u>1</u> , 4, 12	z	1,7
	<b>Groupe C1</b>		
S. Ohio	6, 7	b	1, w
S. Isangi	6, 7	d	1, 5
S. Livingstone	6, 7	d	1, w
S. Braenderup	6, 7, <u>14</u>	e, h	1, 2
S. Montevideo	6, 7, <u>14</u>	g	m, s
S. Thompson	6, 7, <u>14</u>	k	1, 5
S. Infantis	6, 7, <u>14</u>	r	1, 5
S. Virchow	6, 7	r	1, 2
	<b>Groupe C2</b>		
S. Manhattan	6, 8, <u>20</u>	d	1, 5
S. Newport	6, 8	e, h	1, 2
S. Litchfield	6, 8	l, v	1, 2
S. Bovismorbificans	6, 8	r	1, 5
S. Hadar	6, 8	z10	e, n, x
	<b>Groupe D</b>		
S. Panama	<u>1</u> , 9, 12	l, v	1, 5
S. Typhi	9, 12[VI]	d	-
S. Enteritidis	<u>1</u> , 9, 12	g, m	-
S. Dublin	<u>1</u> , 9, 12[VI]	g, p	-
S. Gallinarum Pullorum	<u>1</u> , 9, 12	-	-
	<b>Groupe E</b>		
S. Anatum	3, 10	e, h	1, 6
S. Mleagridis	3, 10	e, h	1, w
S. Senftenberg	<u>1</u> , 3, 19	g, s, t	-
S. London	3, 10	l, v	1, 6
S. Give	3, 10	l, v	1, 7

## CHAPITRE 2

### LES SALMONELLOSES

#### 2.1. Généralités:

Les salmonelloses sont des maladies infectieuses, contagieuses, transmissibles à l'homme et à diverses espèces animales, dues à la présence d'un germe du genre *Salmonella* et de la famille des Enterobacteriaceae [52]. Les salmonelloses peuvent être responsables chez l'homme, selon le sérotype en cause et en fonction de l'état physiologique de l'hôte, d'une simple diarrhée accompagnée ou non de fièvre ou d'une infection généralisée parfois mortelle ou à la simple infection inapparente.

En effet, les salmonelloses sont la première cause de toxi-infection alimentaire dans les pays industrialisés et particulièrement en France [53], où 14 235 souches de salmonelles ont été recensées par le réseau *Salmonella* de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (A.F.S.S.A.) durant l'année 2004.

Les souches se répartissent dans deux secteurs importants:

- le secteur Santé et Productions Animales (animal malade ou porteur sain et environnement de l'élevage) est prédominant avec 74 % de la totalité des souches ;
- Secteur Hygiène Alimentaire (matières premières d'aliments en cours de préparation ou finis destinés à la consommation humaine ou animale, mais aussi les souches isolées de l'environnement d'abattoirs, d'ateliers de découpe et de transformation) avec 24 % et enfin 3 % provenant de l'écosystème naturel (eau de mer, eau de rivière, boues et stations d'épuration).

Le recensement des souches de *Salmonella* en élevage et dans les denrées alimentaires ne préjuge en rien de l'incidence de la maladie chez l'homme.

## 2.2. Clinique:

### 2.2.1. Chez l'homme :

Classiquement, deux types de salmonelloses humaines sont reconnus:

- Les gastro-entérites à salmonelles: C'est un syndrome qui s'exprime suite à l'ingestion d'un aliment contaminé par une souche de *Salmonella* subsp. *Enterica* autres que les sérotypes Typhi, Paratyphi A, B, C et Sendai.

Les signes cliniques sont essentiellement de la diarrhée avec douleurs abdominales, de la fièvre et des nausées, des myalgies, des vomissements et des maux de tête, ils s'expriment après 12 à 36 heures d'incubation et ont une issue habituellement favorable sauf dans de rares cas de personnes en très mauvais état ou enfants très jeunes.

- La fièvre typhoïde ou paratyphoïde: Elle est due à l'ingestion d'un aliment contaminé par une souche de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* appartenant à l'un des sérotypes suivants: *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, B, C et *Salmonella* Sendai.

Le syndrome se caractérise par une incubation de 7 à 28 jours, avec des maux de tête intenses, fièvre élevée et persistante, douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, de la diarrhée (absente chez un cas sur deux), une transpiration abondante, des frissons, des saignements intestinaux et un épistaxis, des taches cutanées blanc rosées et surtout un état de torpeur «Typhos » entrecoupé de périodes de rémission. L'issue peut être fatale. En cas d'issue favorable, la convalescence est longue de plusieurs semaines avec souvent un portage durable.

La classification actuelle, permet de reconnaître les salmonelloses humaines selon leurs sérotypes respectifs et de la susceptibilité des individus infectés, c'est ainsi que la physiopathologie des infections à *Salmonella*, permet de distinguer plusieurs tableaux cliniques.

Selon Carlier et coll. 2001 [53], l'infection qui débute par le tube digestif avec une action destructive de la bordure en brosse de la muqueuse intestinale est à l'origine des symptômes de toxi-infection alimentaire du nourrisson et de l'adulte;

secondairement, l'extension du processus par la traversée de la barrière intestinale et diffusion lymphatique et sanguine, provoquent une septicémie pouvant être cliniquement évidente ou latente, révélée par des formes localisées extra digestives. Ces formes sont classées comme suit par Carlier et coll. (2001) [53]:

#### 2.2.1.1. Les formes septicémiques:

Ce sont des septicémies en très forte régression dans les pays développés (la plupart des cas observés surviennent chez des patients ayant séjourné dans des pays endémiques), du fait de l'amélioration des conditions d'hygiène mais surtout de la qualité des eaux de boisson et la généralisation des traitements des eaux usées.

Dans les pays sous développés, la situation reste préoccupante : Ces infections évoluent sous forme endémique et peuvent provoquer la mort chez les jeunes enfants, les nouveaux nés, les femmes enceintes, les vieillards et les immunodépressifs.

Les formes septicémiques sont en général dues à l'ingestion d'aliments pollués par des eaux usées contaminées par des souches de *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi B, C et *Salmonella* Sendai. Le syndrome septicémique peut s'exprimer aussi chez les nouveaux nés et les jeunes enfants par d'autres sérotypes comme *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Panama et *Salmonella* Wien, avec une fièvre oscillante et élevée, des frissons, une tachycardie, la diarrhée, les douleurs abdominales, les vomissements et altération de l'état général. La septicémie peut aussi avoir un aspect pseudo-typhoïdique avec fièvre constante à 39- 40 °C, céphalées, tymphos, des signes digestifs et un pouls dissocié.

La septicémie peut aussi passer totalement inaperçue, seul un pic thermique isolé peut être signalé.

### 2. 2.1. 2. Les formes extra digestives localisées:

Ce sont des formes considérées comme rares mais de plus en plus observées de nos jours, elles surviennent en général chez des individus immunodépressifs (cancers, greffes d'organes, corticothérapies à long cours, hémopathies malignes, V.I.H.) et succèdent à un épisode septicémique ou à une bactériémie, généralement discret voire inapparent [55]. Les formes les plus fréquentes sont pleuro-pulmonaires, uro-génitales et cardio-vasculaires, arrivent ensuite les atteintes ostéo-articulaires et les formes neuro-méningées, en particulier les méningites purulentes du nourrisson.

### 2.2.1.3. Les formes purement digestives:

Ce sont des gastro-entérites succédant généralement à une contamination massive, elles sont caractérisées par un syndrome digestif (diarrhée et vomissements), associé à des signes infectieux généraux et modérés; Ces manifestations gastro-intestinales sont de loin les épisodes les plus rencontrés chez les individus ayant un système immunitaire normal et sont plutôt communes à la plupart des affections à entérobactéries. L'évolution se fait spontanément vers la guérison en quelques jours du moins chez l'adulte [55]. Ces gastro-entérites sont classées en deux catégories:

#### a. Les gastro-entérites du nourrisson:

Elles s'expriment selon deux aspects:

- des épidémies dans les collectivités tels les crèches ou les hôpitaux ;
- des cas sporadiques isolés.

Elles touchent généralement des enfants dans leur première année et particulièrement entre le troisième et sixième mois. Elles sont provoquées par deux espèces bactériennes: *Escherichia Coli* entéropathogène et les salmonelles ubiquitaires. Elles s'expriment par des diarrhées, des vomissements, de la fièvre élevée et irrégulière, de la déshydratation avec atteinte des voies aériennes et atteintes neuro-méningées avec trouble du comportement.

Les sérotypes en cause sont variés suivant les régions géographiques; L'évolution est favorable si la prise en charge est précoce, les complications sont surtout la manifestation méningoencéphalique et les surinfections.

b. Les Toxi-Infections alimentaires de l'adulte et de l'enfant:

Elles sont dues aux salmonelles ubiquitaires et se distinguent des précédentes par leur fréquence (en constante augmentation), par leur évolution (généralement favorable) et par leurs circonstances de survenue (liées aux denrées alimentaires).

Les Toxi-Infections salmonelliques se déclarent 12 à 24 heures après l'ingestion des aliments contaminés et se caractérisent par les symptômes suivants: Une diarrhée constante (10 à 15 selles par jour), fétide et liquide parfois muco-sanglante, les douleurs abdominales peuvent évoquer de façon trompeuse une urgence chirurgicale. La fièvre est fréquente souvent élevée à plus de 39 °C, accompagnée de frissons et de malaise général. La soif et l'anorexie signent une déshydratation inquiétante chez les vieillards ou les très jeunes enfants.

L'évolution est en règle générale spontanément favorable en trois à cinq jours sans aucun traitement antibiotique. Selon l'expression clinique on distingue:

- Les formes atténuées: maladies peu ou pas symptomatiques qui se limitent à quelques selles diarrhéiques mais d'intérêt épidémiologique car il y a excrétion de salmonelles dans les selles et donc possibilité de contamination de l'entourage.
- Les formes très graves: Elles sont pseudo-cholériques avec fréquence de selles et déshydratation secondaire. Elles peuvent être responsables d'une certaine mortalité (1 %) chez les jeunes enfants ou les vieillards [54].
- Les formes trompeuses: dites pseudo-chirurgicales, car elles sont sporadiques et en absence de données anamnestiques, elles présentent un tableau pseudo appendiculaire avec défense abdominale fébrile nécessitant le recours à un chirurgien.

Ces Toxi-Infections alimentaires de l'adulte et des enfants surviennent selon deux modalités épidémiologiques:

c. Les cas groupés: Toxi-Infections Alimentaires Collectives: T.I.A.C.

C'est la survenue dans un espace de temps et d'espace groupé d'au moins deux cas de Toxi-Infections alimentaires ayant une symptomatologie similaire dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Elles sont à déclaration obligatoire et conduisent à une enquête administrative sous l'égide de la direction de la santé et de la population et la direction des services vétérinaires, la déclaration est obligatoire pour tout médecin qui en a constaté l'existence ou pour le principal occupant, chef de famille ou d'établissement des locaux où se trouve le malade.

Les salmonelles ubiquitaires restent la cause principale des T.I.A.C., déclarées en France (au moins 3 fois sur 4) avec prédominance du sérotype *Salmonella* Enteritidis et une forte progression de *Salmonella* Typhimurium mais aussi *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Senftenberg et *Salmonella* Heidelberg. L'augmentation de *Salmonella* Typhimurium est d'autant plus préoccupante qu'il existe une progression de l'antibiorésistance de ce sérotype [56].

Les aliments les plus fréquemment en cause sont les œufs et les ovoproduits, les viandes et les volailles. L'évolution des T.I.A.C. est généralement bénigne mais peut être grave aux âges extrêmes de la vie et nécessitent l'hospitalisation, parfois associée à une mortalité non négligeable [56].

d. Les cas sporadiques: Toxi-Infections Alimentaires sporadiques.

Elles sont très fréquentes, ainsi aux Etats Unis d'Amérique, leur nombre annuel est de 2 millions avec un nombre de morts estimé entre 500 et 2000 (0,05 à 0,10 %); Les aliments incriminés sont les œufs, les poulets, la viande et d'autres aliments consommés crus [57].

En France, ils sont estimés entre 800 000 et 1 million entre juin et septembre 1997, même si seulement 7 % des cas sont confirmés par des isollements

bactériens [58]. Les sérotypes dominants sont là aussi, *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis avec des pourcentages respectifs de 35 et 34 %, alors que *Salmonella* Hadar ne représente que 7 %.

Il faut signaler que parmi les souches de *Salmonella* Typhimurium isolées en France, comme dans de nombreux pays de l'Europe de l'ouest, il existe une variété prédominante caractérisée par son sous type lysotypique: le type D.T.104 (Definitive Type 104), retrouvé pour plus de 70 % des souches de *Salmonella* Typhimurium isolées.

Cette souche est caractérisée par sa résistance étendue aux antibiotiques usuels, ce qui explique en partie le facteur de risque associé à la prise d'antibiotiques dans le mois précédant l'épisode de diarrhée infectieuse permettant l'implantation plus facile chez ces enfants ayant une flore digestive fragilisée et incapable d'établir une barrière efficace contre les salmonelles [54].

### 2.2.2. Chez la volaille:

Chez la volaille comme chez l'homme, il existe des différences fondamentales dans les relations hôtes – bactéries, la salmonellose peut aller d'une maladie fatale à un portage asymptomatiques [59].

Les volailles sont en général des porteurs sains [60], et l'incidence technicoéconomique du portage en poulet de chair semble être minime, en fait, c'est le rôle des salmonelles dans les toxi-infections alimentaires collectives qui explique leur importance dans la filière.

En effet beaucoup de sérovars (plus de 156 selon ICMSF, 1996) [61], isolés des poules et des canards aux Etats Unis sont largement la source la plus importante des contaminations alimentaires.

Certains sérovars particulièrement *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium, se sont avérés redoutables [61]. Ceci est expliqué par les méthodes de sélection très sévères qui diminuent la diversité génétique et favorisent ainsi la colonisation par quelques sérovars bien adaptés. De la même manière, l'intensification ou l'industrialisation des élevages semblent accentuer le phénomène.

En France, comme en Europe les enquêtes et les différents réseaux de surveillance soulignent en particulier l'important portage salmonellique chez l'animal et la prédominance, toutes espèces confondues, de *Salmonella* Typhimurium, *S. Hadar*, *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Indiana*, *S. Heidelberg* et *S. Infantis* [62 ; 63].

L'extension des salmonelloses ubiquitaires dans les élevages pourrait avoir été favorisée par le vide biologique consécutif à l'éradication de la pullorose et la typhose [93]. Deux sérotypes de salmonelles sont adaptés aux volailles: *Salmonella* sérotype Gallinarum et *Salmonella* sérotype Pullorum et provoquent un syndrome pouvant ravager les élevages [61] une maladie qui revêt un intérêt considérable et une importance économique pour les producteurs de volailles [64].

#### 2.2.2.1. Symptômes:

L'infection par les sérotypes ubiquitaires chez la volaille est surtout associée à la maladie des très jeunes oiseaux. Les signes de sévères infections chez les poussins sont généralement similaires à ceux observés chez les autres salmonelloses aviaires (pullorose et typhose) ou ayant de très étroites analogies avec des signes de maladies septicémiques [65].

La contamination des oeufs par les salmonelles peut mener à un niveau très élevé de mortalité embryonnaire et une mort rapide des poussins nouvellement éclos, avant l'observation de signes cliniques [66]. Les signes de la maladie sont rarement observés après les deux premières semaines de la vie.

La maladie clinique à sérotypes ubiquitaires n'est normalement pas associée aux volailles adultes mais certaines salmonelles par exemple *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium qui sont douées d'un pouvoir invasif et passent dans le système lymphoïde grâce aux macrophages, dans le foie et la rate puis dans le sang et envahissent les organes (ovaires et oviductes) peuvent être responsables de somnolence avec yeux clos, d'anorexie, de retards de croissance, de chutes de ponte, entérites, hépatites et parfois des malformations.

Les animaux très affectés sont regroupés autour des sources de chaleur ; ils présentent une diarrhée liquide profuse. La mortalité est généralement faible mais peut atteindre 10 % des animaux malades [54 ; 67].

Dans la plupart des cas, les volailles sont des porteurs sains ou la maladie évolue sous forme chronique et les salmonelles sont excrétées de façon intermittente.

#### 2.2.2.2. Lésions:

Chez les très jeunes poussins, il y a développement d'une septicémie rapide qui peut causer une très forte mortalité avec peu ou pas de lésions. Quand le cours de la maladie est plus long ou infection à certains sérotypes, on a parfois l'apparition de sévères entérites accompagnées de foyers nécrotiques de la muqueuse de l'intestin grêle. Les caecae, la rate et le foie sont congestionnés (foie bronzé après oxydation à l'air) et tuméfiés avec des suffusions hémorragiques ou des foyers nécrotiques. Les reins sont parfois tuméfiés et congestionnés. On peut également observer des péricardites, des omphalites, des lésions génitales dégénératives et des inflammations pulmonaires, des ovaires et des oviductes [66].

#### 2.3. Epidémiologie :

Les salmonelloses représentent chez l'homme, la source majeure des maladies d'origine alimentaire dans les pays développés, la volaille et les produits d'origine aviaire sont une cause importante de ces toxi-infections alimentaires [69].

Ces dernières sont dues aux salmonelles ubiquistes (n'ayant pas d'hôte particulier), les volailles sont surtout des porteurs sains, mais sont d'une importance considérable pour l'industrie vétérinaire et agro-alimentaire, aussi bien par la maladie qu'ils provoquent pouvant entraîner des pertes économiques considérables (Pullorose- Typhose), que par leur association avec les toxi-infections d'origine alimentaire chez l'homme.

D'autre part, les salmonelles sont universellement répandues géographiquement et chez toutes les espèces animales; elles ont aussi une formidable capacité de résistance aux antibiotiques, amplifiée par la transmission de résistance par des

plasmides. C'est ainsi que différents auteurs parlent de colonisation intestinale très fréquente, particulièrement chez la volaille, mais il reste hasardeux de parler de prévalences précise en raison des variations des résultats selon la région, le plan d'échantillonnage et la méthode d'analyse [68].

### 2.3.1. Chez la volaille:

L'existence d'un fort taux d'infection salmonellique des animaux est un phénomène largement décrit en aviculture.

En Europe, la Commission européenne organise la lutte contre les salmonelles et fixe chaque année des objectifs de prévalence aux différents états membres, l'enquête sur la prévalence des salmonelles dans les élevages de poulet de chair, trois semaines avant leur abattage, menée d'octobre 2005 à septembre 2006 par l'European Food Safety Authority (EFSA), montre que la prévalence moyenne de *Salmonella* spp. s'élève à 23,7 %. Mais les taux varient considérablement selon les états membres.

Ainsi, alors que la prévalence est nulle en Suède, elle s'élève à un maximum de 68,2 % en Hongrie. Des pourcentages importants sont également notés en Pologne (58,2 %), au Portugal (43,5 %), en Espagne (41,2 %), Grèce (17,3 %), Tchéquie (16,1 %). La France présente une prévalence de 6,2 %. L'enquête fait apparaître qu'un élevage sur quatre en moyenne est contaminé par au moins une salmonelle. Les sérovars les plus souvent retrouvés dans les élevages positifs sont *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka* et *S. Hadar* [69].

Dans une autre étude au niveau de tous les états membres de l'Union européenne, *Salmonella* est signalée en 2005 chez des espèces animales variées. Cependant les isollements les plus fréquents proviennent des volailles [70].

En effet, le programme de contrôle obligatoire des salmonelles en élevages de volailles (*Gallus gallus*), assure des données relativement comparables à l'intérieur de la communauté européenne.

Environ 5 % des parentaux d'élevages de poulets de chair sont trouvés infectés de salmonelles en 2005. La prévalence observée chez le poulet de chair est comprise entre 0 % et 18 % [70]. Ces chiffres sont obtenus par différents programmes d'études et de surveillance et reflètent donc les différences entre les schémas d'échantillonnage et de prélèvements utilisés et démontrent l'utilité d'une harmonisation des protocoles pour comparer les résultats d'un pays à un autre [70 ; 71].

Dans un article de synthèse, Van Immerseel et coll. [72], rapportent que les taux de contaminations des élevages et abattoirs restent toujours très élevés en Europe, particulièrement en Europe du sud (Grèce, Espagne et Italie), alors que les pays scandinaves rapportent des taux très bas. *S. Enteritidis* est le sérotype le plus fréquent dans le secteur avicole, mais différents sérotypes sont isolés chez le poulet de chair. Il semble que *S. Enteritidis* ait une affinité pour le tractus génital de la volaille d'où contamination des oeufs [73; 74].

En 2002, des chiffres communiqués par la commission européenne [72] indiquent que les exploitations de reproduction ou d'accouaison présentent des contaminations assez basses en Europe occidentale ( moins de 3 % et proche de 0 % en Scandinavie); Dans le sud de l'Europe (Grèce, Espagne, Italie), la contamination va de 7 % à 10 %. Les sérotypes les plus isolés sont : *S. Enteritidis* (42%), *S. Mbandaka* (8,8%), *S. Livingstone* (6,4%), *S. Typhimurium* (4,5%) et *S. Senftenberg* (3%).

En élevages de poulet de chair, la prévalence varie de 1 % à 11 %, et toujours des taux très bas en Scandinavie et plus importants dans les pays du sud (Grèce, Espagne et Italie). Van Immerseel et coll. 2005, rapportent que les dernières années, deux phénomènes ont émergé:

- La résistance des salmonelles à de multiples antibiotiques, c'est l'exemple de *S. Typhimurium* DT 104, et l'émergence du sérotype *S. Enteritidis*, comme pathogène lié à la volaille et particulièrement dans les oeufs.

En France, les volailles sont reconnues être la troisième cause de T.I.A.C à salmonelles après les oeufs et les ovoproduits d'une part et les viandes d'autre part.

Au premier trimestre 2003, le réseau *Salmonella*, de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments qui s'occupe des salmonelles animales a recensé 3317 souches, il a été observé une diminution importante du nombre de souches par rapport au quatrième trimestre 2002, particulièrement pour les souches isolées du secteur «santé et production animale». Les souches les plus fréquemment isolées sont *Salmonella* Typhimurium (468) dont 108 des volailles, *Salmonella* Indiana (435) dont 69 des volailles, *Salmonella* Senftenberg (338) dont 92 des volailles, *Salmonella* Enteritidis (204) dont 30 des volailles [53].

En 2004, le même réseau *Salmonella* signale qu'en dépit des mesures de surveillance et de contrôle, les *Salmonella* sont encore la première cause de toxi-infections alimentaires. Sur un ensemble de 14235 souches inventoriées durant l'année 2004, 74 % des souches proviennent du secteur de la santé animale, 24 % du secteur de l'hygiène des aliments et 2 % de l'environnement.

Les sérotypes les plus fréquemment isolés sont *Salmonella* Typhimurium, soit 1983 souches et surtout 1665 provenant des volailles, suivi de *Salmonella* Senftenberg, soit 1953 souches provenant toutes de la volaille puis *Salmonella* Indiana avec 1642 souches dont 1634 provenaient de la volaille, suivent dans l'ordre *Salmonella* Kottbus (807 souches), *Salmonella* Enteritidis (503) et ainsi de suite mais toujours une provenance très importante des volailles [5].

En 2005, le réseau *Salmonella* a répertorié 12 835 souches et résultats de sérotypage transmis surtout des régions ouest de la France, qui sont également les grands bassins d'élevages de porcs et de volailles. 73 % de ces données provenaient d'animaux malades ou porteurs et de leur environnement; 25 % des données provenaient des carcasses ou aliments destinés à l'homme ou de l'environnement des abattoirs et ateliers de fabrication et enfin 2 % provenaient de l'écosystème naturel.

Le sérotype Typhimurium est le plus fréquent, suivi de Senftenberg, Indiana, Kottbus, Enteritidis, Saintpaul, Hadar et Virchow. Certains sérotypes sont fortement liés à la volaille et produits dérivés de volaille, comme Indiana, Kottbus, Brandenburg et Livingstone. Il est remarqué aussi une légère augmentation comparativement à 2004, des sérotypes Typhimurium et Enteritidis, souvent impliqués dans les toxi-infections alimentaires [75].

En 2006, une enquête communautaire sur la prévalence de *Salmonella* en filière avicoles, a montré une prévalence de 9 % en élevage de poulet de chair (5 stéribottes, en dernière semaine d'élevage et portant sur 390 élevages), les sérotypes les plus fréquents sont S.Hadar et S.Infantis, qui représentent, à eux deux, plus de 40 % des sérotypes isolés, suivis de S.Virchow [62], alors que S.Typhimurium (0,3 %) et S.Enteritidis (0,6 %), semblent reculer comparativement aux résultats de 2005 [75].

En Algérie, Les médias ne cessent de rapporter des épidémies qui surviennent à travers le territoire: Annaba, Eltarf, Skikda, Setif, Sidi belabes, Oran et Blida. C'est le cas du Quotidien d'Oran du 19.01.2006, p:32 où 30.000 poussins sont détruits à Sidi Bel-Abbès et des dégâts estimés à plusieurs millions de dinars; Elkhabar du 08.04.2004, p:5 où 50.000 poussins (en 2 endroits différents de la wilaya d'Oran) et 7.000 poulettes de la wilaya d'Annaba, sont détruits, tout en précisant que c'est *Salmonella* Enteritidis qui est en cause.

Les bulletins sanitaires vétérinaires trimestriels et annuels, édités par la direction des services vétérinaires, du ministère de l'agriculture et du développement rural, signalent de leur côté et de manière très régulière des foyers nombreux et dispersés sur les différentes wilayas du pays:

En 2002, le bulletin annuel a signalé une sensible augmentation du nombre de foyers surtout à *Salmonella* Pullurum Gallinarum (42 foyers), comparativement à l'année 2001, de même pour les autres types de Salmonelloses, notamment à *Salmonella* Enteritidis et ceci à travers toutes les régions du territoire national en dépit du renforcement de la réglementation en la matière [68].

En 2003, ce dernier bulletin, révèle une baisse sensible du nombre de foyers à *Salmonella* Pullurum Gallinarum (soit 25 foyers contre 42), mais aussi 4 foyers à *Salmonella* Enteritidis, et 20 foyers d'autres salmonelloses, particulièrement dans les régions du nord du pays dont 2 foyers à *Salmonella* Ohio à Sidi Bel Abbes sur des poulettes démarrées et un autre à *Salmonella* Newport à Médéa sur un élevage de poulet de chair [76]

En 2004, le même bulletin a constaté une certaine amélioration en matière de salmonelloses à *Salmonella* Pullurum Gallinarum. En effet, seuls 19 foyers ont été

enregistrés contre 25 déclarés en 2003. Par ailleurs, une augmentation de foyers à *Salmonella* Enteritidis a été relevée, soit 19 foyers contre 4 foyers l'année précédente mais aussi 18 foyers de salmonelloses dues à d'autres sérotypes non précisés.

Toujours en 2004, le bulletin sanitaire vétérinaire trimestriel de la direction des services vétérinaires, signale trois foyers de salmonelloses à *Salmonella* Pullorum Gallinarum sur des élevages de poulet de chair répartis sur les wilayas de Jijel, Constantine et Mila. Par ailleurs, deux foyers de salmonellose à *Salmonella* Enteritidis ont été recensés à Oran sur des poussins ponte et chair, il a été aussi signalé un foyer à *Salmonella* Ohio sur un élevage de poussin ponte dans la même wilaya [77].

En 2005, le même bulletin rapporte que les salmonelloses continuent à sévir dans notre pays sous forme enzotique et signale 21 foyers à *Salmonella* Enteritidis, contre 19 recensés en 2004, répartis au niveau des wilayas de l'Est et l'Ouest du pays [78]

En 2006, 26 foyers sont signalés, concernant particulièrement *Salmonella* Enteritidis, mais aussi *Salmonella* Typhimurium, répartis sur différentes régions du nord du pays et touchant des poussins de chair, des poulettes démarrées, poules pondeuses et poulet de chair [76].

Aboun et coll.(2003), à l'institut Pasteur d'Alger, pour une étude de 1998 à 2002 portant sur 1759 lots de prélèvements, soit 51826 échantillons, provenant des secteurs étatiques et privés et des 3 régions du pays (centre, est et ouest) a permis l'isolement de 232 souches durant les 5 années, dont :

- 112 souches (48,28 %) de *S.Enteritidis*,
- 27 souches (11,64 %) de *S.Virchow*,
- 26 souches (11,21 %) de *S.Pullorum-Gallinarum*,
- 14 souches (6,03 %) de *S.Hadar* et *S.Livingstone*,
- 5 souches (2,15 %) de *S.Dublin*,
- 4 souches (1,72 %) de *S.Typhimurium*, *S.Heidelberg*, *S.Isangui*, *S.Brunei* et
- 3 souches (1,29 %) de *S.Senftenberg*, *S.Montevideo*, *S.Brunei*, *S.Newport* et d'autres sérotypes à des pourcentages inférieurs à 1 %.

Ces résultats sont obtenus sur des prélèvements de diverses natures organes de volailles (foie, rate, coeur, grappe ovarienne, intestins, poumons), oeufs, aliments, éclosiers, litières et fientes, des différentes régions du pays, et de différents types de productions aviaires (reproducteurs chair et ponte, poulet de chair, pondeuses, poussins et œufs).

La méthode de recherche consistait en un enrichissement sur bouillon sélénite-cysteine ou par re-vivification pendant 24 h sur bouillon lactose mannitol tamponné, puis enrichissement sur bouillon sélénite-cysteine pour les échantillons d'aliments. L'isolement est réalisé sur gélose Hektoen, ou gélose S-S (shigelle-salmonelle). L'identification biochimique est faite grâce aux galeries classiques et le sérotypage selon le schéma de Kauffmann-White.

Les antibiogrammes, ont montré que la résistance concerne surtout *S. Enteritidis* et à un degré moindre *S. Pullorum-Gallinarum*, *S. Hadar*, *S. Dublin*, *S. Virchow* et *S. Senftenberg*. Cette résistance s'exprime surtout vis à vis des quinolones (Ac. nalidixique, Ac. oxolinique, Fluméquine, Pefloxacin/Ofloxacin et Ciprofloxacine), excepté l'enrofloxacin, et vis à vis de la Nitrofurantoine de la famille des Furanes.

Beaucoup de sérotypes présentent aussi des résistances à l'ampicilline, à certains aminosides: streptomycine et néomycine, et aux tétracyclines et sulfamides.

Boudilmi et coll. (1997) [95] rapportent dans une étude rétrospective sur 9 ans (1988-1996) dans la région Ouest de l'Algérie, où les prélèvements ont été effectués sur des animaux en majorité *Gallus gallus*, poussins ou adultes; Le foie, la rate et les intestins font l'objet d'un examen bactériologique par mise en culture en milieu d'enrichissement: bouillon nutritif au tetrathionate et au vert brillant, suivi d'un transfert sur gélose S.S. (*salmonella*-shigella) ou gélose Hektoen et enfin une identification morphologique, biochimique et sérotypique.

173 souches ont été isolées.

- *S. Gallinarum-Pullorum* représente près de 54 % (93 souches dont 3 sur des lots de volaille importées de Hongrie).
- *S. Enteritidis* constitue un peu plus de 12 % (21 souches, dont 2 sur des lots importés de Hongrie, 2 d'Espagne et 1 de France).
- *S. Arizonae* a été isolée 9 fois (5,2 %).

Pour les autres sérotypes, *S. Typhimurium* (5 souches), *S. Virchow* (4 souches), *S. Heidelberg* (3 souches), *S. Blockley*, *S. Infantis*, *S. Montevideo* (1 souche) et 34 souches (20%) n'ont pas pu être typées par manque de réactifs monovalents.

Benelmouffok (1997), cité par Aboun et coll.(2003), durant la période 1988-1997, rapporte que la fréquence d'isolement de *S. Gallinarum-Pullorum* était de 18,94 %, suivie de *S. Enteritidis* (11,57 %), *S. Newport* (12,63 %), *S. Montevideo* (10,52 %), *S. Dublin* (7,63 %), etc.....

Au Maroc, Maaroufi et coll., cité par Aboun et coll. (2003), pour la période de 1994 à 1998, ont isolé 179 souches, dont 105 souches de *S. Enteritidis* (59 %) et 11 souches (6 %) de *S. Pullorum- Gallinarum* et d'autres souches non complètement sérotypées.

Au Ghana, Sackey et coll.2001, ont isolé 7/97 (7,2 %) salmonelles du contenu intestinal de poulets vivants à la ferme et 13/87 (6,8 %) souches, des carcasses de poulet en morceaux. Toutes les salmonelles étaient résistantes à plusieurs antibiotiques et particulièrement à l'érythromycine.

Globalement, il apparaît que la prévalence des élevages de poulet de chair est très variable d'un pays à un autre. En revanche, il faut reconnaître que différentes méthodes de prélèvement sont utilisées dans les différentes études; La comparaison de ces données doit donc être effectuée avec précaution.

Les informations sur la prévalence à l'intérieur des élevages de poulet de chair sont très limitées, au contraire de la prévalence des troupeaux qui est très utilisée; Cette dernière est définie comme la proportion de troupeaux ou bandes contenant un poulet ou plus infecté de *Salmonella*. On notera qu'on doit prendre en compte, le nombre et les méthodes de prélèvements utilisées mais aussi les pratiques de production, si l'on doit comparer les prévalences [80 ; 70]

### 2.3.2. Sur les carcasses de poulet:

Les salmonelles sont sur la peau, les plumes et dans les fientes d'une petite proportion des poulets de chair au moment de l'abattage, mais les conditions à

l'abattoir tendent à permettre l'augmentation de ces bactéries parmi les carcasses, d'où des degrés de contaminations relativement élevés [59].

L'estimation varie autour de 21 % aux Etats Unis d'Amérique. Dans le même pays, une étude menée à l'abattoir sur 800 échantillons, ont montré que 77 % des carcasses étaient contaminées au poste de coupe automatique des pattes et que 58 % sont contaminées au poste de pré-éviscération [64].

Les volailles contaminées au cours de l'élevage sont une source très importante de dissémination des salmonelles, au cours des différentes étapes de leur préparation et de leur transformation. Ainsi, la prévalence des carcasses contaminées est toujours plus élevée que celle des poulets vivants. La contamination horizontale des carcasses se faisant sur toute la ligne de transformation depuis le transport jusqu'à l'éviscération, l'échaudage et le refroidissement [59].

En filière volaille, une fois un lot contaminé est introduit dans l'abattoir, il est très difficile d'empêcher la contamination des autres animaux à cause du niveau élevé de contamination à travers tous les équipements [59].

En 2005, les états membres de l'Union Européenne ont signalé des isolements positifs entre 0 % et 18 % des échantillons de poulets de chair testés. Comme en 2004, les plus bas niveaux d'échantillons positifs en *Salmonella* chez la volaille sont rapportés par les pays nordiques [70]. Bien que quelques pays obtiennent de très bas niveaux d'incidence, notamment en suède, où l'incidence est inférieure à 1 %, la majorité des autres pays développés signalent une incidence variant de moins 10 % à 100 %, même si les méthodes de prélèvements ne sont pas toujours comparables et varient de 25 g de peau, à de la peau avec muscles et à l'eau de rinçage de toute la carcasse [54].

En Belgique, une étude menée de 1993 à 1996 dans les abattoirs de poulets révèle un taux de contamination superficielle des carcasses variant de 17,6 % à 27,2 %, tandis que 34,6 % à 49,0 % des produits de découpe sont porteurs de salmonelles [81].

En 2002, une étude de l'union européenne, rapporte des prévalences de contamination sur les carcasses à l'abattoir, variables selon les pays, c'est ainsi qu'on a 17,4 % en Autriche, 14,9 % en Espagne, 12,2 % en Belgique, 8,8 % en Hollande, 14,2 % en Grèce, 13,6 % en Italie et 8,5 % au Portugal [71].

Selon D'aoust, 2000, cité par un comité d'experts européens [71], la contamination sur les carcasses serait de 10 à 55 %, suite à un travail de 15445 prélèvements, dont 10 études à Cuba et 2 études pour le Danemark, les Etats Unis, l'Italie, le Japon et le Portugal.

L'Organisation Mondiale de la Santé, avait particulièrement signalé un certain nombre de cas de salmonelloses qui ont été attribués à l'ingestion de viandes de volaille insuffisamment cuites dans différents pays (USA, Grande Bretagne, Pays Bas, Danemark). La demande croissante de viande de volaille ainsi que les profits faibles de l'industrie avicole ont entraîné l'utilisation de méthodes intensives d'élevage à faible coût, rentables et on a négligé la contamination des carcasses par des organismes pathogènes [70].

En Tunisie, Guellouz (1997) [82] pour la période de 1992 à 1996, a isolé 239 souches de salmonelles de viande rouge et de viande de volaille de la ville de Tunis, dont 109 souches provenaient de la viande de volaille, le sérotype le plus fréquent est *S. Corvallis* (49/109), *S. Zanzibar*(12/109), *S. Anatum*(11/109), *S. Enteritidis* (11/109), *S. Agona*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, etc. *S. Corvallis* et *S. Enteritidis* sont les plus isolées chez la volaille. La résistance à la streptomycine est de l'ordre de 13,8 % et elle est toujours associée à celle d'un autre antibiotique.

La résistance au sulfaméthoxazole-triméthoprim est de l'ordre de 11,4 % et atteint 20 % pour les souches isolées chez la volaille et concerne 33,3 % des souches de *S. Corvallis*. La résistance aux furanes et fluméquine est plus fréquente chez les souches issues de volailles et signale qu'aucune souche n'est résistante à la colistine et à l'imipénème.

## 2.4. Sources et transmission:

### 2.4.1. Sources de contamination:

La source principale est bien sûr l'animal malade ou porteur qui excrète les bactéries, que ce soit en couvoir, en élevage ou en abattoir, qui propage le germe par les excréments ou par les œufs infectés.

La contamination de l'environnement par les salmonelles est une évidence; Ces germes peuvent être retrouvés à peu près partout: déjections animales, sols, les points d'eau, effluents, animaux sauvages, et domestiques, flore sauvage etc...Il suffit de les chercher pour les mettre en évidence.

#### 2.4.1.1. Au niveau des couvoirs:

Des transmissions horizontales entre poussins à l'éclosoir peuvent se produire. Dans une même salle où il y a plusieurs éclosiers, une salmonelle invasive telle *S. Enteritidis* peut essaimer par l'intermédiaire des poussières en général et du duvet, dans différents éclosiers, à partir d'un seul point de départ.

Les couvoirs dont les conditions hygiéniques sont défectueuses peuvent être des réservoirs pour certaines souches [83].

Les œufs infectés, provenant de porteurs, perpétuent le cycle animal-animal, lors de l'éclosion, grâce aux coquilles, duvet et déjections, mais aussi par la voie respiratoire en inhalant la poussière [84 ; 72].

Les caisses de livraison en plastique, de plus en plus utilisées, augmentent le risque d'intercontaminations quand elles sont mal désinfectées entre deux livraisons de poussins [85 ; 86 ; 72].

#### 2.4.1.2. Au niveau des élevages:

- L'environnement: toute contamination résiduelle d'un bâtiment avant la mise en place des poussins constitue une source très importante de salmonelles [87]. L'épandage de fumier contaminé sur les pâtures présente un double risque:

- Celui de la contamination des cours d'eau et la contamination directe des animaux placés sur cette parcelle [86].
- Les poussins eux même:
- La qualité des poussins: s'ils sont issus de jeunes reproducteurs, de petite taille ou fragiles.
- La mise en place d'un traitement antibiotique au démarrage qui peut ralentir la maturité de la flore digestive du poussin.
- Stress au démarrage.
- Maladies intercurrentes.
- Le transport:

Le stress de transport fait augmenter le niveau de contamination des animaux. Les mauvaises conditions de nettoyage et de désinfection des camions et des caisses de livraison qui ne sont pas spécifiques n'arrangent rien [88 ; 60].

- L'alimentation: Les aliments jouent un rôle important comme véhicules de salmonelles, notamment ceux contenant des farines d'os, de viande ou de poisson, des tourteaux de soja et des tourteaux de tournesol [54 ; 72].
- L'eau: elle peut être un vecteur des salmonelles, il est largement connu que l'eau de réseaux de distribution publique ou de source privée est souvent le véhicule de la paratyphoïde et moins fréquemment d'autres infections à salmonelles.

La nature de la diffusion de ces germes est difficile à apprécier mais elle existe car la pollution par les déjections de l'eau d'abreuvement est souvent responsable des salmonelles du troupeau. On retrouve d'ailleurs beaucoup plus les salmonelles dans les sédiments de cette eau que dans l'eau elle-même [86 ; 54. 72].

- La litière:

La litière contaminée permet la diffusion rapide d'une souche de salmonelle introduite dans un élevage. Le plus grand danger viendrait d'une litière sèche, car les salmonelles résistent longtemps dans des environnements secs. Dans une litière humide, colonisée par de nombreuses espèces bactériennes et contenant de la matière organique en décomposition, l'antagonisme microbien et la production d'ammoniac, donc un pH élevé, favorisent la destruction des salmonelles; Une situation qui n'encourage pas l'hygiène [61 ; 54].

- Les nuisibles: La présence des rongeurs, des oiseaux sauvages et insectes est souvent la source principale de contamination des aliments, car les rongeurs peuvent être des porteurs durables de sérotypes variés, notamment *S. Enteritidis*. Les insectes semblent ne jouer qu'un rôle de vecteur passif [54 ; 89].

- Le mode d'élevage: Il peut exercer une influence sur la contamination des animaux et la vitesse de diffusion d'une infection: La densité trop importante des élevages au sol (cas des reproducteurs et poulet de chair), présentent une grande susceptibilité aux salmonelles. Les variations brusques de température ou une hygrométrie trop basse sont des facteurs de stress, une ventilation insuffisante des locaux permet l'accumulation de gazs toxiques mais surtout un confinement favorable à la dissémination des salmonelles [86].

- Matériel d'élevage: Les bâtiments, leurs abords, les camions de transport et tracteurs, les cages, le sol, les murs, les systèmes d'aération, les ustensiles, les mangeoires, les abreuvoirs, les incubateurs et les vêtements sont sources de contamination et de transmission de l'infection à salmonelles [83].

#### 2.4.1.3 Au niveau de l'abattoir:

Certaines étapes de l'abattage entraînent des intercontaminations entre les lots, notamment par les ustensiles, le personnel et les équipements d'abattage.

Les salmonelles présentes dans le tube digestif, peuvent polluer les carcasses si leur intégrité n'est pas respectée [60].

Les salmonelles peuvent être apportées par l'environnement à toutes les phases de l'abattage [86].

Les postes les plus contaminant lors des opérations d'abattage, **sont l'échaudage** par trempage, qui constitue en réalité un bouillon de culture, si la température n'est pas maintenue autour **de 55 °C**, mais aussi la plumaison et l'éviscération par dissémination du contenu du tube digestif contaminé [90 ; 60]

Au cours du transport, les camions favorisent le contact des excréments d'un poulet contaminé aux plumes et pattes des autres poulets [61; 59]. Le temps d'attente pour l'abattage est un moment où les animaux sont soumis à un stress

intense qui affaiblit les défenses immunitaires, facilitant la dissémination mais encore les conditions de transport tels: la chaleur, le froid, l'éloignement et les battements d'ailes peuvent être une source de contamination remarquable.

La saignée manuelle ou automatique est peu propice à la contamination [61 ; 80], c'est plutôt à l'accrochage des animaux et pendant leurs débattements que l'air ambiant est pollué de salmonelles et les risques de contamination sont accrus [54].

Lors de l'échaudage les poulets sont trempés dans de l'eau à température comprise entre 50 et 58 °C pour ramollir l'épiderme et les follicules plumeux. Même si les salmonelles ne se multiplient pas et commencent même à se détruire dès 50°C, l'eau n'est pas toujours maintenue à cette température mais chaque poulet apporte environ 50 g d'impuretés diverses: si le renouvellement de l'eau n'est pas suffisant, la contamination du bac ne cessera d'augmenter à chaque échaudage de poulet et le risque de contamination par les salmonelles augmentera de manière exponentielle, la contamination s'effectue en surface par les matières fécales susceptibles de contenir des salmonelles au moment du passage dans l'eau du bac d'échaudage [61; 54; 59].

Au cours de la plumaison, la chaîne portant les poulets passe au travers de deux rampes séparées d'environ 50 cm, sur lesquelles sont montées des plumeuses rotatives à doigts, munies de languettes de caoutchouc (flagelleuses) montées sur des têtes tournant à grande vitesse; Les têtes opposées tournent en sens inverse, les têtes contiguës tournent en contre sens.

Les languettes viennent frapper les volailles et en arracher les plumes. La contamination s'opère principalement par les doigts de plumeuses contaminées par les plumes et les pattes contaminées par les matières fécales mais aussi par les salmonelles retrouvées dans l'air ambiant suite à la projection dans l'air des plumes arrachées avec force par les plumeuses [61].

L'éviscération consiste à enlever les viscères thoraciques (poumons et coeur) et abdominaux (proventricule, jabot, gésier, foie et intestins) automatiquement grâce à une machine ou manuellement. L'éviscération automatique peut être à l'origine de souillure de la carcasse suite à la rupture de l'intestin quand l'appareil est mal réglé ou par les manipulateurs.

Les matières fécales sont le réservoir principal des salmonelles car la rupture de la paroi intestinale entraîne une contamination de la carcasse, du matériel et du personnel. Ces derniers peuvent être alors des vecteurs importants de la dissémination des salmonelles par manipulation des carcasses ou par manque d'hygiène lorsque l'homme est porteur sain de salmonelles. L'éviscération est généralement suivie d'un lavage pour enlever les matières organiques présentes à la surface des carcasses mais également pour diminuer la contamination superficielle en salmonelles [61].

Le refroidissement des poulets s'effectue soit par trempage dans de l'eau glacée ou par passage dans des couloirs où est introduit de l'air froid par ventilation [61].

Lors de refroidissement à l'eau glacée, la contamination croisée est d'autant plus fréquente que le nombre de bactéries présentes sur les carcasses à l'entrée est élevé. La contamination survient par contact entre les carcasses par l'intermédiaire de l'eau. Pour limiter ce risque, il est recommandé d'utiliser un système à contre courant où les carcasses cheminent à partir d'une zone contaminée, vers une partie très propre où s'effectue l'arrivée d'eau froide [61].

Le refroidissement à l'air, utilisé seulement pour des carcasses destinées à être vendues à l'état réfrigéré, ne provoque pas de modification notable de la contamination par les salmonelles. Le trempage des carcasses dans un bac d'eau glacée assure un refroidissement plus rapide, mais les contaminations croisées par l'eau du bac de refroidissement est possible et même fréquent. Le taux de contamination des carcasses varie en fait de 4 % à 100 % en fonction des méthodes d'étude et des abattoirs [54].

#### 2.4.2. Transmission: (voir figure 2.1)

##### 2.4.2.1. Transmission verticale:

Elle résulte d'une infection de l'ovaire ou de l'oviducte de la pondeuse par un sérotype adapté de salmonelles. C'est essentiellement *S. Enteritidis* et plus rarement *S. Typhimurium*, Heidelberg, Hadar, qui ne se traduit pas nécessairement par des signes cliniques, mais par un décrochement de la courbe de ponte suivi

d'un rattrapage rapide. Les salmonelles colonisent les milieux intérieurs de l'œuf. Les poussins issus de ces œufs infectés sont viables et éclosent infectés par la souche de salmonelles d'origine maternelle [54 ; 72 ; 91].

#### 2.4.2.2. Transmission horizontale:

Elle peut débuter dès le couvoir, où les œufs sont contaminés au niveau des coquilles à la ponte, sans pénétrer dans l'œuf, mais persiste sur la cuticule. Le poussin est infecté dès l'éclosion par contact avec la coquille infectée. De plus, dans les claies des couvoirs, une intercontamination par création et diffusion d'un aérosol contaminé est prouvée [83; 89]. Les pratiques de gestion dans toute la filière volaille ont un effet profond sur la transmission et la persistance des salmonelles dans les systèmes de production de la volaille [91]. C'est aussi le cas des modes de transmission par la litière, l'eau, l'alimentation, les nuisibles, le personnel, etc...[54].

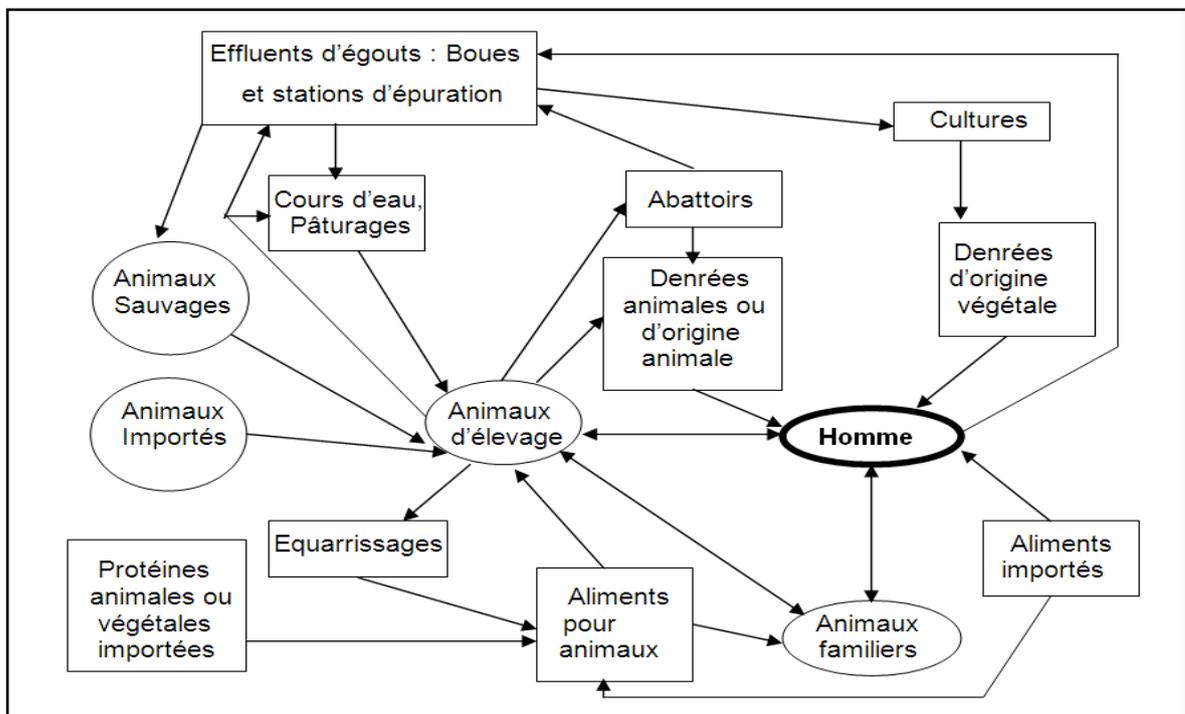


Figure 2.1 : Cycle de diffusion des salmonelles dans l'environnement [81].

## 2.5. Prophylaxie:

### 2.5.1. Prophylaxie sanitaire:

A travers le monde entier et particulièrement en Scandinavie, il a été démontré que l'application et les programmes de contrôle peuvent contribuer de manière considérable à la réduction de la prévalence des salmonelles chez la volaille, par le biais des mesures telles les bonnes pratiques d'élevage et la biosécurité.

En Algérie l'arrêté interministériel n° 006 du 20 janvier 2003 [92], définissant les mesures de prévention et de lutte spécifiques aux salmonelloses aviaires à *S. Enteritidis*, *Typhimurium*, *Typhi*, *Arizona*, *Dublin*, *Paratyphi* et *Pullorum Gallinarum*, doit être pris en considération, pour une lutte efficace.

Les barrières sanitaires représentées par les mesures générales d'hygiène sont les premiers éléments à mettre en place avant l'emploi des procédés spécifiquement adaptés à la lutte contre le danger *Salmonella* ou tout traitement [93; 54].

### 2.5.2. Mesures générales d'hygiène:

Les locaux, le personnel et l'environnement doivent répondre à certains principes généraux [52; 54]:

- Un isolement rigoureux des locaux vis à vis de l'extérieur, pour protéger les locaux, les équipements et les animaux.
- Le respect du principe de la marche en avant avec délimitation d'une zone propre et d'une zone sale.
- Le non entrecroisement des courants de circulation (matières premières et produits finis ou produits avec déchets).
- La propreté, la désinfection et le bon état d'entretien des équipements et du matériel.
- La propreté et sensibilisation à l'hygiène du personnel.
- La propreté et le lavage des mains, le changement et désinfection des bottes sont essentiels pour la protection des bâtiments d'élevages [59].

### 2.5.3. Système de surveillance en Algérie :

La surveillance des salmonelles en Algérie s'inscrit dans le cadre d'un vaste programme de surveillance des maladies animales; En effet, afin de permettre une évaluation des programmes de prévention et de lutte mis en place et l'analyse des risques liés à l'importation des animaux, des produits d'animaux et des produits d'origine animale, un réseau d'épidémiosurveillance a été initié en 1984, consolidé en 1988 suite à la promulgation de la loi régissant la médecine vétérinaire et la protection de la santé animale.

La réglementation en vigueur impose à tout vétérinaire quelque soit son secteur d'activité, la déclaration obligatoire de toute maladie animale contagieuse tant celles confirmées ou celles fortement suspectées. Ainsi, les vétérinaires privés ou les vétérinaires fonctionnaires, en poste au niveau des bureaux d'hygiène communaux, des abattoirs, des postes frontières et des centres de quarantaine, récoltent les données, et les transmettent à l'inspection vétérinaire, aux autorités locales et à la direction des services vétérinaires. Ces informations sont véhiculées à travers le formulaire officiel de déclaration, les rapports de suivi des foyers et les rapports mensuels des activités vétérinaires.

Les laboratoires sollicités pour une éventuelle confirmation ou infirmation de la maladie, assurent le retour d'informations aux vétérinaires demandeurs par des bulletins d'analyses, et à la direction des services vétérinaires à travers les bilans mensuels (voir figure 2.2). Aussi, dans le cadre de renforcement du réseau d'épidémiosurveillance au sud du pays, il a été mis en place des observatoires (Adrar et Tamanrasset), qui ont pour tâche principale, la création de base de données relatives aux maladies sévissant dans les régions respectives et celles menaçant le cheptel Algérien à partir des frontières Sud, ainsi que la mise en place d'un système de diagnostic précoce permettant l'intervention rapide des services concernés.

Par ailleurs, afin de renforcer l'intégration totale des praticiens privés dans le réseau d'épidémiosurveillance, des mandats sanitaires leur ont été attribués dès

l'année 2004, pour la réalisation de certains programmes de prophylaxie officiels ordonnés par l'autorité vétérinaire nationale.

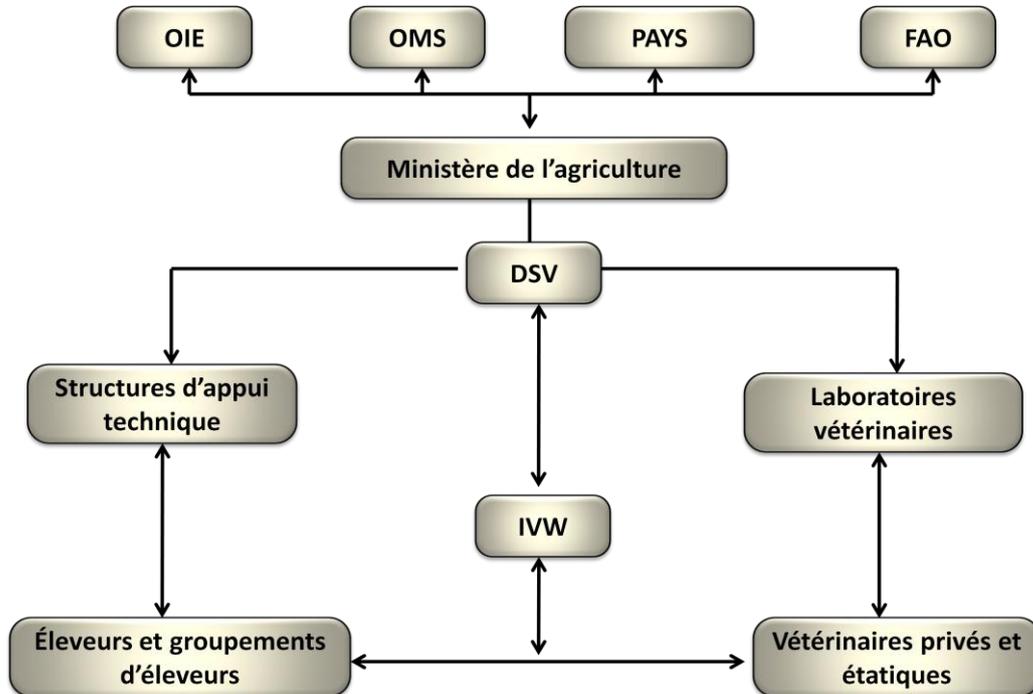


Figure 2.2: Schéma du système d'information en surveillance sanitaire vétérinaire [92].

## CHAPITRE 3

### METHODES DE DETECTION ET DE CARACTERISATION

#### 3.1. Techniques classiques de détection :

Les micro-organismes pathogènes dans les aliments, dans l'environnement ou bien dans les matières fécales sont généralement présents en petit nombre et peuvent entrer en concurrence avec une flore saprophyte, abondante dans certaines matrices alimentaires.

Etant donné les conditions de traitement et de conservation des aliments, les bactéries peuvent être stressées. Pour isoler les bactéries, l'analyse microbiologique classique des aliments nécessite donc plusieurs étapes successives ce qui entraîne un temps de réponse relativement important [95 ; 96].

3.1.1. La première étape : consiste en une revivification grâce à la réalisation d'une suspension-mère de pré-enrichissement, dans laquelle l'échantillon est généralement dilué au dixième (ex : 25 g d'aliment dans 225 ml de diluant). Le diluant est généralement constitué par de l'eau peptonnée tamponnée (EPT).

3.1.2. La deuxième étape : consiste en un enrichissement des salmonelles par l'entremise de milieux dits « sélectifs », dont les formulations ont été spécialement mises au point pour favoriser la multiplication de celles-ci au détriment de la flore compétitrice.

Trois types de milieux d'enrichissement peuvent être utilisés :

- ✓ Muller-Kaufman tétrathionate (MKTT) à 42°C ;
- ✓ Sélénite-cystine (SC) à 37°C ;
- ✓ Rappaport-Vassiliadis (RV) à 42°C.

Ce dernier milieu d'enrichissement est souvent le plus approprié pour *Salmonella*, étant donné son excellente sélectivité [97 ; 98 ; 96], due à son haut pouvoir

osmotique, à son pH bas, à sa faible teneur en éléments nutritifs et au fait que les salmonelles offrent une résistance importante au vert de malachite contenu dans ce milieu [99].

3.1.3. Troisième étape : les méthodes prévoient ensuite un isolement, qui consiste en un étalement sur boîtes de Pétri, contenant également des milieux sélectifs. Cela permet de visualiser les colonies caractéristiques, dont le nombre aura été considérablement augmenté durant les phases précédentes. Ces milieux doivent permettre au personnel de laboratoire une distinction facile entre salmonelles et non-salmonelles.

WALTMAN (2000) rapporte qu'il existe plus d'une quinzaine de formules différentes de milieux mais indique, toutefois, que le «*Brilliant Green Novobiocine*» (BGN) et le «xylose lysine tergitol-4» (XLT4) sont les plus performants pour les viandes de volailles et les échantillons d'environnement provenant d'exploitations avicoles. Un autre point important à signaler est l'existence chez la volaille, dans certains cas, de souches de *S. Gallinarum* ne produisant pas de H<sub>2</sub>S, ce qui peut compliquer la reconnaissance des colonies sur un milieu d'isolement. En effet, la distinction entre les colonies se base sur la propriété de production de sulfure d'hydrogène par les salmonelles qui apparaissent alors comme des colonies munies d'un centre noir.

3.1.4. L'étape de confirmation : suit l'isolement, consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur purification. Elle est chargée sur une pointe et ensemencée en profondeur et en surface du milieu «*Triple Sugar Iron*» (TSI), gélose inclinée composée de citrate de fer, de lactose, saccharose et glucose (une alternative peut consister en l'utilisation d'une gélose dite de Kligler-Hajna). L'identité des colonies doit être confirmée en fonction de caractéristiques biochimiques.

### 3.2. Méthodes microbiologiques de référence :

La norme NF EN ISO 6579 (Voir figure 3.1) est la méthode horizontale de référence pour la détection de *Salmonella* spp. Dans une denrée alimentaire, mais

également dans des échantillons d'environnement collectés dans les entreprises agro-alimentaires [100].

Dans sa nouvelle version (2002), le sélénite-cystine a été remplacé par le milieu Muller Kauffmann tétrathionate novobiocine (MKTTn), le Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé à la place de la formule simple de RV. Les laboratoires doivent expressément utiliser le milieu d'isolement «xylose-lysine-deoxycholate» (XLD) conjointement avec un autre milieu au choix (figure 3.1).

Dans un contexte de globalisation des échanges commerciaux de denrées alimentaires, cette norme est la référence internationale pour la détection de *Salmonella* dans les aliments.

### 3.3. Nouvelles techniques de détection de *Salmonella* spp.

Etant donné la nécessité d'atteindre un seuil de détection bas, les bactériologistes ont, sans cesse, tenté d'améliorer les techniques de détection [98]. La nature de l'aliment ou de la matrice à analyser peut également compliquer la détection en provoquant une inhibition des *Salmonella* présentes dans l'échantillon.

Une des premières voies d'amélioration a résidé dans l'utilisation de milieux semi-solides, exploitant la propriété de mobilité de la plupart des salmonelles. De Smedt et collaborateurs (1986) ont montré une meilleure performance avec le milieu semisolide appelé «modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis» (MSRV) par rapport à un enrichissement classique avec le milieu tétrathionate.

Outre le fait de pouvoir disposer de résultats négatifs au bout de 48 h, le MSRV permet la détection d'un petit nombre de salmonelles présentes dans l'échantillon parmi une flore compétitrice importante (de l'ordre de 10 UFC<sub>2</sub> / 25 g) [101].

L'ISO («*International Standard Organization*») a proposé également un amendement à la norme ISO 6579 destiné à mettre au point des méthodes applicables aux échantillons prélevés dans les exploitations. Ce projet prévoit l'utilisation de MSRV comme milieu d'enrichissement pour *Salmonella* [102].

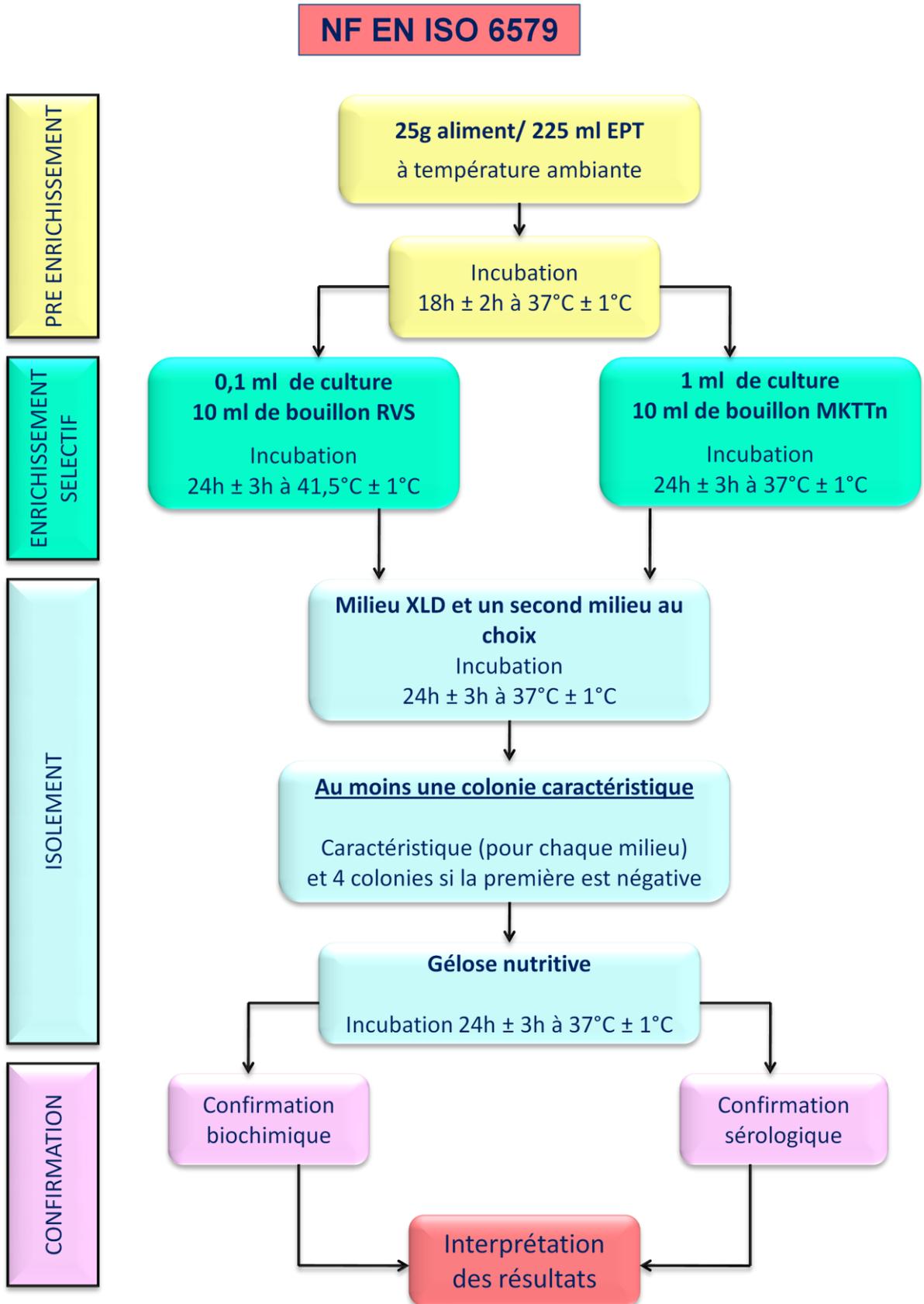


Figure 3.1 : Méthode de référence ISO 6579.

Récemment, une nouvelle formule a été proposée, dérivée du MSR/V ; il s'agit du Diasalm. Son efficacité a été plusieurs fois comparée par rapport au milieu classique RV, et la comparaison s'est révélée en faveur du Diasalm, en particulier dans les viandes de volaille [103; 104].

L'utilisation de Diasalm est la méthode officielle belge pour la recherche de *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires (méthode SPVG- M002). Il permet de mettre en évidence un grand nombre de sérotypes chez le porc mais peut avoir comme inconvénient majeur de ne pas détecter *S. Gallinarum* chez la volaille, étant donné qu'elle est immobile. Une autre approche est l'exploitation des techniques d'amplification génétique comme la «*Polymerase Chain Reaction*» (PCR), qui abaisse considérablement le seuil de détection des bactéries pathogènes dans un aliment. Les étapes sont les suivantes : préparation de l'échantillon pour l'extraction des acides nucléiques, amplification d'une séquence cible et analyse des produits obtenus. La PCR peut être utilisée pour le simple diagnostic, pour caractériser les souches isolées dans les entreprises agro-alimentaires ou dans les cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Plusieurs systèmes commerciaux de détection en kit ont vu le jour, les plus connus d'entre eux étant certainement BAX™, iq-Check™ et Probelia™, ce dernier ayant été validé par l'Association Française de Normalisation [105; 106].

Outre le fait que pour toutes ces techniques de PCR, il est toujours nécessaire de pratiquer une courte période de pré-enrichissement, un des inconvénients majeurs du test Probelia™ réside dans l'existence d'inhibiteurs, souvent présents dans des matrices d'aliments pour porcs, comme les coques de cacao. D'autres méthodes mettent en œuvre des procédés immunologiques. C'est le cas, par exemple, de Dynabeads anti-*Salmonella*® qui utilise des particules magnétiques sur lesquelles des anticorps spécifiques des salmonelles ont été fixés de manière covalente afin de capturer spécifiquement les *Salmonella* spp. Ceci permet de raccourcir les délais de réponse de l'analyse car l'étape d'enrichissement immuno-magnétique est précédée directement après le pré-enrichissement et ne dure que 15 à 20 minutes [107].

Il peut être fait mention du système automatisé VIDAS (firme bioMérieux), largement utilisé par les laboratoires de diagnostic de routine.

### 3.4. Méthodes de caractérisation des souches des salmonelles

Bien que le sérotypage soit la méthode de référence pour classer les souches de salmonelles, les techniques de PCR peuvent servir à effectuer une caractérisation des souches isolées [93]. Une technique largement utilisée est la RAPD («*Random Amplification of Polymorphic DNA*»), qui met en oeuvre un oligonucléotide d'une dizaine de bases comme amorce. Celui-ci va s'apparier au génome bactérien à différents endroits non spécifiques, en créant ainsi un polymorphisme important en taille et en nombre de fragments générés après amplification [108 ; 109 ; 110]. Cette technique permet d'effectuer des discriminations intra-sérotypes au sein d'une exploitation.

Elle peut, par la même occasion, donner des indications quant à l'installation d'une souche bien précise dans un compartiment d'élevage ou d'engraissement, ce qui pourrait être le témoin d'une insuffisance dans les procédures de nettoyage et de désinfection entre plusieurs lots d'engraissement par exemple. Toutefois, elle ne remplacera jamais complètement la technique de sérotypage classique qui constitue la base même des enquêtes épidémiologiques. Parmi les techniques génétiques de caractérisation, la PFGE («*Pulsedfield gel electrophoresis*» en anglais ; «*électrophorèse en champ pulsé* » en français) offre le plus de perspectives dans un contexte épidémiologique [111; 112 ;113].

Elle est également utile afin de caractériser les foyers de salmonelloses humaines [114] Suivant le profil des bandes obtenues sur gel, il est possible d'établir le degré de parenté entre les différentes souches isolées. L'analyse des gels s'effectue souvent au moyen d'un programme informatique permettant d'établir un dendrogramme des souches isolées. Actuellement, un réseau d'experts s'est constitué (le réseau « Pulse Net ») en vue de standardiser et d'harmoniser des protocoles optimaux pour cette technique de génétique moléculaire et de constituer une base de données électronique des différents profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé. Parmi les méthodes classiques de caractérisation, le lysotypage consiste à soumettre les souches à l'action de plusieurs bactériophages. En fonction du profil de lyse, il est possible d'attribuer un lysotype bien précis à la bactérie.

Pour le sérotype Typhimurium, un ensemble de 37 phages est utilisé, ce qui permet de classer les souches parmi 210 lysotypes [115]. Les souches présentant un profil de lyse atypique sont qualifiées de RDNC («*Routine Dilution No Conformity*»), celles résistantes à tous les phages sont considérées comme non typables et sont indexées par la lettre U («*Untypable*»).

Il existe également des types définitifs (DT : *Definitive Type*) et d'autres provisoires (PT : *Provisonal Type*). Le lysotypage ne requiert pas un investissement très important, mais le personnel doit être bien entraîné. D'un point de vue épidémiologique, il est souvent très utile de connaître le lysotype des souches isolées, étant donné que certains revêtent des caractéristiques particulières au niveau de la pathogénicité ou de la résistance aux antibiotiques. Depuis le début des années nonante, en Europe et aux Etats-Unis, des *S. Typhimurium* de lysotype DT104 multirésistants sont apparues. Ce lysotype est connu au Royaume-Uni depuis les années soixante mais la résistance aux antibiotiques ne s'y est propagée qu'à partir de l'année 1989, date à laquelle elle fut isolée pour la première fois chez l'homme.

A partir de ce moment, les souches multirésistantes DT104 se sont installées dans la population bovine de ce pays. Vers le milieu des années quatre-vingt-dix, elles ont été détectées dans une série de pays européens et en Amérique du Nord, lors d'épidémies liées à la consommation de fromages au lait cru [113 ; 116 ; 117]. Ceci est très préoccupant sur le plan de la santé publique car elles sont souvent associées à une quadri ou pentarésistance aux antibiotiques (résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, au sulfonamide et à la tétracycline) [116].

Une résistance additionnelle à la ciprofloxacine peut également être observée, ce qui est encore plus problématique, car cette molécule ou ses dérivés sont souvent utilisés dans le traitement de salmonelloses humaines. Cette émergence de polyrésistances suit généralement de quelques années l'usage en médecine vétérinaire, d'antibiotiques comme, par exemple, l'enrofloxacine. Il est toujours utile de rappeler que le praticien a un rôle considérable à jouer dans le cadre du contrôle de ces polyrésistances et devrait réserver ce type de traitement aux animaux de rente, uniquement en cas d'extrême nécessité. Une surveillance

constante des résistances des souches isolées dans le secteur agro-alimentaire doit être systématiquement planifiée par les instances officielles. C'est d'ailleurs une volonté clairement stipulée dans la nouvelle directive « zoonoses » 2003/99/CE [118].

### 3.5. Méthodes alternatives :

Dans le domaine agro-alimentaire, les méthodes dites alternatives sont souvent nécessaires [120] ; elles permettent :

- diminution du coût unitaire de l'analyse,
- amélioration des conditions de travail du personnel de laboratoire,
- meilleure précision des mesures en diminuant considérablement les risques d'erreur humaine
- plus grande rapidité de réponse [121] pour éviter la séquestration des denrées alimentaires [120]

Plusieurs méthodes rapides peuvent être utilisées, nous citerons brièvement.

3.5.1. Lysotypie : technique permettant de distinguer diverses souches étroitement apparentées, appartenant à des sérovars d'intérêt majeur (soit par leur fréquence d'isolement : Typhimurium et Enteritidis, soit par leur pathogénicité : Typhi et Dublin) [122], en exploitant leurs différences de sensibilité vis-à-vis d'une série de bactériophages sélectionnées [8 ; 36 ; 40].

### 3.5.2. Méthodes immunologiques :

- **Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA** : technique largement utilisée et extrêmement sensible, elle requiert l'usage d'un anticorps (ou d'un antigène) sur lequel est greffée une enzyme [123 ; 40] dont la présence est détectée par l'addition du substrat correspondant. De nombreux systèmes automatiques (kits) sont proposés par différentes sociétés.

- **RadiolImmunoAssay, RIA**: technique rarement utilisée en microbiologie alimentaire (8) car l'Ag est couplé à un isotope (<sup>125</sup>I essentiellement) [124].

- **Immunofluorescence** : un composé fluorescent tel que l'isothiocyanate de fluorescéine peut être fixé sur les anticorps anti-*Salmonella*. Lorsque les cellules bactériennes sont mises au contact de ces anticorps fluorescents, ces derniers se fixent sur la paroi ou les flagelles qui, à l'examen microscopique en UV, apparaissent fluorescentes [123 ; 124].

### 3.5.3. Méthodes moléculaires :

3.5.3.1. Electrophorèse des protéines : technique de séparation des protéines cellulaires (enzymes) selon le poids moléculaire et la charge électrique [30] ; ce qui reflète indirectement l'expression du génôme. L'analyse des électrophorégrammes obtenus par des logiciels issus de la micro-informatique permet une identification précise [123].

### 3.5.3.2. Méthodes génotypiques :

a. Méthodes basées sur la restriction enzymatique ou REA (Restriction Enzyme Analysis) :

L'ADN, essentiellement chromosomal, des souches recherchées subit une digestion par une endonucléase appropriée de restriction qui clive l'ADN en des séquences nucléotidiques spécifiques (8) ; les fragments produits sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose ; le ribotypage (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) constituent les deux plus importantes techniques [122].

b. Méthodes basées sur l'amplification ou PCR (Polymerase Chain Reaction) :

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [125], Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) et l'hybridation ADN/ADN ou hybridation ADN/ARN ribosomiaux sont des techniques rapides couplées à la PCR, largement utilisées pour la détection et l'identification des micro-organismes dans les aliments [8].

## CONCLUSION

Les salmonelloses sont des maladies infectieuses, contagieuses, transmissibles à l'homme et à diverses espèces animales, dues à la présence d'un germe du genre *Salmonella* et de la famille des Enterobacteriaceae [52].

Les salmonelloses peuvent être responsables chez l'homme, selon le sérotype en cause et en fonction de l'état physiologique de l'hôte, d'une simple diarrhée accompagnée ou non de fièvre ou d'une infection généralisée parfois mortelle ou à la simple infection inapparente.

En effet, les salmonelloses sont la première cause de toxi-infection alimentaire dans les pays industrialisés et particulièrement en France [53], où 14 235 souches de salmonelles ont été recensées par le réseau *Salmonella* de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (A.F.S.S.A.) durant l'année 2004.

Les *Salmonella* sont des bacilles de 2 à 3 µm par 0.6 à 0.8 µm [3], à Gram négatif, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs [15 ; 37], habituellement mobiles. Elles appartiennent à la famille des entérobactéries. Leur culture est possible sur des  
Les *salmonella* possèdent les caractères biochimiques généraux de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les *Salmonella*, comme toutes les entérobactéries, possèdent trois types d'antigènes [5], Seuls les antigènes somatiques **O**, les antigènes flagellaires **H** et éventuellement, les antigènes capsulaires **K** ont un intérêt diagnostique; ils permettent d'individualiser différents sérovars et sont mis en évidence par agglutination au moyen de sérums spécifiques [15].

Le germe *Salmonella* est recherché par différentes méthodes de références et récemment alternatives, ces dernières permettent de diminuer le coût unitaire de l'analyse, améliorer les conditions de travail du personnel de laboratoire avec une meilleure précision des mesures en diminuant considérablement les risques d'erreur humaine.

## CHAPITRE 4

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### 4.1. Problématique et objectifs :

La synthèse bibliographique souligne que le poulet de chair constitue une des sources les plus importantes de salmonellose humaine d'origine alimentaire.

La présence de *Salmonella* a été en effet mise en évidence à tous les maillons de la filière aviaire, notamment au niveau des abattoirs, ce qui constitue des pertes économiques considérables des élevages atteints et un risque sanitaire pour la santé publique.

D'une part, Il est à souligner que 93% du potentiel d'abattage du poulet de chair en Algérie est pris en charge par le circuit privé. Ces structures, échappent souvent aux contrôles sanitaires, constituant ainsi un danger potentiel pour le consommateur, c'est dans cette perspective que nous avons ciblé dans la présente étude une catégorie de ces structures à savoir les tueries avicoles.

D'autre part, au niveau national, la plupart des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire et les laboratoires régionaux vétérinaires recherchent le germe *Salmonella* selon les méthodes classiques de routine ne leur permettant pas souvent d'isoler le genre *Salmonella* à cause de leur faible sensibilité.

La méthode de routine utilise le bouillon au sélénite de sodium pour un enrichissement sur milieux sélectif liquide, suivi d'un ensemencement sur milieu sélectif solide, souvent le milieu Hektoen et XLD.

Les colonies présomptives de salmonelles lactose négatif et H<sub>2</sub>S positif, sont ensemencées sur milieu TSI suivi de galerie biochimique et sérotypage. Néanmoins certains sérotypes de *Salmonella* fermentent le lactose avec ou sans production d'H<sub>2</sub>S, ces colonies passent souvent inaperçues au technicien de laboratoire, ce qui augmente le taux de faux négatifs des prélèvements effectués.

La méthode alternative ISO 16140 recommande l'utilisation d'un milieu chromogénique RAPID' *Salmonella*, c'est un milieu sélectif solide. Les colonies de *Salmonella spp* apparaissent de couleur magenta (mauve) spécifiques, facilement repérables, suite à la dégradation par deux enzymes spécifique à la Salmonelle des substrats chromogènes additionnés au milieu. Une contre sélection apparait avec d'autres couleurs pour les différencier des autres entérobactéries.

La présente étude est conduite en deux étapes pour atteindre deux objectifs :

- Rechercher et caractériser le germe *Salmonella* avec une méthode alternative de référence ISO 16 140 en parallèle de la méthode classique de routine.
- Evaluer le taux de contamination par les salmonelles au niveau des structures d'abattage privées à savoir les tueries avicoles de la wilaya de Blida.

#### 4.2. Cadre de l'étude :

La wilaya de Blida est limitée au sud par la wilaya de Médéa, l'Atlas, la montagne de Chréa et les gorges de la Chiffa, au nord par les plaines de l'Algérois des wilaya d'Alger, Tipaza et Boumerdès, à l'ouest par la wilaya de Ain Defla et enfin à l'Est par la wilaya de Bouira.

Elle est constituée de 25 communes et possède plus d'une centaines d'élevage avicoles recensé par les services agricoles de la wilaya ainsi que 67 structures d'abattage avicoles, dont 38 tueries avicoles fonctionnelles, avec une capacité d'abattage inférieure à 500 Kg/j.

### 4.3. Matériels et Méthodes :

La présente étude a été conduite du mois de décembre 2007 au mois de mai 2008 et s'est déroulée en deux étapes :

#### 4.3.1. 1<sup>ère</sup> Etape : Sur le terrain

##### 4.3.1.1. L'échantillonnage :

Notre étude a porté sur 5 tueries avicoles fonctionnelles dont la capacité d'abattage est inférieure à 500 Kg/j, toutes privées, ayant bien voulu participer à ce travail, ce qui représente un taux de couverture de 13 % des 38 tueries avicoles fonctionnelles.

Pour avoir un échantillon représentatif des tueries, nous avons ciblé en concertation avec les services vétérinaires de Wilaya de Blida trois (03) communes sur les 25 existantes (12%), dont la capacité de production est importante. Les communes sont CHIFFA, BOUFARIK et BOUGARA (Figure 4.1), vue leur distribution géographique dont Chiffa se situe à l'Ouest, Boufarik au centre et Bougara à l'Est.

Dans chaque commune nous avons ciblé deux tueries, que nous avons appelé A et B pour respecter l'anonymat.

Au niveau des communes de Chiffa et Boufarik, nous avons pu accéder aux deux tueries, par contre pour la commune de Bougara, nous n'avons pu accéder qu'à une seule tuerie.

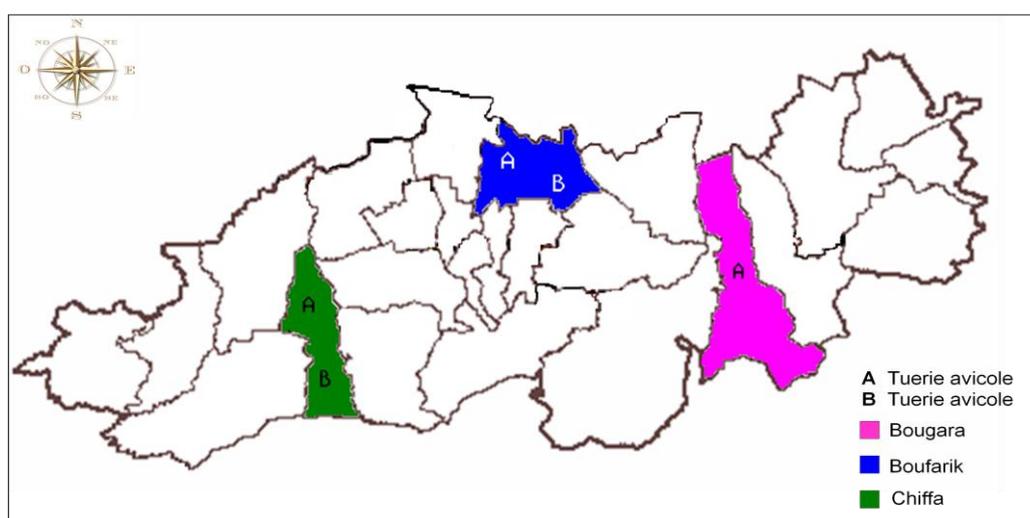


Figure 4.1 : Répartition des tueries avicoles échantillonnées sur le territoire de la wilaya de Blida.

#### 4.3.1.2. Fiche d'enquête/abattage :

Nous avons établi une fiche d'enquête/abattage (Voir annexe A), dans laquelle nous avons relevé les pratiques d'abattage, d'échaudage, d'éviscération et de transport des 5 tueries de notre étude. Dans le but de nous renseigner sur l'état hygiénique de ces établissements.

#### 4.3.1.3. Prélèvements :

Nous avons effectué nos prélèvements au cours de 2 visites espacées au minimum de 15 jours, et cela pour toucher deux lots d'abattage de poulet de chair provenant d'élevages différents (sachant que l'âge moyen d'abattage est entre 45 et 60 jours).

Au total nous avons effectué 10 visites pour les 5 tueries, dans lesquelles nous avons touché 10 lots différents de poulet de chair (1 lot pour chaque visite).

Les prélèvements d'eau d'échaudage sont effectués après la fin d'abattage de tous les lots lors de la visite.

Les prélèvements de peau de cou et caeca sont effectués sur des poulets différents tirés au hasard avec un saut de 10 poulets.

Tous les prélèvements ont été effectués par le même opérateur.

##### a) Type de prélèvements :

Nous avons ciblé les prélèvements suivants :

- L'eau d'échaudage (renseigne sur une contamination homogène des carcasses) (1 flacon stérile de 225 mL) (voir figure 4.2).
- Les caeca (renseignent sur une éventuelle contamination de l'élevage d'origine, les deux caeca sont prélevés).
- La peau de cou (renseigne sur la contamination des carcasses destinées à la consommation humaine et ne déprécie pas la carcasse) (voir figure 4.3).

**La technique et le matériel nécessaire aux prélèvements sont détaillés dans l'appendice B.**



Figure 4.2 : Prélèvements de l'eau d'échaudage dans des flacons stériles [Photo personnelle].



Figure 4.3 : Prélèvements de peau de cou dans des boîtes de Pétri stériles ou sachets stériles [Photo personnelle].

b) 1<sup>ère</sup> visite :

Pendant la première visite, nous avons effectué 175 prélèvements (5 prélèvements d'eau d'échaudage, 85 prélèvements de peau de cou et 85 prélèvements de caeca) ce qui représente 5 lots différents de poulets de chair.

Chaque type de prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements.

Tableau 4.1 : Répartition des prélèvements pendant la 1<sup>ère</sup> visite.

Tueries	Numéro du lot	Nbre de sujets abattus par lot le jour de la visite	Eau d'échaudage	peaux de cou (10g)	Caeca	Total prélèvements/tuerie
Chiffa A	Lot N° 1	250	1	15	15	31
Chiffa B	Lot N° 2	320	1	20	20	41
Boufarik A	Lot N° 3	300	1	20	20	41
Boufarik B	Lot N° 4	220	1	15	15	31
Bougara A	Lot N° 5	200	1	15	15	31
<b>Total</b>		<b>1290</b>	<b>5</b>	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>175</b>

Les prélèvements ont été mis dans un sac isotherme muni de plaques eutectiques, à 4°C. Puis acheminés au laboratoire central de la police scientifique et technique, département contrôle de qualité alimentaire, arrivés au laboratoire, ils sont congelés à -20°C pour une analyse ultérieure.

La fiche d'enquête/abattage est renseignée pendant la première visite uniquement.

c) 2<sup>ème</sup> visite :

Elle est effectuée au minimum 15 jours après la première visite.

Tableau 4.2 : Répartition des prélèvements pendant la 2<sup>ème</sup> visite.

Tueries	Numéro du lot	Nbre de sujets abattus par lot le jour de la visite	Eau d'échaudage	peaux de cou	Caeca	Total prélèvement/tuerie
Chiffa A	Lot N°6	230	1	15	15	<b>31</b>
Chiffa B	Lot N°7	200	1	15	15	<b>31</b>
Boufarik A	Lot N°8	320	1	20	20	<b>41</b>
Boufarik B	Lot N°9	300	1	20	20	<b>41</b>
Bougara A	Lot N°10	300	1	20	20	<b>41</b>
<b>Total</b>		<b>1350</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>185</b>

Nous avons effectué 185 prélèvements pendant la deuxième visite (5 prélèvement d'eau d'échaudage, 90 prélèvements de peau de cou et 90 prélèvements de caeca), ce qui représente 5 autres lots de poulets de chair.

Au total, au cours des deux visites nous avons effectué **360 prélèvements** :

- 10 prélèvements d'eau d'échaudage ;
- 175 prélèvements de peau de cou ;
- 175 prélèvements de caeca.

#### 4.3.2. 2<sup>ème</sup> Etape : Au laboratoire

Les prélèvements sont acheminés sous froid au Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique, Département de Contrôle de Qualité/Environnement, Ben Aknoun, Alger.

Les prélèvements d'eau d'échaudage sont mis au réfrigérateur et analysés le plus tôt possible.

Les peaux de cou et caeca sont congelés pour une analyse ultérieure.

##### 4.3.2.1. Protocole d'analyse des prélèvements:

L'eau d'échaudage est analysée en premier lieu pour déterminer si le lot est contaminé ou pas.

Les 360 prélèvements ont été analysés selon le protocole suivant :

- **Eau d'échaudage** : chaque flacon est analysé séparément (10 mL d'eau d'échaudage dans 90 mL d'eau peptonnée);
- **Peaux de cou** : réparties en pools de 5 prélèvements (5 prélèvements de 5g, regroupés en un seul échantillon);
- **Caeca** : répartis en pools de 5 prélèvements (racler la lumière de 5 Caeca et les réunir en un seul échantillon).

La répartition en pools se fait le jour du prélèvement, une fois acheminés au laboratoire, chaque prélèvement de peau de cou et caeca est divisé en deux, une partie regroupée en pools de 5 et l'autre partie est congelée individuellement pour une analyse ultérieure.

Au final, nous avons analysé :

- 10 prélèvements d'eau d'échaudage ;
- 35 pools de peau de cou ;
- 35 pools de caeca.

Les pools de 5 prélèvements positifs conservés sont repris individuellement pour analyse séparée et déterminer le nombre de positifs sur le pools des 5 prélèvements.

Tableau 4.3 :Récapitulatif des pools de prélèvements des dix lots étudiés.

Visites	Tuerie	N° Lot	Taille du lot (Sujets)	Eau d'échaudage	Peaux de cou (Pools)	Caeca (Pools)
1 <sup>ère</sup> Visite	Chiffa A	Lot N° 1	250	1	3	3
	Chiffa B	Lot N° 2	320	1	4	4
	Boufarik A	Lot N° 3	300	1	4	4
	Boufarik B	Lot N° 4	220	1	3	3
	Bougara A	Lot N° 5	200	1	3	3
2 <sup>ème</sup> Visite	Chiffa A	Lot N° 6	230	1	3	3
	Chiffa B	Lot N° 7	200	1	3	3
	Boufarik A	Lot N° 8	320	1	4	4
	Boufarik B	Lot N° 9	300	1	4	4
	Bougara A	Lots N° 10	300	1	4	4
<b>Total</b>			<b>2640</b>	<b>10</b>	<b>35</b>	<b>35</b>

#### 4.3.2.2. Méthodes d'analyses bactériologiques pour la recherche des Salmonelles:

Les échantillons sont soumis à deux méthodes d'analyses bactériologiques :

- La méthode classique (utilisée couramment au laboratoire).
- La méthode alternative ISO 16 140.

La prise d'essai est différente pour les trois types de prélèvement:

- **L'eau d'échaudage:** 25 mL de l'eau d'échaudage mélangé à 25 mL de l'eau peptonée tamponnée (EPT).
- **Les caeca:** racler la lumière de 5 caeca pour constituer 10 g à mélanger avec 90 ml de l'EPT.
- **Les peaux de cous:** 25 g de peaux de cous (pools de 5 prélèvements, 5g chacun) à mélanger avec 225 ml de l'EPT [126].

#### 4.3.2.2.1. Méthode d'analyses bactériologiques classique :

Elle comprend six phases successives :

##### 4.3.2.2.1.1. Prise d'essai et pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide :

Cette phase destinée à revivifier les cellules bactériennes lésées (stressées par le transport et la congélation), correspond à la préparation de la suspension mère en utilisant de l'EPT qui contient essentiellement des peptones tryptiques, source d'azote :

- En milieu aseptisé, sous hotte de sécurité biologique, nous procédons à la prise d'essai en pesant sur une balance tarée, 25g de peau de cou à analyser dans un sac stomacher.
- 225 ml d'EPT sont versés dans le sac stomacher.
- Le sac est placé dans l'appareil stomacher réglé à la vitesse maximale pour effectuer le broyage. Cette opération dont la durée varie entre 60 et 90 secondes permettra la diffusion en solution de la flore bactérienne.
- La solution ainsi obtenue est versée dans un flacon stérile ; celui-ci sera incubé durant 16-20h dans une étuve réglée à 37°C.

##### 4.3.2.2.1.2. Enrichissement en milieux sélectifs liquides :

Cette étape permet la croissance et la sélection des bactéries du genre *Salmonella*, un tube contenant 10ml de bouillon au sélénite de sodium simple concentration enrichi en cystine (SC) et un disque d'additif SFB, estensemencé avec 1ml de la culture de pré-enrichissement. L'incubation à 37°C dure 18-24h.

Les milieux au sélénite de sodium s'opposent au développement des bactéries à Gram positif [127].

##### 4.3.2.2.1.3. Isolement sur milieux sélectifs solides :

Il a été effectué selon la méthode d'ensemencement en stries à l'aide d'une anse bouclée, sur deux milieux gélosés, la gélose Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD) et la gélose Hektoen (HK).

Une ampoule contenant 5ml d'additif HK (sels biliaires) est ajoutée à un flacon de 225ml de gélose HK en surfusion.

À la gélose XLD en surfusion, trois additifs sont ajoutés :

- l'additif HK ;
- le xylose à 20% ;
- désoxycholate de Na, à raison de 1ml chacun.

À partir du bouillon d'enrichissement au SC, une boîte de gélose XLD et une boîte de gélose HK sontensemencées.

Les boîtes de milieux gélosés ainsiensemencées, seront incubées durant 24-48h dans une étuve réglée à 37°C, avec une première lecture après 18-24h.

Sur la gélose sélective XLD, les *Salmonella* fermentent le xylose puis décarboxylent la lysine, ce qui alcalinise le milieu et donne des colonies rouges avec éventuellement un centre noir (figure 4.4).

Sur la gélose HK, sélective par la présence de sels biliaires, les colonies de *Salmonella* sont bleues ou vertes avec généralement un centre noir (figure 4.4).

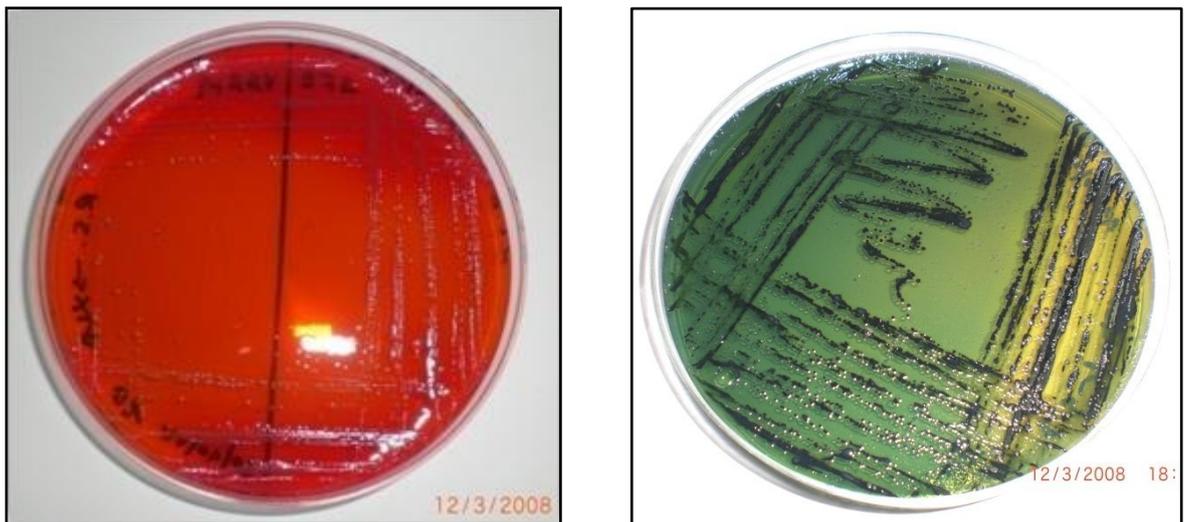


Figure 4.4 : Aspect des colonies de salmonella sur milieu XLD (à gauche) et milieu Hektoen (à droite) [Photo personnelle].

#### 4.3.2.2.1.4. Purification sur gélose nutritive :

Trois colonies typiques de *Salmonella* (parfois plus) sont prélevées à partir de chaque boîte de milieu sélectif (XLD et HK) puis purifiées sur gélose nutritive (GN). Après incubation à 37°C pendant 18-24h, les colonies mieux isolées, sont utilisées pour l'identification biochimique.

#### 4.3.2.2.2. Méthode alternative ISO 16 140 :

Cette méthode est validée AFNOR comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 6579 pour la recherche de *Salmonella spp.* pour tous produits d'alimentation humaine et animale.

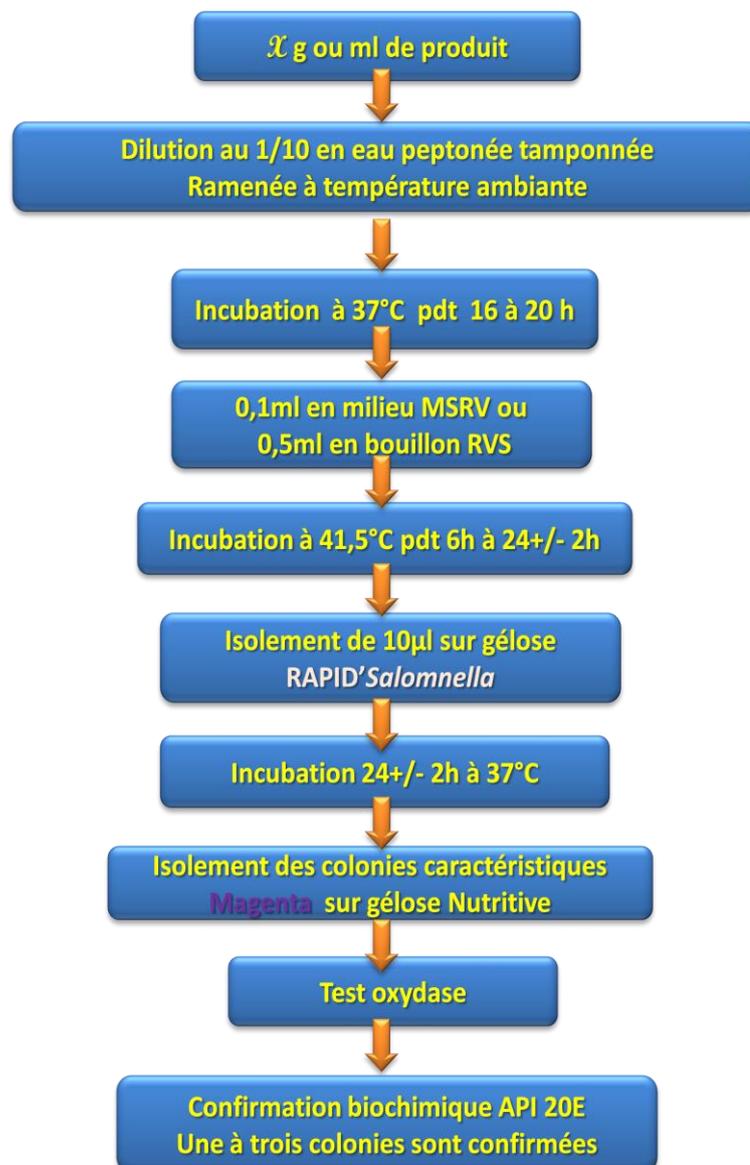


Figure 4.5 : Diagramme d'analyse selon la méthode alternative [151]

La validation AFNOR a été obtenue selon le protocole ISO 16 140, sous le n° d'attestation: BRD 07/11-12/05.

#### 4.3.2.2.1. Prise d'essai et pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide :

Cette étape est identique à celle de la méthode classique.

#### 4.3.2.2.2. Enrichissement en milieux sélectif liquide et semi solide :

Cette étape permet la croissance et la sélection des bactéries du genre *Salmonella*, deux milieux sont utilisés :

##### **a) Le milieu RVS :**

Bouillon au vert de malachite et au chlorure de Magnésium (milieu de Rappaport-Vassiliadis Soja, BioRad, France), nous ensemençons dans un premier temps un tube contenant 10ml de bouillon de Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) avec 0.1ml de la culture de pré-enrichissement.

L'incubation dure 18-24h dans une étuve réglée à 42°C.

Le vert de malachite contenu dans ce milieu a la faculté d'inhiber la flore à Gram positif, alors que la forte teneur en chlorure de magnésium inhibe partiellement la flore à Gram négatif [15].

##### **b) Le milieu MSRVS :**

0,1mL du bouillon de pré-enrichissement est inoculé sur les boîtes de gélose Semi Solide du milieu MSRVS (Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis) (BioRad, France), [101, 128, 129], le milieu est additionné d'une solution de Novobiocine à 2% avant de couler les boîtes de Petri pour inhiber les cultures de bactéries Gram positif [130].

Dans la présente étude nous avons utilisé le milieu MSRVS uniquement.

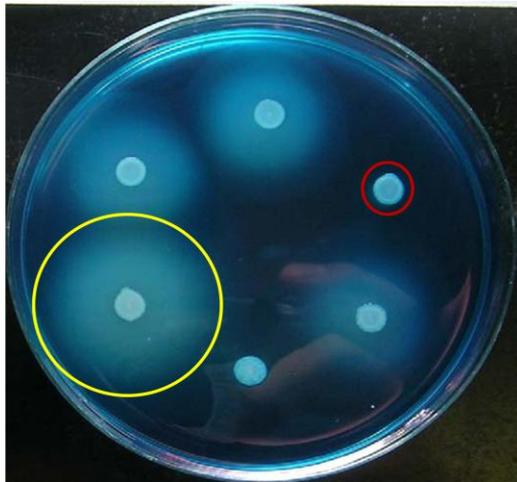


Figure 4.6 : Zone de migration de *Salmonella spp.* sur milieu MSR (à gauche : positif, à droite : négatif)

Les boîtes sont incubées à  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , pendant 24 h, couvercle en haut.

Les boîtes du milieu MSR sont examinées après  $24\text{h} \pm 2\text{h}$ . Si la migration est supérieure à 20mm du point d'inoculation (Voir figure 4.6), un inoculum est prélevé de la zone de migration et ensemencé sur le milieu chromogénique RAPID'*Salmonella* par une technique d'isolement appropriée.



Figure 4.7 : Préparation du milieu MSR  
[Photo personnelle]



Figure 4.8 : Ensemencement du milieu MSR  
[Photo personnelle]

#### 4.3.2.2.3. Isolement sur milieux sélectifs solides :

##### a) Le milieu RAPID'*Salomnella* :

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence de deux activités enzymatiques. Les *Salmonella* se présentent sous forme de colonies caractéristiques de couleur magenta (détection C8 estérase), facile à identifier.

Une Contre sélection est utilisée pour faire apparaître les genres bactériens avec une coloration différente.

RAPID'*Salomnella* permet la détection des salmonelles mobiles et immobiles, ainsi que les salmonella lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi.

b) Principe du milieu chromogène :

Consiste à l'utilisation d'un substrat chromogène colorant les colonies pour une identification plus aisée, c'est une association d'un chromophore et un auxochrome (module l'intensité de couleur) sensible à une ou deux enzymes spécifique aux salmonelles à savoir : C8 estérase,  $\beta$ -glucosidase.

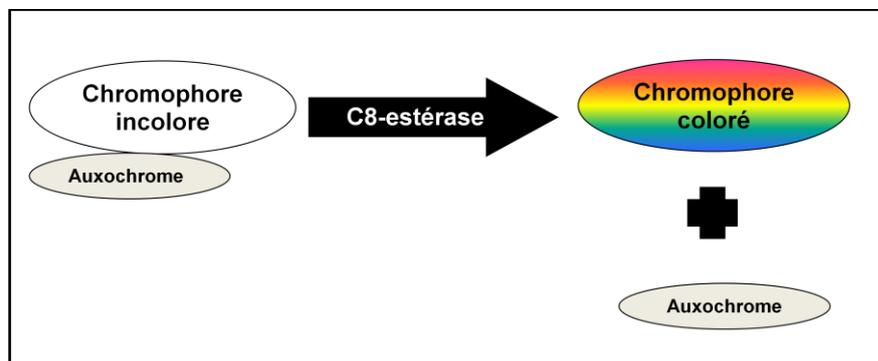


Figure 4.9 : Principe du milieu chromogène.



Figure 4.10 : Différence de couleur des colonies sur RAPID'*Salmonella*  
[Photo personnelle].



Figure 4.11 : Colonies caractéristiques de Salmonelles sur milieu RAPID' *Salmonella* [Photo personnelle]

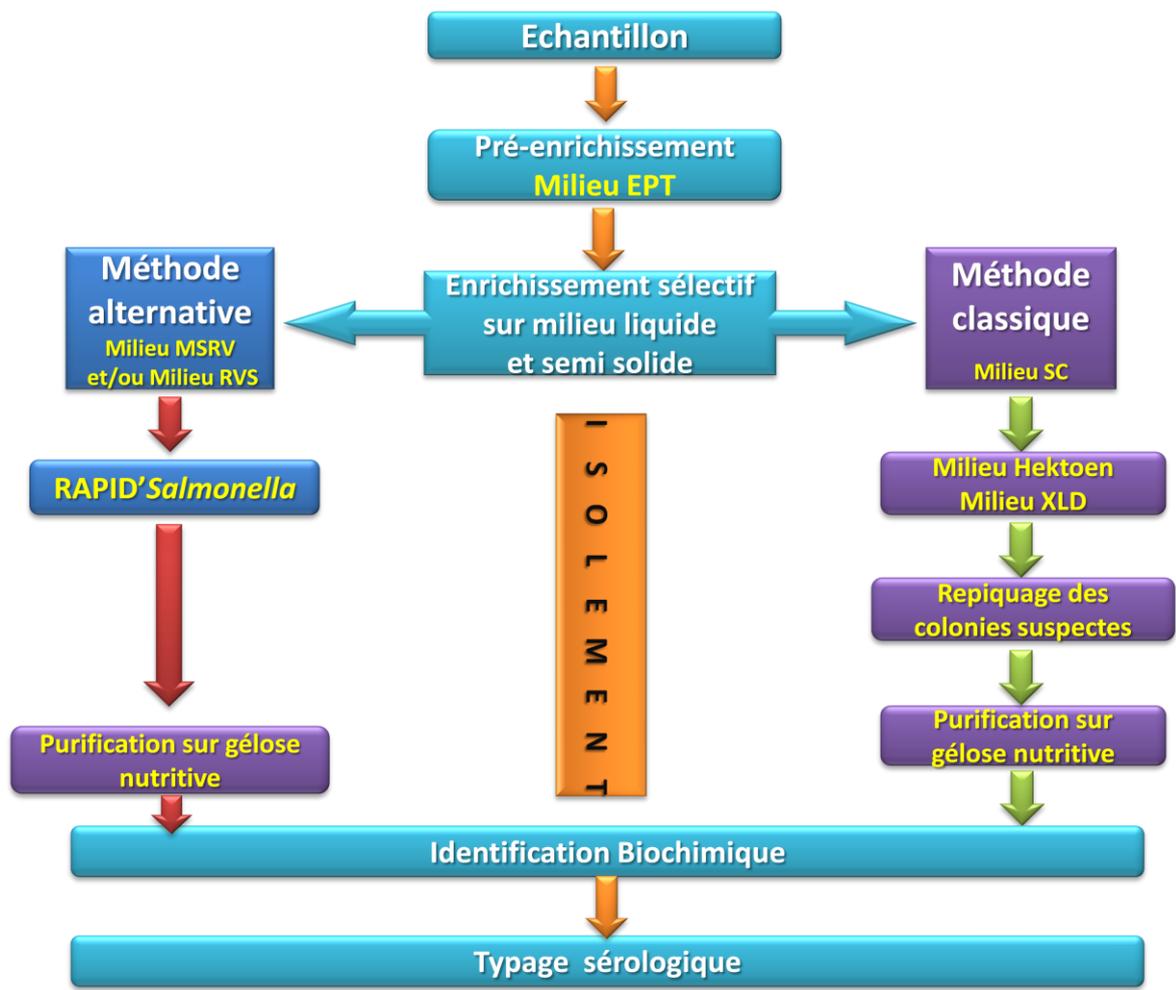


Figure 4.12 : Diagramme comparatif de la méthode classique et la méthode alternative.

#### 4.3.2.3. Identification biochimique : (voir appendice F)

Lorsque le champ d'identification a été, après isolement sur milieux sélectifs, réduit à quelques familles bactériennes, on recourt à des tests biochimiques dits métaboliques puisqu'ils vont nous permettre de distinguer les bactéries de genres et d'espèces différents en détectant les différences entre leurs métabolismes. Chaque colonie présomptive ré-isolée sur GN est soumise à une série de tests biochimiques d'orientation avant de subir une confirmation sur galerie miniaturisée. Les tests biochimiques utilisés sont détaillés dans l'appendice D.

#### 4.3.2.4. Identification sérologique des souches des salmonelles isolées :

Cette deuxième étape a été réalisée selon la méthode d'agglutination sur lame. En utilisant des sérums agglutinants polyvalents et monovalents, nous avons pu déterminer la formule antigénique pour chaque isolat de salmonelles; ce qui nous a permis par la suite, d'identifier son nom à partir du schéma de Kauffmann-White dont deux non identifiées.

##### 4.3.2.4.1. Technique :

Il importe d'opérer sur une souche identifiée biochimiquement *Salmonella* et préalablement purifiée.

Pour chacune des souches isolées, qu'elle soit conservée sur un milieu au TSI ou sur un milieu spécifique de conservation, nous procédons à sa purification en ajoutant d'abord, 0.5ml de bouillon nutritif puis en effectuant un isolement sur gélose HK.

Après une incubation de 18-24h à 37°C, une colonie bien isolée est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur puis repiquée simultanément sur un tube de milieu au TSI et sur un tube de GN inclinée. Les deux tubes seront incubés à 37°C pendant 18-24h.

Nous vérifions d'abord la non-agglutinabilité en sérum physiologique de la souche à sérotyper ; nous opérons ensuite avec méthode en cherchant successivement l'agglutination avec les sérums anti-**O**, puis anti-**H**, phase 1 et phase 2.



L'antigène flagellaire **H** peut être monophasique ou plus fréquemment, diphasique; dans ce dernier cas, l'une des deux phases peut ne pas être exprimée.

Nous avons utilisé la technique de **SvenGard** dite de l'**inversion de phase** permettant de réprimer la spécificité de l'Ag **H** ayant été exprimée par la population bactérienne dominante, qui sera par conséquent immobilisée au centre de la culture, afin de pouvoir sélectionner la population bactérienne minoritaire possédant la spécificité antigénique **H** recherchée.

Cette sélection se traduit du fait de la mobilité de *Salmonella*, par une migration vers la périphérie de la culture.

La culture deviendra inagglutinable par le sérum anti-H de la première phase mais agglutinable par le sérum anti-H de la seconde phase, qui sera ainsi identifiée.

La technique consiste à mettre quelques gouttes du sérum anti-H de la phase à réprimer dans une petite boîte de Pétri de 55 mm de diamètre, on y coule un tube contenant 10 ml de gélose de SvenGard (gélose nutritive molle favorisant la mobilité de *Salmonella*) alors qu'elle est en surfusion à 45° - 55°C ; homogénéiser et laisser se solidifier avant d'ensemencer le centre "en spot", c'est-à-dire en un point.

Après une incubation, couvercle en haut, à 37°C pendant 18-24h, refaire le sérotypage en prélevant à partir de la périphérie de la culture tout en sachant que les Ag **H** réprimés devenus ainsi immobiles, demeurent au centre.

En déterminant les facteurs antigéniques **O** et **H**, la formule antigénique complète de la *Salmonella* étudiée, est ainsi obtenue et le nom du sérovar enfin identifié à partir du schéma de Kauffmann-White.

Dans la présente étude nous n'avons pas pu typer toutes les souches par manque de sérums monovalents.

#### 4.3.2.4.2. Interprétation :

La réaction est positive si au bout de quelques secondes, il y a formation d'agrégats visibles à l'oeil nu; l'agglutination avec les sérums anti-**O** granulaire, est par conséquent plus visible, alors que l'agglutination avec les sérums anti-**H** fine, est relativement moins évidente à détecter.

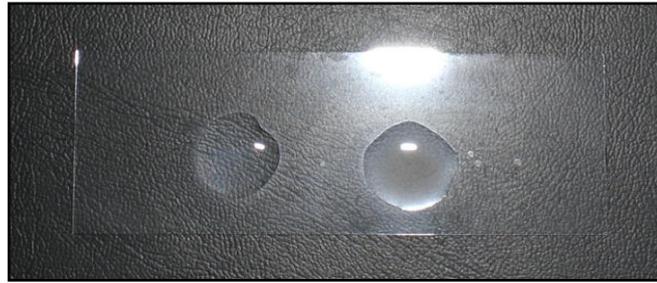


Figure 4.14 : Aspect d'une réaction négative (à gauche) et d'une réaction positive (à droite) d'une agglutination sérologique sur lame [Photo personnelle].

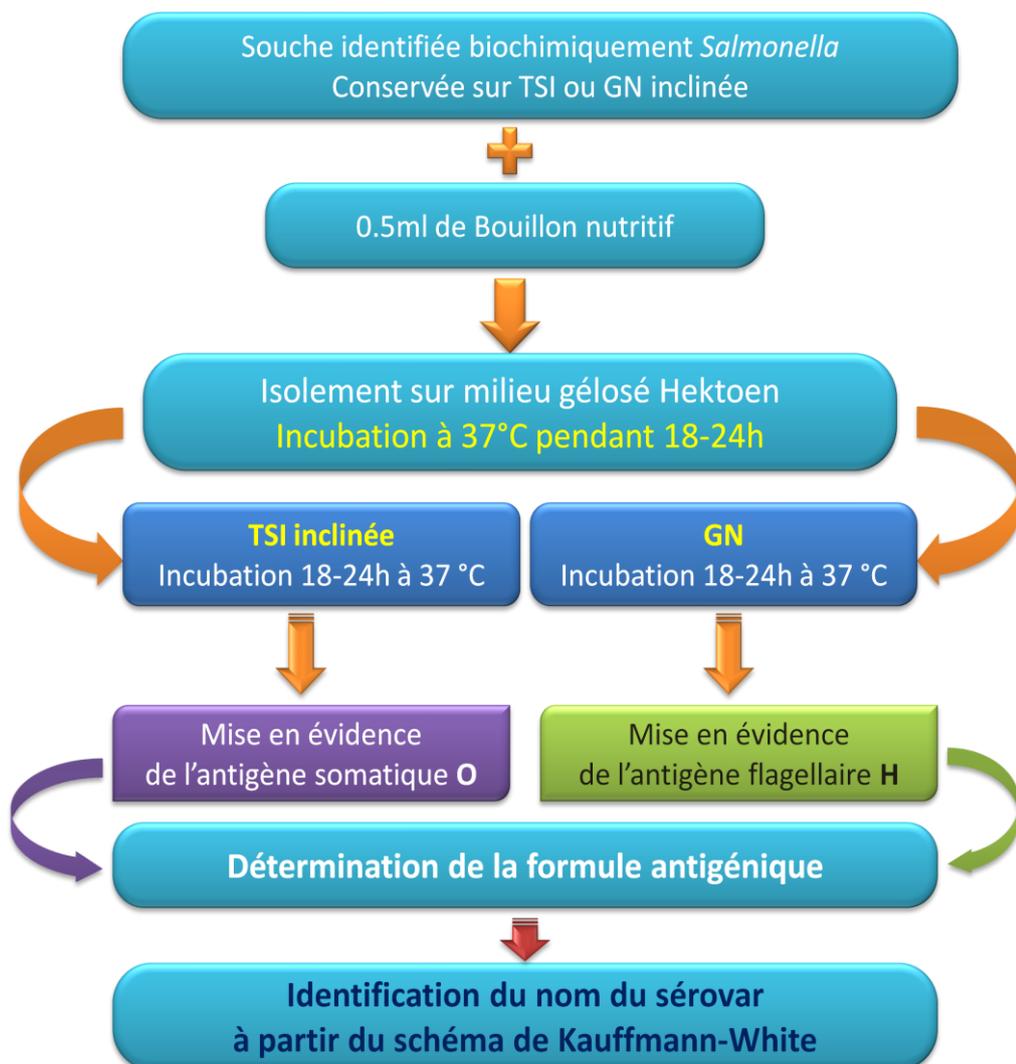
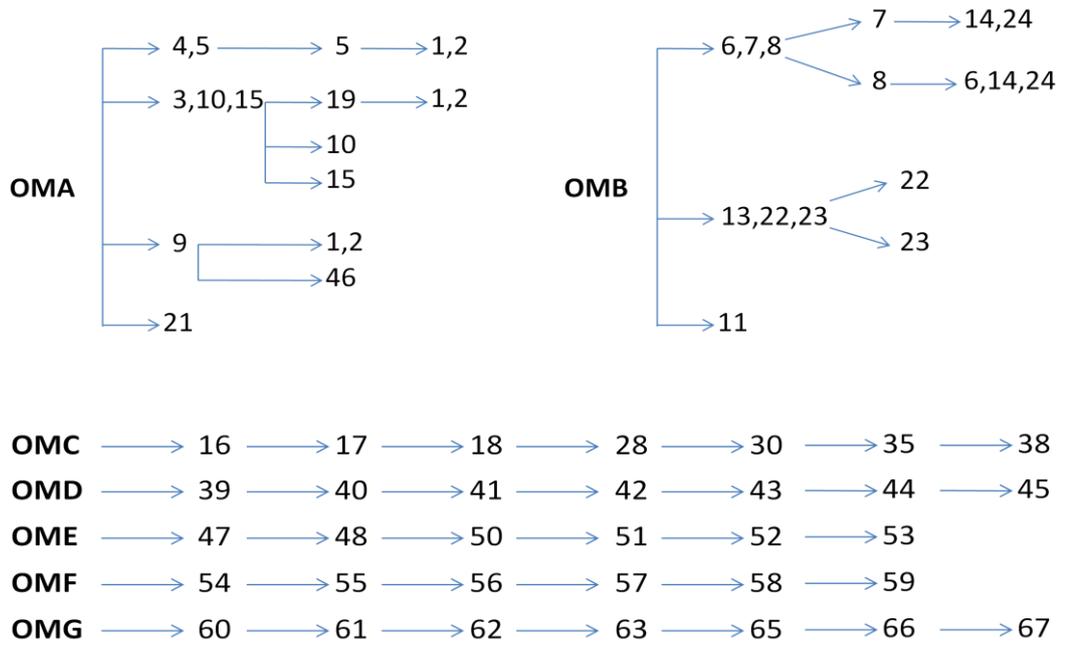


Figure 4.15 : Diagramme du mode opératoire de l'identification sérologique de *Salmonella*.

**Ag. SOMATIQUES**



**Ag. FLAGELLAIRES**

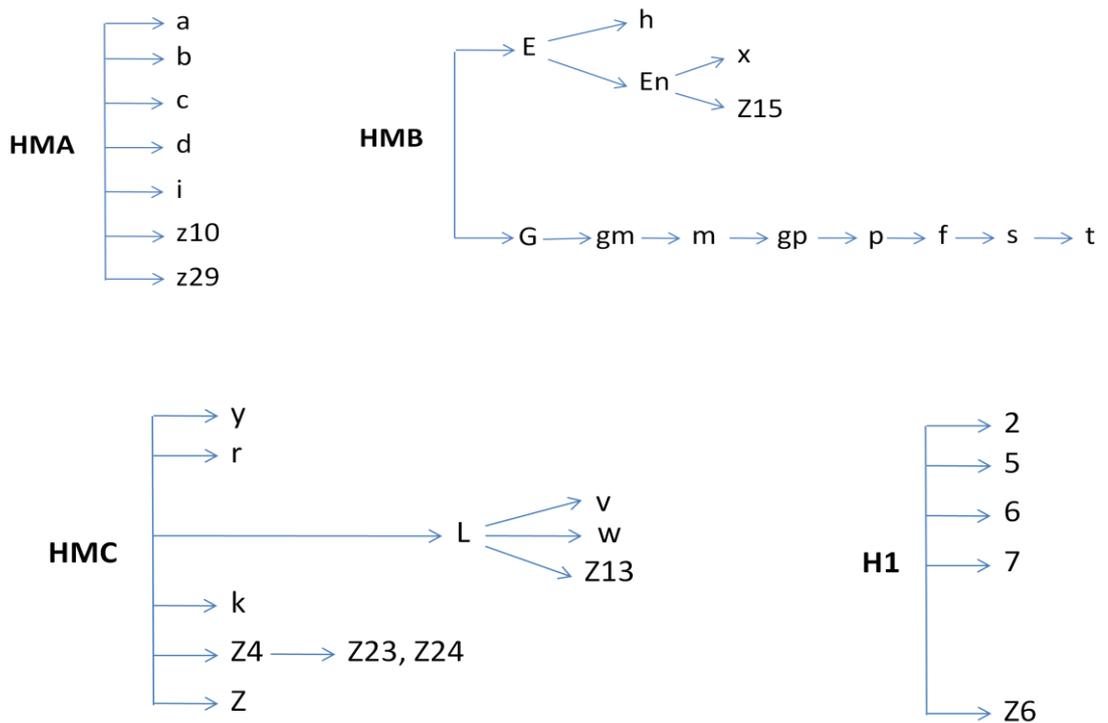


Figure 4.16 : Schéma du sérotypage [144].

Le protocole de confirmation sérologique opérée sur chacune des souches de *Salmonella* isolée est résumé dans la figure 4.17 et figure 4.18.

#### 4.3.2.5. Étude de la sensibilité aux antibiotiques :

Toutes les souches de salmonelles identifiées biochimiquement et confirmées sérologiquement sont testées vis-à-vis de cinq (05) antibiotiques à notre disposition: Acide Nalidixique (NA), Gentamicine (CN), Ampicilline (AM), Tétracycline (TE), Triméthoprime/Sulfaméthoxazole (SXT) (Oxoid, Angleterre).

Nous avons utilisé la méthode des disques (antibiogramme standard) basée sur la diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton, selon la technique préconisée par le CLSI, recommandée par l'OMS et adoptée par le réseau national de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques.

##### 4.3.2.5.1. Antibiotiques testés :

Les antibiotiques utilisés, au nombre de 5, sont parmi ceux habituellement testés dans le cadre de la surveillance de la résistance aux antibiotiques du genre *Salmonella*. Les antibiotiques testés classés sur la base de leurs structures chimiques.

##### 4.3.2.5.2. Technique :

La gélose de Mueller-Hinton (MH) en surfusion est coulée dans des boîtes de Pétri de forme carrée ; il est impératif que l'épaisseur de la gélose soit égale à 4 mm. Laisser solidifier et sécher. L'inoculum est préparé dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile, à partir de la culture bactérienne obtenue sur gélose nutritive inclinée ; homogène, sa turbidité doit être équivalente à 0.5 McFarland, une valeur ajustée par un densimètre.

À l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, nous ensemençons à trois passages et en stries bien serrées, la surface gélosée bien séchée.

Les disques de papier filtre préimprégnés chacun d'une solution d'antibiotique différent, sont placés dans des distributeurs spécifiques, puis stérilement

appliqués à la surface de la gélose ensemencée. L'incubation s'effectue à 37°C et dure 18-24h.

#### 4.3.2.5.3. Lecture :

Pour chaque disque d'antibiotique, le diamètre de sa zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse métallique. Comparer nos résultats aux valeurs critiques, nous a permis de classer chaque souche de *Salmonella* spp. dans l'une des catégories cliniques : Résistante (R), Intermédiaire (I) ou Sensible (S). Son profil d'antibiorésistance est ainsi établi. Lorsqu'une souche exprime une résistance à au moins deux antibiotiques, qu'ils appartiennent à la même famille (résistance) ou à deux familles distinctes (résistance croisée), elle est dite multirésistante.

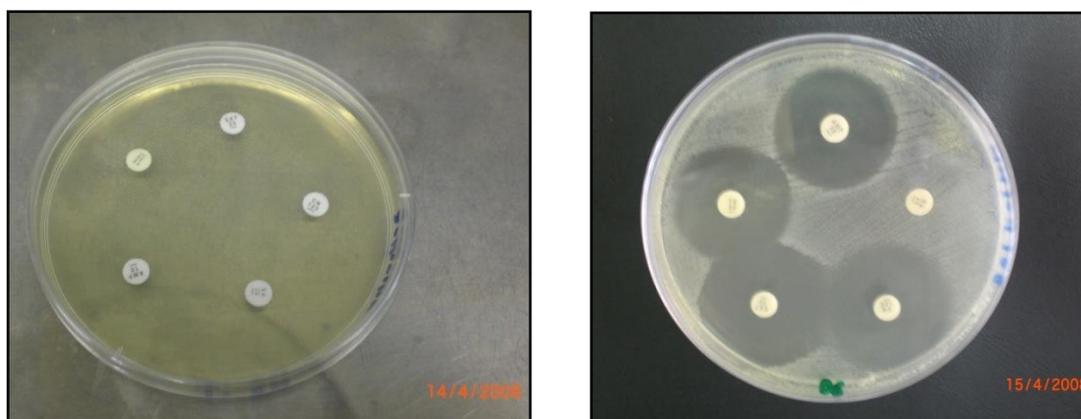


Figure 4.17: AntibioGramme : à gauche : ensemencement, à droite : résultats de la lecture après 24h [Photo personnelle]

#### 4.3.2.6. Conservation des souches de salmonelles :

Une fois la lecture du profil antibiotique effectuée, nous avons pu conserver chacune des souches de salmonelle isolée et sérotypée sur milieu gélosé en tube (milieu de conservation de l'Institut Pasteur).

Avec une pipette Pasteur bien chargée de culture pure obtenue sur gélose Mueller-Hinton, le milieu de conservation est ensemencé par piqûre centrale. Après une culture de 24 h à 37°C, bien le visser, l'étiqueter et le conserver à

l'obscurité et à température ambiante en évitant les trop fortes variations de température. La fréquence de repiquage : 6 mois à 1 an.

Tous les milieux de culture utilisés par la méthode classique sont préparés par le service des milieux de culture de l'Institut Pasteur d'Algérie (I.P.A), ils sont spécialement destinés pour cette étude et testés par des souches de références.

Les milieux et réactifs utilisés pour la méthode alternative sont fabriqués par le laboratoire Bio-Rad, France, acquis sous forme déshydratée et reconstitués au niveau du laboratoire central de la police scientifique.

#### 4.4. Base de données :

Les résultats des isolements, d'identification biochimique et sérologique, ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, ont été saisis dans une base de données en utilisant le Logiciel Excel, Office 2007.

Dans la présente étude nous avons recherché la présence ou l'absence de salmonelles sur les 360 prélèvements effectués, sans utiliser des tests statistiques.

#### 4.5. Résultats :

##### 4.5.1. 1<sup>ère</sup> étape : enquête sur terrain :

Les résultats de la fiche d'enquête d'abattage sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 4.6 : Résultats de la fiche d'enquête/abattage.

	Questions	OUI	NON
Personnel responsable d'abattage	Ramassage	5	
	Abattage : principe de marche en avant		5
	Salle d'abattage nettoyable	2	3
	Personne affectée à opération précise		5
	Tenue de travail		5
Saignée	Horizontale		5
	Verticale	5	
	Tenue		5
	Lâchée	5	
Plumaison	Echaudage		5
	Renouvellement de l'eau	2	3
	Etat de la machine		
	Egouttage		5
Eviscération	Couteau régulièrement nettoyé		5
	Gésier ouvert sur le site	2	3
	Viscère percés		5
	Contact des viscères avec la carcasse		5
Finition	Lavage		5
	Tête enlevée	5	
	Pattes enlevées	5	
	Carcasses transportées sous froid	3	2
Nettoyage et désinfection de la salle d'abattage	Utilisation du froid post-abattage	2	3
	Transport sous froid	3	3
	Empilement des carcasses		5

Les tueries sélectionnées se caractérisent par des locaux aménagés pour une unité de production. Généralement, le personnel responsable d'abattage ne respecte pas le principe de marche en avant sans tenue de travail notable. La saignée du poulet de chair est horizontale lâché. Les 5 tueries utilisent l'échaudage pour la plumaison dont 2 renouvellent l'eau et 3 la garde pour toute la bande abattue sans égouttage.

La finition consiste en un lavage dans un bac d'eau renouvelable selon l'appréciation du personnel, les têtes et pattes sont enlevées comme exigées par la réglementation (**Arrêté interministériel du 2 juillet 1995 relatif à la mise à la consommation des volailles abattues**). Trois tueries transportent les animaux finis sous froid et 2 à température ambiante vers les abattoirs de bovins pour une inspection vétérinaire puis vers les unités de vente.

#### 4.5.2. 2<sup>ème</sup> étape : Résultats du laboratoire :

Nous avons analysé 360 prélèvements issus de 5 tueries dont chacune 2 lots différents, répartis comme suit :

- 10 prélèvements d'eau d'échaudage ;
- 175 prélèvements de peau de cou ;
- 175 prélèvements de caeca.

#### 4.5.2.1. Méthode Classique :

4.5.2.1.1. Résultat des isollements : Le milieu Hektoen et XLD sont les plus souvent utilisés au niveau du laboratoire pour l'isolement des salmonelles.

- a) Milieux Hektoen : Les boîtes avec pousse de colonies bleu-vert à centre noir, colonies bleu-vert ou vertes, sont présomptives de Salmonelles.

Tableau 4.7 : Nombre de boîtes de pousse présumptive de *Salmonella* sur Milieu Hektoen par type de prélèvement.

Visites	Lot	Nombre de boîtes présomptives		
		Eau d'échaudage	Peau de cou	Caeca
1 <sup>ère</sup> visite	1	1	1	1
	2	0	0	1
	3	0	1	0
	4	0	0	0
	5	1	1	2
2 <sup>ème</sup> visite	6	0	0	0
	7	1	0	1
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	0	1	0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>

Nous avons retenu **13** boites de pousse présomptive de *Salmonella* sur milieux Hektoen, dont 3 boites de l'eau d'échaudage, 4 des peux de cou et 5 des caeca.

b) Milieux XLD : colonies rouges (roses) à centre noir.

Tableau 4.8 : Nombre de boites de pousse préemptive de *Salmonella* sur Milieu XLD par type de prélèvements.

visites	Lot	Nombre de boites présomptives		
		Eau d'échaudage	Peau de cou	Caeca
1 <sup>ère</sup> visite	1	0	1	1
	2	0	0	1
	3	0	0	0
	4	1	0	0
	5	0	1	1
2 <sup>ème</sup> visite	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	1	0	0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

Nous avons retenu **6** boites de pousse présomptive de *Salmonella* sur milieux XLD, dont 2 boites de l'eau d'échaudage, 2 des peux de cou et 3 des caeca.

Tableau 4.9 : Récapitulatif du nombre de boites de pousse préemptive de *Salmonella* sur Hektoen et XLD par type de prélèvements.

Type de prélèvements	Nombre de boites présomptives de <i>Salmonella</i>		Total
	HK	XLD	
Eau d'échaudage	3	2	<b>5</b>
Peau de cou	4	2	<b>6</b>
Caeca	5	3	<b>8</b>
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>19</b>

Au total nous avons observé des pousses présomptives de *Salmonella* dans 19 boites (12 sur milieux Hektoen et 7 sur XLD).

Trois colonies typiques de *Salmonella* sont prélevées à partir de chaque boite de milieu sélectif (HK et XLD) puis purifiées sur gélose nutritive (GN).

Après incubation à 37°C pendant 18-24h, les colonies mieux isolées, sont utilisées pour l'identification biochimique.

Tableau 4.10 : Nombre de colonies présomptives de salmonelles sur Hektoen et XLD par type de prélèvement.

Type de prélèvements	Nombre de colonies présomptives de <i>Salmonella</i>		Total
	Hektoen	XLD	
Eau d'échaudage	9	6	<b>15</b>
Peau de cou	12	6	<b>15</b>
Caeca	15	9	<b>24</b>
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>21</b>	<b>57</b>

Au total nous avons prélevé 57 colonies présomptives de *Salmonella* pour l'étude biochimique et sérologique dont 36 boites Du milieu HK et 21 du milieux XLD.

#### 4.5.2.1.2. Résultats de la galerie bichimique par type de prélèvement et milieu d'isolement :

##### a) Eau d'échaudage :

Tableau 4.11 : Résultats de la galerie biochimique des colonies présomptives *Salmonella* isolées de l'eau d'échaudage sur HK et XLD.

Type de prélèvement	Lots	Résultats <i>Salmonella</i>	
		<b>HK</b>	<b>XLD</b>
Eau d'échaudage	1	<b>confirmée</b>	Absence
	2	Absence	Absence
	3	Absence	Absence
	4	Absence	<b>confirmée</b>
	5	<b>confirmée</b>	Absence
	6	Absence	Absence
	7	Absence	Absence
	8	Absence	Absence
	9	Absence	Absence
	10	Absence	Absence
<b>Total</b>	10	<b>2</b>	<b>1</b>

Nous avons confirmé 3 isolats de *Salmonella* sur les 15 colonies présomptives provenant des 10 prélèvements d'eau d'échaudage effectués.

3 vrais positif et 12 faux positifs.

Nous constatons que 3 lots sur 10 sont contaminés par des salmonelles.

b) Peau de cou:

Tableau 4.12 : Résultats de la galerie biochimique des colonies présumptives *Salmonella* sur Hektoen et XLD isolées des peaux de cou.

Type de prélèvement	Lots	Résultats <i>Salmonella</i>	
		HK	XLD
Peaux de cou	1	Absence	Absence
	2	Absence	Absence
	3	<b>confirmée</b>	Absence
	4	Absence	Absence
	5	Absence	Absence
	6	Absence	Absence
	7	Absence	Absence
	8	Absence	Absence
	9	Absence	Absence
	10	Absence	Absence
<b>Total</b>	10	<b>1</b>	<b>0</b>

Nous avons confirmé un isolats positifs pour *Salmonella* sur les 18 colonies présumptive provenant des 175 prélèvements de peau de cou effectués.

Nous constatons un vrai positif et 17 faux positifs.

1 lot sur 10 est contaminés par *Salmonella*.

c) Les caeca:

Tableau 4.13: Résultats de la galerie biochimique des colonies présumptives *Salmonella* isolées des caeca.

Type de prélèvement	Lots	Résultats <i>Salmonella</i>	
		HK	XLD
Caeca	1	Absence	<b>confirmée</b>
	2	Absence	Absence
	3	Absence	Absence
	4	Absence	Absence
	5	<b>confirmée</b>	Absence
	6	Absence	Absence
	7	Absence	Absence
	8	Absence	Absence
	9	Absence	Absence
	10	Absence	Absence
<b>Total</b>	10	<b>1</b>	<b>1</b>

Nous avons confirmé deux isolats positifs de *Salmonella* sur 24 colonies présomptives provenant des 175 prélèvements de peau de cou effectués.

Nous constatons 2 vrai positifs et 22 faux positifs.

2 lots sur 10 sont contaminés par *Salmonella*.

Tableau 4.14 : Récapitulatif de la galerie biochimiques par lots et type de prélèvements.

Visites	Lots	Résultats de la galerie biochimique des <i>Salmonella spp.</i>		
		Eau d'échaudage	Peaux de cou	Caeca
1 <sup>ère</sup> Visite	1	<b>confirmée</b>	Absence	<b>confirmée</b>
	2	Absence	Absence	Absence
	3	Absence	<b>confirmée</b>	Absence
	4	<b>confirmée</b>	Absence	Absence
	5	<b>confirmée</b>	Absence	<b>confirmée</b>
2 <sup>ème</sup> visite	6	Absence	Absence	Absence
	7	Absence	Absence	Absence
	8	Absence	Absence	Absence
	9	Absence	Absence	Absence
	10	Absence	Absence	Absence
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

La méthode classique nous a permis d'identifier 6 isolats de salmonelles sur 57 colonies présomptives isolées sur le milieu Hektoen et XLD.

Tableau 4.15 : Récapitulatif de nombre de salmonelles confirmées par galerie biochimique selon les deux milieux Hektoen et XLD.

Type de prélèvements	Nombre d'isolats de salmonelles confirmées	
	<b>HK</b>	<b>XLD</b>
Eau d'échaudage	2	1
Peau de cou	1	0
Caeca	1	1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

4 isolats de salmonelles sont confirmés sur milieu Hektoen et 2 isolat sur milieu XLD des 6 isolats identifiés par la méthode classique. Nous remarquons que nous avons isolé plus de salmonelles sur Hektoen que sur le milieu XLD.

Tableau 4.16 : Récapitulatif de nombre de vrais et faux positifs par type de prélèvement.

Type de prélèvements	Nombre de colonies présomptives de Salmonelles	Nombre de Vrais positifs	Nombre de Faux positifs
Eau d'échaudage	15	3	12
Peau de cou	18	1	17
Caeca	24	2	22
Total	57	<b>6</b>	<b>51</b>

Sur 57 colonies préemptives nous avons confirmé biochimiquement 6 isolats de *Salmonella* considérés comme vrais positifs et 51 colonies confirmées biochimiquement négatives pour *Salmonella*.

Tableau 4.17: Récapitulatif du nombre de *Salmonella* isolées par type de prélèvement par la méthode classique.

Type de prélèvements	Nombre de salmonelles isolées
Eau d'échaudage	3
Peau de cou	1
Caeca	2
Total	<b>6</b>

La méthode classique nous a permis d'isoler et identifier 6 isolats de salmonelles, dont 3 à partir de l'eau d'échaudage, 1 des peaux de cou et 2 des caeca, nous remarquons que nous avons identifié plus d'isolats à partir de l'eau d'échaudage.

#### 4.5.2.2. Méthode alternative :

##### 4.5.2.2.1 Résultats des isolements sur milieu chromogénique RAPID' *Salmonella* :

Les salmonelles se présentent sous forme de colonies caractéristiques de couleur magenta (mauves) facile à identifier.

Tableau 4.18. : Nombre de boîtes de pousse caractéristique de *Salmonella* sur milieu chromogénique RAPID' *Salmonella* par type de prélèvements.

Visites	Lots	Nombre de boîtes caractéristiques		
		Eau d'échaudage	Peau de cou	Caeca
1 <sup>ère</sup> Visite	1	1	1	1
	2	0	0	0
	3	0	1	0
	4	1	0	1
	5	1	1	1
2 <sup>ème</sup> visite	6	1	0	0
	7	0	1	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	1	0	0
Total	10	5	4	3

Au total, nous avons observé des pousses caractéristiques (Colonies magenta) dans 12 boîtes du milieu Chromogénique RAPID' *Salmonella*, 1 colonie caractéristique et prélevée et ensemencé sur gélose nutritive.

Tableau 4.19 : Nombre de colonies caractéristiques de *Salmonella* de couleur magenta isolées sur milieu RAPID' *Salmonella* par type de prélèvement.

Type de prélèvements	Nombre de colonies magenta sur RAPID' <i>Salmonella</i>
Eau d'échaudage	5
Peau de cou	4
Caeca	3
Total	12

Au total, nous avons prélevé 12 colonies caractéristiques de salmonelles pour l'étude biochimique et sérologique.

Nous remarquons que nous avons retenu 5 colonies de l'eau d'échaudage, 2 des peaux de cou et 3 des caeaca.

#### 4.5.2.2.2. Résultats de la galerie biochimique par type de prélèvement:

##### a) Eau d'échaudage :

Tableau 4.20 : Résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de *Salmonella* isolées de l'eau d'échaudage.

Type de prélèvement	Lots	Résultats
Eau d'échaudage	1	<b>confirmée</b>
	2	Absence
	3	Absence
	4	<b>confirmée</b>
	5	<b>confirmée</b>
	6	<b>confirmée</b>
	7	Absence
	8	Absence
	9	Absence
	10	<b>confirmée</b>
Total	10	5

Nous avons confirmé 5 isolats de salmonelles sur 5 colonies caractéristique provenant des 10 prélèvements d'eau d'échaudage effectués.

Nous constatons que 5 lots sur 10 sont contaminés par *Salmonella*.

Toutes les colonies sont considérée comme vrais positifs.

##### b) Peau de cou:

Tableau 4.21 : Résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de *Salmonella* isolées des peaux de cou.

Type de prélèvements	Lots	Résultats
Peau de cou	1	<b>confirmée</b>
	2	Absence
	3	<b>confirmée</b>
	4	Absence
	5	<b>confirmée</b>
	6	Absence
	7	<b>confirmée</b>
	8	Absence
	9	Absence
	10	Absence
Total	10	<b>4</b>

Nous avons confirmé 4 isolats positifs pour salmonelles sur les 4 colonies caractéristiques provenant des 175 prélèvements de peau de cou effectués. Nous constatons que 4 lots sur 10 sont contaminés par *Salmonella*.

c) Les caeca:

Tableau 4. 22 : Résultats de galerie biochimique des colonies caractéristiques de *Salmonella* isolées des caeca.

Type de prélèvements	Lots	Résultats
Caeca	1	<b>confirmée</b>
	2	Absence
	3	Absence
	4	<b>confirmée</b>
	5	<b>confirmée</b>
	6	Absence
	7	Absence
	8	Absence
	9	Absence
	10	Absence
Total	10	<b>3</b>

Nous avons confirmé 3 isolats positifs pour salmonelles sur les 3 colonies caractéristiques provenant des 175 prélèvements de peau de cou effectués. Nous constatons que 3 lots sur 10 sont contaminés par *Salmonella*.

Tableau 4.23 : Récapitulatif de la galerie biochimiques des isolats de salmonelles par lots et type de prélèvements.

Visites	Lots	Résultats pour <i>Salmonella</i>		
		Eau d'échaudage	Peaux de cou	Caeca
1 <sup>ère</sup> Visite	1	<b>confirmée</b>	<b>confirmée</b>	<b>confirmée</b>
	2	Absence	Absence	Absence
	3	Absence	<b>confirmée</b>	Absence
	4	<b>confirmée</b>	Absence	<b>confirmée</b>
	5	<b>confirmée</b>	<b>confirmée</b>	<b>confirmée</b>
2 <sup>ème</sup> visite	6	<b>confirmée</b>	Absence	Absence
	7	Absence	<b>confirmée</b>	Absence
	8	Absence	Absence	Absence
	9	Absence	Absence	Absence
	10	<b>confirmée</b>	Absence	Absence
Total	10	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

Nous avons confirmé 5 isolats de salmonelles sur l'eau d'échaudage, 4 sur les peaux de cou et 3 sur les Caeca. Nous remarquons que l'eau d'échadage est le prélèvement où on a identifié le plus de salmonelles.

Tableau 4.24 : Récapitulatif de nombre de vrais et faux positifs par type de prélèvement.

Type de prélèvements	Nombre de colonies présumptives de Salmonelles	Nombre de Vrais positifs	Nombre de Faux positifs
Eau d'échaudage	5	5	0
Peau de cou	4	4	0
Caeca	3	3	0
Total	12	12	0

Nou remarquons que les 12 colonies présumptives de salmonelles sont toutes confirmées positives, acun faux positif à noter.

Tableau 4.25: Récapitulatif des isolats de salmonelles confirmés par les deux méthodes

Type de prélèvement	Nombre de colonies confirmées <i>Salmonella</i>	
	Méthode Classique	Méthode alternative
Eau d'échaudage	3	5
Peaux de cou	1	4
Caeca	2	3
Total	<b>6</b>	<b>12</b>

Au total nous avons retrouvé 18 isolats de salmonelles avec les deux méthodes, 6 isolats avec la méthode classique et 12 isolats avec la méthode alternative.

#### 4.5.2.3 Résultats de l'identification sérologique:

##### 4.5.2.3.1 Résultats du sérotypage des isolats de salmonelles par la méthode classique

Tableau 4.26 : Sérotypage de salmonelles isolées par type de prélèvement.

Sérotypes	Eau d'échaudage	Peau de cou	Caeca
S. Hadar	2	0	0
S. Infantis	0	1	0
S. Typhimurium	1	0	0
S. spp	0	0	2
TOTAL	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Trois isolats de salmonelles ont été sérotypés et deux n'ont pas pu être sérotypés, vu le manque de sérums monovalents.

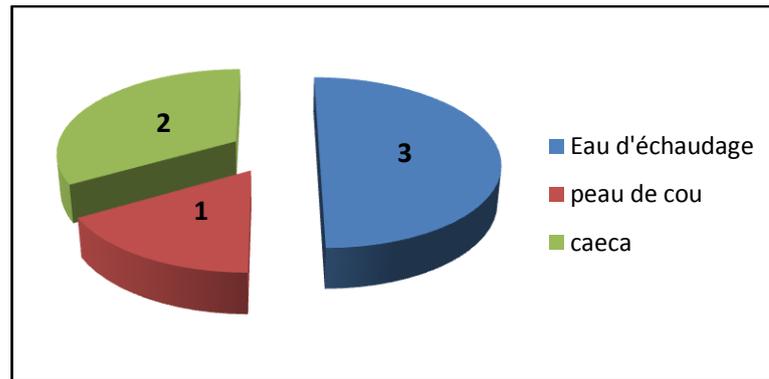


Figure 4. 20 : Fréquence des salmonelles par type de prélèvement isolées par la méthode classique.

Nous remarquons que les isolations sont plus fréquentes à partir de l'eau d'échaudage avec 3 isolats suivi des caeca avec deux isolats et enfin un seul isolat à partir des peaux de cou. Les isolats de salmonelles issus de l'eau d'échaudage et des peaux de cou sont sérotypés et ceux issus des caeca ne sont pas sérotypés.

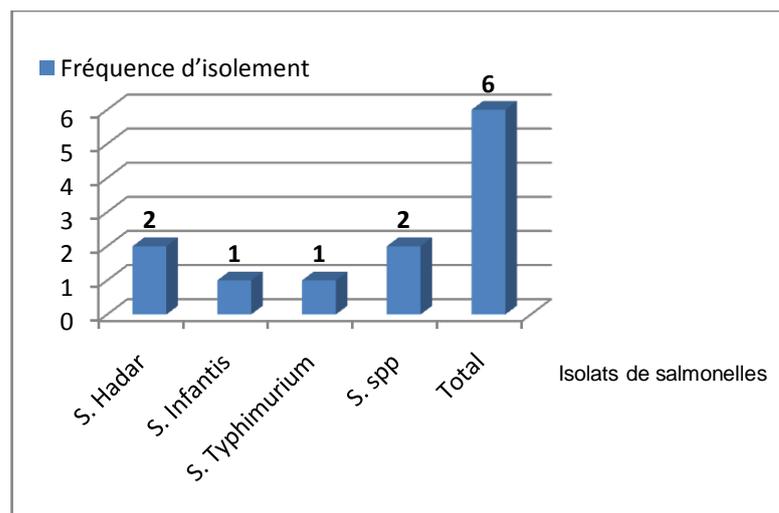


Figure 4.21 : Fréquence d'isolement des sérotypes par la méthode classique

Au total 3 sérotypes ont été identifiés par la méthode classique, *S. Hadar* (n=2), *S. Infantis* (n=1) et *S. Typhimurium* (n=1). Le sérotype *S. Hadar* a été isolé deux fois comparé aux deux sérotypes *S. Infantis* et *S. Typhimurium* qui ne sont isolés qu'une seule fois. Sur les 6 isolats de salmonelles nous n'avons sérotypé que 4.

Tableau 4.27 : Récapitulatif du sérotypage des isolats, par visite, lot et type de prélèvement isolés par la méthode classique.

Visites	Lots	Type de prélèvement	Isolats sérotypés et non sérotypés					
			<b>S. Hadar</b>	<b>S. Infantis</b>	<b>S. Virchow</b>	<b>S. Typhimurium</b>	<b>S. Enteritidis</b>	<b>S. spp</b>
1 <sup>ère</sup> visite	LOT 1	eau d'échaudage	<b>1</b>	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	<b>1</b>
	LOT 2	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT3	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	<b>1</b>	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 4	eau d'échaudage	0	0	0	<b>1</b>	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 5	eau d'échaudage	<b>1</b>	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	<b>1</b>
2 <sup>ème</sup> Visite	LOT 6	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 7	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 8	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 9	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 10	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	<b>0</b>	0	0	0	0	0
<b>Total par sérotype</b>			<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>

#### 4.5.2.3.2. Résultats du sérotypage des isolats de salmonelles par la méthode alternative :

Tableau 4.28: Sérotypage des isolats de samonelles par type de prélèvement.

Sérotypes	Eau d'échaudage	Peau de cou	caeca
<b>S. Hadar</b>	3	0	1
<b>S. Infantis</b>	0	2	1
<b>S. Virchow</b>	0	1	0
<b>S. Typhimurium</b>	1	0	0
<b>S. Enteritidis</b>	0	1	0
<b>S. spp</b>	1	0	1
TOTAL	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

Nous remarquons que la fréquence des isolements des salmonelles sont de 5 isolats à partir de l'eau d'échaudage, 4 isolats à partir des peaux de cou et 3 isolats à partir des caeca.

Au total 5 sérotypes ont été identifiés par la méthode alternative. S. Hadar S. Infantis, S. Virchow, S. Typhimurium et S. Enteritidis.

Deux isolats non sérotypés par manque de sérums monovalents.

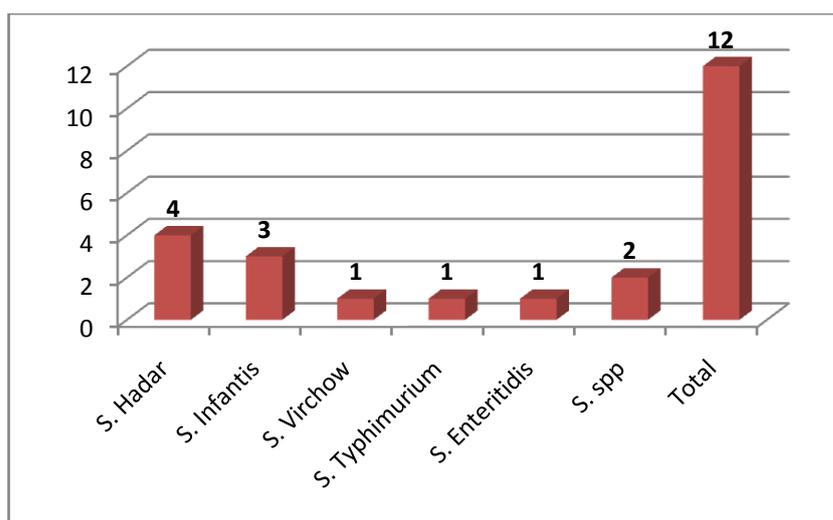


Figure 4.22 : Fréquence d'isolement des sérotypes par la méthode alternative.

Nous remarquons que la fréquence d'isolement des sérotypes par la méthode alternative est par ordre décroissant : S. Hadar (n=4), S. Infantis (n= 3), S. Virchow, S. Typhimurium et S. Enteritidis (n=1).

La méthode alternative nous permis d'isoler un total de 12 salmonelles, 10 sérotypées et deux non sérotypés.

Tableau 4.29 : Récapitulatif du sérotypage des isolats, par visite, lot et type de prélèvement isolés par la méthode alternative.

Visites	Lots	Type de prélèvement	Isolats sérotypés et non sérotypés					
			<b>S. Hadar</b>	<b>S. Infantis</b>	<b>S. Virchow</b>	<b>S. Typhimurium</b>	<b>S. Enteritidis</b>	<b>S. spp</b>
1 <sup>ère</sup> visite	LOT 1	eau d'échaudage	<b>1</b>	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	<b>1</b>	0
		caeca	0	0	0	0	0	<b>1</b>
	LOT 2	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT3	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	<b>1</b>	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 4	eau d'échaudage	0	0	0	<b>1</b>	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	<b>1</b>	0	0	0	0	0
	LOT 5	eau d'échaudage	<b>1</b>	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	<b>1</b>	0	0	0	0
		caeca	0	<b>1</b>	0	0	0	0
2 <sup>ème</sup> Visite	LOT 6	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	<b>1</b>
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 7	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	<b>1</b>	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 8	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 9	eau d'échaudage	0	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
	LOT 10	eau d'échaudage	<b>1</b>	0	0	0	0	0
		peau de cou	0	0	0	0	0	0
		caeca	0	0	0	0	0	0
<b>Total par sérotype</b>			<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

Tableau 4.30 : Nombre total des sérotypes isolés par les deux méthodes.

Sérotypes	Méthode Classique	Méthode Alternative
<b>S. Hadar</b>	2	4
<b>S. Infantis</b>	1	3
<b>S. Virchow</b>	0	1
<b>S. Typhimurium</b>	1	1
<b>S. Enteritidis</b>	0	1
<b>Total</b>	4	10

Nous avons isolé 3 sérotypes par la méthode classique et 5 sérotypes par la méthode alternative, nous constatons que les sérotypes isolés par la méthode classique sont également isolés par la méthode alternative, et deux sérotypes isolés par la méthode alternative non isolés par la méthode classique.

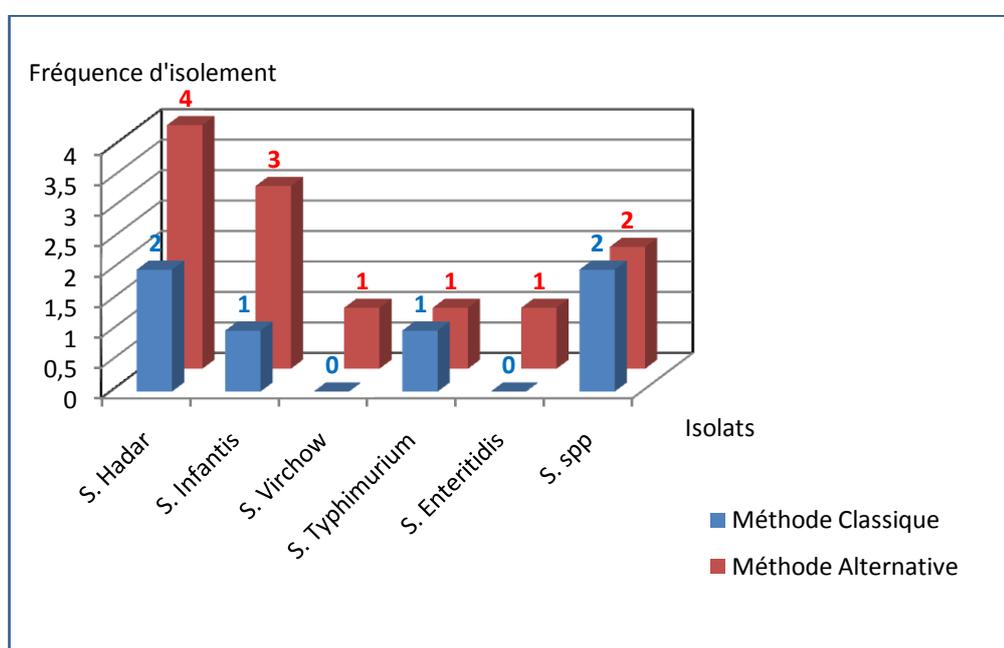


Figure 4.23 : Fréquence des isolements par les deux méthodes, classique et alternative

Nous remarquons que *S. Hadar* est le sérotype le plus fréquemment isolés par les deux méthodes ( $n=2$  par la méthode classique et  $n=4$  par la méthode alternative). Les sérotypes isolés par la méthode classique sont isolés par la méthode alternative et deux sérotypes (*S. Virchow* et *S. Enteritidis*), ne sont isolés que par la méthode alternative.

#### 4.5.2.4. Étude de la sensibilité des sérotypes isolées aux antibiotiques :

Nous avons testé 5 antibiotiques sur chacun des 10 isolats sérotypés, les isolats non sérotypés n'ont pas été testés quant à leur sensibilité aux antibiotiques. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau 4.31.

Il importe de rappeler que la lecture des diamètres des zones d'inhibition n'a pas été effectuée de manière automatisée.

Tableau 4.31 : Caractéristiques de l'antibio-résistance des sérotypes isolés.

Antibiotiques	Sérotypes				
	S. Hadar	S. Infantis	S. Virchow	S. Typhimurium	S. Enteritidis
Acide Nalidixique (NA)	S	3R	S	R	S
Gentamicine (GM)	S	S	S	S	S
Ampicilline (AM)	S	S	S	S	S
Tétracycline (TE)	2R, 2S	S	S	S	S
Triméthoprimé/ Sulfaméthoxazole (SXT)	S	S	S	S	S

S. Hadar : 2 souches étaient résistantes aux tétracyclines et 2 autres sont sensibles à l'acide Nalidixique, Gentamicine, ampicilline et Triméthoprimé/Sulfaméthoxazole.

S. Typhimurium : 1 souches étaient résistantes à l'acide Nalidixique.

S. Infantis : les 3 souches étaient résistantes à un seul antibiotique (acide Nalidixique) et sensible aux autres.

S. Virchow : 1 souche ne présentait aucune résistance.

S. Enteritidis : 1 souche était sensible à tous les antibiotiques testés.

#### 4.6. Discussion :

En Algérie, les services vétérinaires signalent de manière régulière de nombreux foyers de salmonellose dispersés sur les différentes wilayas du pays.

En 2006, le bulletin sanitaire vétérinaire déclare 26 foyers à *Salmonella* Enteritidis, contre 21 foyers en 2005 [78] et 19 foyers en 2004, mais aussi à *Salmonella* Typhimurium, ils sont répartis sur différentes régions du nord du pays et touchant des poussins et des poulets de chair, des poulettes démarrées et poules pondeuses [76]. Constituant ainsi un danger potentiel pour le consommateur et pour le cheptel avicole national.

Il est à souligner également que 93% du potentiel d'abattage du poulet de chair en Algérie est pris en charge par le circuit privé. Ces structures, échappent souvent aux contrôles sanitaires [138].

Cette situation inquiétante nous a incité à mener notre étude ciblant le poulet de chair. Cette dernière s'est déroulée en deux étapes : en premier, une pré-enquête sur le terrain pour relever l'état d'hygiène des structures d'abattage et en deuxième lieu, de rechercher le germe *Salmonella spp.* avec deux méthodes.

##### 1<sup>ère</sup> étape : sur terrain

Nous avons mené une pré-enquête au niveau des tueries avicoles privées de la wilaya de Blida. Les communes touchées sont CHIFFA, BOUFARIK et BOUGARA, vue leur distribution géographique dont Chiffa se situe à l'Ouest, Boufarik au centre et Bougara à l'Est. Dans chaque commune nous avons ciblé deux tueries. Nous n'avons pu accéder qu'à 5 tueries, qui ont accepté de participer à cette étude, ce qui représente un taux de couverture de 13 % sur les 38 tueries existantes au niveau de la wilaya.

Une fiche d'enquête a été élaborée pour évaluer l'état hygiénique de ces structures d'abattage, remplie au cours de la première visite de chaque tuerie.

Nous relevons d'abord que l'emplacement des tueries étudiées ne répond pas aux exigences de la législation en matière d'urbanisme et ne tient pas compte de l'environnement.

Le fonctionnement de ces tueries est jugé anarchique, désordonné et non hygiénique, ne respectant pas les règles universelles de fonctionnement des structures d'abattage. En effet, toutes les étapes sont manuelles, l'échaudage n'est pas approprié car la température n'est pas contrôlée, l'eau n'est pas renouvelée et les ruptures des viscères sont très fréquentes. Le sang n'est pas récupéré et rejeté avec les eaux usées. Les intestins, plumes et autres déchets ne sont pas collectés, ni détruits mais jetés dans les décharges publiques.

L'hygiène est jugée déplorable pour la plupart des tueries car les opérations de nettoyage et de désinfection sont insuffisantes par manque d'eau et souvent absence de désinfectants. Le personnel n'est pas sensibilisé sur les dangers qu'il encoure ni sur l'importance de l'hygiène. Les ouvriers travaillent avec des effets vestimentaires qui ne sont pas spécifiques et non appropriés, le manque d'eau ne permettant pas des lavages fréquents des mains.

L'inspection post mortem s'effectue en début de matinée, dans des conditions peu pratiques, la volaille abattue est généralement transportée vers les abattoirs de bovins où le bureau du vétérinaire inspecteur pour y effectuer une inspection sanitaire d'ensemble.

### 2<sup>ème</sup> étape : au laboratoire

Nous avons recherché le germe *Salmonella* par deux méthodes, une méthode classique de routine, largement utilisée au niveau de la plupart des laboratoires vétérinaires régionaux et laboratoire de contrôle de qualité alimentaire, et une méthode alternative validée ISO 16 140.

Pour cette recherche nous avons choisi trois types de prélèvements :

- Eau d'échaudage : responsable d'une contamination assez homogène des carcasses de poulet de chair.
- Peaux de cou : le plus facile; ne déprécie pas la carcasse avec une bonne représentativité car l'essentiel de la contamination est sur la peau.
- Caeca : nous renseignent sur une éventuelle contamination de l'élevage d'origine.

Les trois types de prélèvements sont soumis au froid, l'eau d'échaudage est réfrigérée puis analysée le plus tôt possible, les peaux de cou et caeca sont congelés pour analyse ultérieure, ce qui pourrait détruire une partie (entre 50 et 90%) des *Salmonella*, d'où possibilité de sous-estimation du nombre de positifs (Daube, communication personnelle).

Chaque prélèvement a été analysé par les deux méthodes, comme suit :

#### Pré-enrichissement en milieu liquide :

Cette phase est commune pour les deux méthodes, elle est destinée à revivifier les cellules bactériennes lésées (stressées par le transport et la congélation), en utilisant l'eau peptonnée tamponnée (EPT).

#### Enrichissement sélectif sur milieu liquide et semi solide:

Dans la méthode classique, l'enrichissement sélectif sur milieu liquide est effectué sur le bouillon au sélénite de sodium enrichi en cystine (SC) et un disque d'additif SFB, puisensemencé avec 1ml de la culture de pré-enrichissement.

Dans la méthode alternative, l'utilisation du milieu RVS et modifié Semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) est fondé sur la capacité des espèces de *Salmonella* de se reproduire et d'être mobiles dans le milieu après incubation à 41,5°C sous des conditions adéquate d'humidité [131, 132, 133].

Par comparaison aux autres milieux d'isolements le MSRVS donne une amélioration de plus de 500 fois pour la détection de S.E.[141]. Ce milieu peut réduire de 24 heures le temps requis pour l'identification d'un échantillon positif comparativement à la méthode conventionnelle de culture [132], dans laquelle l'enrichissement sélectif utilisant le milieu Sélénite Cystine (SC) ne donne aucune indication sur le genre bactérien après 24 heures d'incubation.

En effet, SCHÖNENBRÜCHER, V. *et al.* ont démontré en 2008 [134] dans des conditions expérimentales, que le milieu Semi-solide de Rappaport-Vassiliadis est le plus sélectif (97,4%) comparé au milieu au Tétrathionate de Novobiocine (MKTTn, 94,9%) et Sélénite Cystine ( 38,5%).

Cependant l'inconvénient de ce milieu de culture est de ne pas pouvoir isoler les souches immobiles S.G.P et d'inhiber partiellement ST. (Zdragas et al., 2000). Au cas où l'isolement de S.G.P est demandé [141].

#### Isolement sélectif sur milieux solides:

La méthode classique utilise le milieu Hektoen et XLD ensemencés par une culture de 24h à partir du bouillon au sélénite de sodium.

Les colonies présomptives de *Salmonella spp.* apparaissent sur le milieu Hektoen de couleur bleu-vert à centre noir, colonies bleu-vert ou vertes (la plupart des souches sont à centre noir ou sur toute la surface) et sur milieu XLD, colonies rouges (roses) à centre noir.

En effet, les colonies présomptives de *Salmonella spp.* lactose négatif et H<sub>2</sub>S positif, sont ensemencés sur milieu TSI suivi de galerie biochimique et sérotypage. Néanmoins, certains sérotypes de *Salmonella spp.* fermentent le lactose avec ou sans production d'H<sub>2</sub>S. Ces colonies passent souvent inaperçues au technicien de laboratoire, ce qui augmente le taux de faux négatifs des prélèvements analysés [138].

L'isolement par la méthode alternative est effectué sur le milieu RAPID'*Salmonella*. Le principe de ce dernier repose sur la mise en évidence de deux activités enzymatiques. Les *Salmonella spp.* se présentent sous forme de colonies caractéristiques de couleur magenta (détection C8 estérase), facile à identifier [134, 135, 136]. Une contre sélection est utilisée pour faire apparaître les autres genres bactériens avec une coloration différente.

RAPID'*Salmonella* permet la détection des salmonelles mobiles et immobiles, ainsi que les *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi [134, 135, 137].

Sur ce milieu, les colonies de *Salmonella* sont facilement repérables et ne nécessitent pas un deuxième repiquage, comparativement au milieu Hektoen, dont les colonies de *Salmonella* peuvent apparaître gris bleu avec ou sans centre noir, parfois de très petites colonies vertes à transparentes souvent confondues

avec les colonies de *Proteus* ou masquées par celles de *E. Coli*, ce qui conduit à l'apparition de faux négatif.

Les milieux chromogènes se sont montrés plus spécifiques à 24 h d'incubation que la gélose Hektoen. [142]. Ces milieux peuvent diminuer le temps d'identification des salmonelles. [143] ; et surtout l'ABC medium qui est très spécifique aux *Salmonella spp.* dans les selles. [135].

Dans notre étude, la méthode classique nous a permis de prélever 57 colonies présomptives de Salmonelles pour l'étude biochimique et sérologique sur les 360 prélèvements analysés. Alors que, la méthode alternative a mis en évidence 12 colonies caractéristiques de *Salmonella*.

#### Galerie biochimique:

À partir des 57 colonies présomptives analysées, 6 isolats de salmonelles sont confirmées par la galerie biochimique API 20E, ce qui représente 6 vrais positifs sur 57 (6/57).

Alors que, les 12 colonies caractéristiques isolées sur le milieu RAPID' *Salmonella* sont toutes confirmées *Salmonella* par la galerie biochimique API 20E, ce qui représente 100% de vrais positifs (12/12).

La méthode classique nous a permis d'isoler 6 isolats de salmonelles confirmées, alors qu'avec la méthode alternative, nous avons isolés 12 isolats de de salmonelles confirmées sur les même 360 prélèvements analysés.

Pour la méthode classique, l'analyse des 57 colonies présomptives, par la galerie biochimique a demandé l'utilisation de 72 plaques de la galerie API 20E avec un coût moyen de 1000 DA la plaque, alors que pour la méthode alternative, nous avons utilisé 17 plaques de la galerie API 20E.

En effet, Deirdre *et al.* en 2010 [139], dans une étude comparative de l'isolement des salmonelles en utilisant la méthode de routine avec le SC pour l'enrichissement sélectif suivi d'un isolement sur milieu Hektoen comparé à l'utilisation d'un milieu Chromogénique CHROMSal., a permis de réduit le coût

global des analyses bactériologiques pour la recherche de *Salmonella* spp de 67 000 dollars/an.

#### Sérotypage et type de prélèvements :

Nous avons sérotypé 3 sérotypes par la méthode classique et 5 sérotypes par la méthode alternative, nous constatons que les sérotypes isolés par la méthode classique sont également isolés par la méthode alternative, il s'agit du même sérotype isolé du même prélèvement.

Néanmoins, nous avons noté deux sérotypes isolés par la méthode alternative non isolés par la méthode classique.

La méthode classique nous a permis d'identifier 3 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=2), *S. Infantis* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1).

La méthode alternative nous a permis d'identifier 5 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=4), *S. Infantis* (n=3), *S. Virchow* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1) et *S. Enteritidis* (n=1).

Dans notre étude, nous avons choisi trois types de prélèvements, la fréquence des isolements des isolats de salmonelles par type de prélèvement est par ordre décroissant : 5 isolats de l'eau d'échaudage, 4 isolats des peaux de cou et 3 isolats des caeca, cela pourrait s'expliquer par la congélation des peaux de cou et caeca et l'analyse rapide de l'eau d'échaudage après réfrigération.

#### Evaluation du taux de contamination :

Sur les 360 prélèvements, nous avons isolé 12 isolats de Salmonelles, ce qui porte le taux de contamination global à 3,33%.

Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par EIGROUD *et al.* en 2009 [144] qui est de 3,62% (soit 25 isolats sur 590 prélèvements) au niveau des abattoirs et tueries avicoles de la wilaya de Constantine. Alors que Ayache *et al.* [145] en 2010 retrouve un taux de contamination de 9,28% dans les abattoirs et tueries avicoles de la wilaya de Batna.

Les sérovars qui ont été les plus fréquemment isolés lors de notre étude sont par ordre de fréquence décroissant : *S. Hadar* (40%), *S. Infantis* (30 %), *S. Typhimurium*, *S. Virchow* et *S. Enteritidis* (10%).

Toutefois, plusieurs études ont avancé des taux de contamination différents variant considérablement selon la période et la saison, le pays, la nature du prélèvement, la méthode d'échantillonnage, le nombre et la fréquence des prélèvements ainsi que la technique d'isolement et d'identification [25 ; 71 ; 81 ; 126].

Il serait par conséquent, plus prudent d'être réservé quant à l'établissement de conclusions et de comparaisons hâtives.

ABOUN et coll.(2003) [146], à l'institut Pasteur d'Alger, rapportent une étude de 1998 à 2002 portant sur 1759 lots de prélèvements, soit 51826 échantillons, provenant des secteurs étatiques et privés et des 3 régions du pays (centre, est et ouest) a permis l'isolement de 232 souches durant les 5 années, dont :

- 112 souches (48,28 %) de *S. Enteritidis*,
- 27 souches (11,64 %) de *S. Virchow*,
- 26 souches (11,21 %) de *S. Pullorum-Gallinarum*,
- 14 souches (6,03 %) de *S. Hadar* et *S. Livingstone*,
- 5 souches (2,15 %) de *S. Dublin*,
- 4 souches (1,72 %) de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Isangui*, *S. Brunei*
- 3 souches (1,29 %) de *S. Senftenberg*, *S. Montevideo*, *S. Brunei*, *S. Newport* et d'autres sérotypes à des pourcentages inférieurs à 1 %.

Ces résultats sont obtenus sur des prélèvements de diverses natures organes de volailles (foie, rate, cœur, grappe ovarienne, intestins, poumons), œufs, aliments, éclosiers, litières et fientes, des différentes régions du pays, et de différents types de productions aviaires (reproducteurs chair et ponte, poulet de chair, pondeuses, poussins et œufs).

La méthode de recherche est la méthode classique qui consistait en un enrichissement sur bouillon sélénite-cystéine ou par re-vivification pendant 24h sur bouillon lactose mannitol tamponné, puis enrichissement sur bouillon sélénite-cystéine pour les échantillons d'aliments. L'isolement est réalisé sur gélose

Hektoen, ou gélose S-S (shigelle-salmonelle). L'identification biochimique est faite grâce aux galeries classiques et le sérotypage selon le schéma de Kauffmann-White.

BOUDILMI et coll. (1997) [95] rapportent dans une étude rétrospective sur 9 ans (1988-1996) dans la région Ouest de l'Algérie, où les prélèvements ont été effectués sur des animaux en majorité *Gallus gallus*, poussins ou adultes. Le foie, la rate et les intestins font l'objet d'un examen bactériologique par mise en culture en milieu d'enrichissement: bouillon nutritif au tetrathionate et au vert brillant, suivi d'un transfert sur gélose S.S. (*salmonella*-shigella) ou gélose Hektoen et enfin une identification morphologique, biochimique et sérotypique. 173 souches ont été isolées :

- *S. Gallinarum*-*Pullorum* représente près de 54 % (93 souches dont 3 sur des lots de volaille importées de Hongrie).
- *S. Enteritidis* constitue un peu plus de 12 % (21 souches, dont 2 sur des lots importés de Hongrie, 2 d'Espagne et 1 de France).
- *S. Arizonae* a été isolée 9 fois (5,2 %).

Pour les autres sérotypes, *S. Typhimurium* (5 souches), *S. Virchow* (4 souches), *S. Heidelberg* (3 souches), *S. Blockley*, *S. Infantis*, *S. Montevideo* (1 souche) et 34 souches (20%) n'ont pas pu être typées par manque de réactifs monovalents.

BENELMOUFFOK (1997), cité par ABOUN et coll.(2003) [146], durant la période 1988-1997, rapporte que la fréquence d'isolement de *S. Gallinarum*-*Pullorum* était de 18,94 %, suivie de *S. Enteritidis* (11,57 %), *S. Newport* (12,63 %), *S. Montevideo* (10,52 %), *S. Dublin* (7,63 %).

Au Maroc, MAAROUFI et coll., cité par ABOUN et coll. (2003) [146], pour la période de 1994 à 1998, ont isolé 179 souches, dont 105 souches de *S. Enteritidis* (59 %) et 11 souches (6 %) de *S. Pullorum*- *Gallinarum* et d'autres souches non complètement sérotypées.

*S. Hadar* est aussi le plus fréquemment isolé dans la filière volaille au Canada par CHAMBERS et coll. en 1998 [147], et en France par ROSE et coll. en 1999 [148] et BRISABOIS et coll. en 2006 [149]. Dans un récent rapport de l'autorité

européenne de sécurité des aliments (EFSA), il a été rapporté que S. Hadar est le sérotype le plus fréquent en filière poulet de chair, suivi de S. Infantis et S. Virchow [149], ceci concorde avec nos résultats.

Au Ghana, SACKY et coll. en 2001[150], ont isolé 7/97 (7,2 %) salmonelles du contenu intestinal de poulets vivants à la ferme et 13/87 (6,8 %) souches, des carcasses de poulet en morceaux.

#### Antibio-résistance :

Pour l'étude de l'antibio-résistance des souches de salmonelles isolées, ne n'avons pu tester que 5 antibiotiques, ce qui est insuffisant pour discuter nos résultats avec ceux rapportés par les autres auteurs. Néanmoins, sur les 10 isolats testés nous avons constaté qu'ils sont tous sensibles à la Gentamicine, l'ampicilline et à Triméthoprim/ Sulfaméthoxazole.

L'isolat de S. Typhimurium et les trois isolats de S. Infantis étaient résistants à l'acide nalidixique, et sensibles à tous les autres antibiotiques.

Les 4 isolats de S. Hadar sont sensibles à 4 antibiotiques, deux isolats ont présenté une résistance vis à vis des tétracyclines, qui est une ancienne molécule largement utilisées en première intention. La résistance à cette molécule est assez connue et serait généralement due à un gène plasmidique qui peut être acquis assez facilement par les bactéries.

## CONCLUSION

*Salmonella* est la première cause de toxi-infections alimentaires collectives bactériennes dans le monde, elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire.

Les résultats de la préenquête au niveau des tueries avicoles privées de la wilaya de Blida, démontrent que la viande de volaille destinée à la consommation humaine se prépare dans des conditions d'hygiène défectueuse et expose le citoyen aux toxi-infections alimentaires collectives.

Deux méthodes ont été utilisées pour isoler le germe *Salmonella*, Classique et alternative.

Cette étude, nous fournit les premières données des taux de contamination par les salmonelles des tueries avicoles de poulet de chair de la wilaya de Blida.

Nous avons identifié 12 isolats de salmonelles dont 10 sérotypés et 2 non sérotypés, ce qui porte le taux de contamination globale à **3.33%**.

Les sérovars qui ont été les plus fréquemment isolés lors de notre étude sont par ordre de fréquence décroissant : *S. Hadar* (40%), *S. Infantis* (30 %), *S. Typhimurium*, *S. Virchow* et *S. Enteritidis* (10%).

La méthode classique nous a permis d'identifier 3 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=2), *S. Infantis* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1).

La méthode alternative nous a permis d'identifier 5 sérotypes de salmonelles : *S. Hadar* (n=4), *S. Infantis* (n=3), *S. Virchow* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1), *S. Enteritidis* (n=1).

Cette méthode nous a permis d'isoler deux sérotypes non isolés par la méthode classique, à savoir *S. Virchow* et *S. Enteritidis*.

Il ressort de cette étude, que la plupart des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire recherchent le germe *Salmonella* selon les méthodes classiques ne leur permettant pas souvent d'isoler le genre *Salmonella* à cause de leur faible sensibilité, alors que, la nouvelle méthode alternative ISO 16 140 s'est avérée beaucoup plus sensible. Le sérotype et l'antibiotype restent des moyens complémentaires de diagnostic de laboratoire.

## RECOMMANDATIONS

L'éradication des salmonelles chez la volaille est probablement une utopie. Cependant l'objectif à long terme des programmes de lutte est l'élimination au maximum des infections à *Salmonella* au niveau de tous les maillons de la chaîne de production avicole ; ceci devrait fortement réduire les cas humains de salmonellose. La prévalence de la contamination de nos élevages, abattoirs et tueries par *Salmonella* nous ont démontré l'importance d'une très large surveillance de l'industrie avicole, pour le respect des normes d'élevage et d'abattage, particulièrement les mesures d'hygiène individuelles et collectives mais aussi le contrôle de tous les intrants.

A la lumière de cette étude nous recommandons :

- La mise en place des mesures de prophylaxie sanitaire et de désinfection pour diminuer les risques de contagion des élevages, des structures d'abattage notamment les structures qui échappent au contrôle sanitaire et qui évoluent dans la clandestinité.
- L'application des nouvelles méthodes de référence pour la recherche des Salmonelles et la généralisation au niveau des laboratoires vétérinaires régionaux et les laboratoires de contrôle de qualité alimentaire à l'échelle nationale.

La nouvelle méthode ISO 16 140 est une des méthodes de référence pour la recherche des Salmonelles, elle s'est avérée beaucoup plus sensible et plus économique comparée à la méthode classique.

- La surveillance de l'utilisation des antibiotiques, notamment en filière avicole, dans le but de prévenir l'augmentation des résistances aux molécules récentes.



**4) Eviscération :**

- a) Couteau régulièrement nettoyé : - Oui   
 - Non
- b) Gésier ouvert sur le site : - Oui   
 - Non
- c) Viscère percés : - Oui   
 - Non
- d) Contact des viscères avec la carcasse : - Oui   
 - Non

**5) Finition :**

- a) Lavage : Oui   
 Non
- b) Type de bridage : Tête enlevée : Oui  Pattes enlevées : Oui   
 Non  Non
- c) Carcasses transportées sous froid : Oui   
 Non

**6) Nettoyage et désinfection de la salle d'abattage :**

- a) Mode d'évacuation des viscères : Air libre  ; Poubelle  ; Incinération   
 Autre : .....
- b) Type de nettoyage et désinfection :  
 Nom:..... Lequel : ....., Quantité : .....
- Durée d'application : .....
- c) Type de désinfection : Eau utilisée : Robinet  Autre : .....
- Détergeant Lequel : ..... Quantité : .....
- Désinfectant Lequel : ..... Quantité : .....
- Durée d'application : .....
- d) Utilisation du froid post-abattage : Oui  Non
- Type de froid : Réfrigération  Congélation
- Application du froid avant le transport : Oui  Non
- e) Transport : - Transport sous froid : Oui  Non
- Conditionnement : Caisse : Oui  Bâche : Oui   
 Non  Non
- Empilement des carcasses : Oui   
 Non

Nous vous remercions pour votre collaboration à la réalisation de cette enquête.

## APPENDICE B

### **Matériel de prélèvement :**

- Caisson isotherme bien étanche, muni de plaques eutectiques.
- Sachets de Stomacher stériles préalablement numérotés et identifiés.
- Ecouvillons stériles, pour les prélèvements cloacaux.
- Flacons gradués et stériles pour les prélèvements d'eau.
- Bistouri et lames stériles pour les prélèvements de peau du cou.

### **Technique de prélèvement :**

Peau de cou : avec un bistouri et lame stérile prélever environ 10 g de peau de cou et les mettre dans une boîte de Pétri ou un sachet stérile, entre chaque prélèvement la lame est désinfectée et flambé avec de l'alcool.

Caeca : récupérer les deux caeca après éviscération et les mettre dans un flacon sachet stérile.

Eau d'échaudage : après la fin d'abattage de la bande, ouvrir le robinet d'évacuation du bac de l'eau d'échaudage, laisser couler pendant 30 seconde et remplir un flacon stérile de 225 ml.

### **Matériels d'analyses microbiologiques, milieux de culture, additifs et réactifs** **Matériels**

- Hotte microbiologique.
- Balance électronique.
- Becs Bunsen.
- Trousse d'instruments stériles pour la prise d'essai.
- Sacs stomacher.
- Homogénéisateur péristaltique ou Stomacher.
- Flacons stériles.
- Pipettes Pasteur.
- Éprouvettes.
- Tubes à essai stériles.
- Agitateur à tubes ou Vortex.
- Portoirs.
- Incubateurs réglés à 37°C, 42°C.
- Anse de platine.

- Boîtes de Pétri (différentes dimensions).
- Réfrigérateur.
- Congélateur.
- Papier buvard stérilisé.
- Lames de verre.
- Densimètre.
- Ecouvillons.
- Distributeurs pour disques d'antibiotiques.
- Pied à coulisse.

### **Milieux de culture, additifs et réactifs**

- Eau physiologique.
- Eau distillée stérile.
- Eau peptonée tamponnée.
- Bouillon de Rappaport-Vassiliadis.
- Bouillon au sélénite-cystine.
- Milieux Chromogénique RAPID' *Salmonella*
- Gélose XLD.
- Gélose Hektoen.
- Disques SFB.
- Additif Hektoen.
- Additif désoxycholate de sodium.
- Additif xylose à 2%.
- Gélose inclinée au TSI.
- Gélose nutritive inclinée.
- Bouillon nutritif.
- Milieu Urée-Indole.
- Réactif de Kovacs.
- Réactif TDA.
- Disques ONPG.
- Réactif VPI.
- Réactif VPIL.
- Réactif rouge de méthyle.
- Milieu Moeller témoin.
- Milieu Moeller LDC.
- Milieu Moeller ODC.
- Milieu Moeller ADH.
- Huile de vaseline stérile.
- Gélose inclinée de Citrate de Simmons.
- Gélose Mannitol-Mobilité.
- Bouillon de Clark et Lubs.
- Galeries API 20E (BioMérieux)
- Sérums polyvalents et monovalents (Bio-Rad, Difco).
- Gélose SvenGard.
- Gélose Muller-Hinton.
- Disques d'antibiotiques (Oxoid, Bio-Rad).
- Souche de référence ATCC E.Coli 25922.
- Milieu de conservation.

## APPENDICE C

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

°C	: Degré Celsius.
Ac	: acide.
Ag	: antigène.
ADH	: Arginine-DésHydrogénase.
AFSCA	: Agence Fédérale de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire.
AFSSAPS	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.
AFSSA-	
LERQAP	: Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments - Laboratoire d'Etude et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les procédés agroalimentaires.
API	: Analytical Profile Index.
ATCC	: American Type Culture Collection.
CDCP	: Centers for Diseases Control and Prevention.
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute.
CNRSS	: Centre National de Référence des <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> .
DDASS	: Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales.
DSV	: Direction des Services Vétérinaires.
EFSA	: European Food Safety Authority
FDA	: Food and Drug Administration.
h	: heure.
HACCP	: Hazard Analysis Critical Control Point.
ICMSF	: International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
InVS	: Institut de Veille Sanitaire.
ISO	: International Organization for Standardization.
LDC	: Lysine-DéCarboxylase

ml	: millilitres.
MSRV	: Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis
NCCLS	: National Clinical Committee Laboratory Standard.
nm	: nanomètre.
ODC	: Ornithine-DéCarboxylase.
OIE	: Office International des épizooties
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé.
NaCl	: chlorure de sodium.
S	: secondes.
SFB	: Selenite Fraser Broth.
SPI	: <i>Salmonella</i> Pathogenicity Islands.
TDA	: Tryptophane DésAminase.
TEM	: Nom du malade chez qui la première souche de <i>Salmonella</i> porteuse de ce type d'enzyme, a été isolée.
ufc	: unité formant colonie.
USDA	: United States Department of Agriculture.
USFDA	: United States of Food and Drug Administration.
µm	: micromètre.

## APPENDICE D

### JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 36 7 Rabie Ethani 14248 /juin 2003

#### MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL Arrêté interministériel du 17 Dhou El Kaada 1423 correspondant au 20 janvier 2003 définissant les mesures de prévention et de lutte spécifiques aux salmonelloses aviaires à *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *typhi*, *arizona*, *dublin*, *paratyphi* et *pullorum gallinarum*.

Le ministre de la santé, de la population et de la réforme hospitalière, Le ministre du commerce, Le ministre de l'agriculture et du développement rural,

Vu le décret présidentiel n°02-208 du 6 Rabie Ethani 1423 correspondant au 17 juin 2002 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-12 du 1er janvier 1990, modifié et complété, fixant les attributions du ministre de l'agriculture ;

Vu le décret exécutif n° 94-207 du 7 Safar 1415 correspondant au 16 juillet 1994 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables;

Vu le décret exécutif n° 96-66 du 7 Ramadhan 1416 correspondant au 27 janvier 1996 fixant les attributions du ministre de la santé et de la population ;

Vu l'arrêté interministériel du 1er septembre 1984 portant institution d'un comité national et des comités de wilaya de lutte contre les zoonoses ;

Vu l'arrêté interministériel du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ;

Vu l'arrêté interministériel du 25 Chaoual 1415 correspondant au 27 mars 1995 définissant les mesures générales de prévention en élevage avicole ;

**Arrêtent :**

Article 1er. -- En application des dispositions de l'article 3 du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan

1415 correspondant au 22 février 1995, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de fixer les mesures de prévention et de lutte spécifiques aux salmonelloses à *salmonella enteritidis*, ***typhimurium*** , ***typhi***, ***arizona***, ***dublin***, ***paratyphi*** et ***pullorum gallinarum***.

Art. 2. -- Sont reconnus atteints de salmonelloses à ***salmonella enteritidis***, ***typhimurium***, ***typhi***, ***arizona***, ***dublin***, ***paratyphi*** et ***pullorum gallinarum*** :

a) les sujets, poussins ou adultes, sur lesquels a été isolé l'un de ces germes, quel que soit le type de production ;

b) les sujets adultes ayant une sérologie positive avec une bactériologie positive de : -- la litière (prélèvement effectué autour des abreuvoirs) ;

-- l'eau de boisson (contenue dans les abreuvoirs) ;

-- les fientes (prélèvement effectué sur fond de cage) ;

-- le duvet des poussins à l'éclosion.

c) les oeufs sur lesquels le germe a été isolé.

Art. 3. -- Dès la confirmation de l'une des salmonelles citées à l'article 2 ci-dessus, le vétérinaire est tenu d'en faire immédiatement la déclaration à l'inspection vétérinaire de wilaya et à l'autorité vétérinaire nationale, conformément à la réglementation en vigueur.

Art. 4. -- A l'exception de la salmonellose à ***salmonella pullorum gallinarum***, dès la confirmation de l'une des salmonelloses citées à l'article 2 ci-dessus, l'inspecteur vétérinaire de wilaya est tenu d'informer le directeur du commerce et le directeur de la santé territorialement compétents.

Art. 5. -- Sur proposition de l'inspecteur vétérinaire de wilaya, le wali déclare l'infection par arrêté et édicte les mesures sanitaires suivantes :

## 1) A l'égard des animaux de l'exploitation :

- séquestration de l'élevage ;
- si le cheptel avicole est constitué de poussins, la destruction et l'incinération doivent être immédiates ;
- si le cheptel avicole est constitué de sujets adultes, l'abattage sanitaire est ordonné et doit être effectué sous huitaine, au niveau d'un abattoir agréé ;
- en présence de salmonellose à *salmonella pullorum gallinarum*, la viande issue de cet abattage pourra être livrée à la consommation humaine à condition que le transport de cette viande soit effectué en véhicule réfrigéré, étanche et sous couvert d'un laissez-passer délivré par l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou de son représentant dûment mandaté, pour éviter toute propagation des germes.
- en présence de salmonellose à *salmonella enteritidis, typhimurium, typhi, arizona, dublin* et *paratyphi*, sur demande de l'éleveur et sous contrôle officiel, les produits issus de cet abattage ne pourront être livrés à la consommation humaine que s'ils ont subi un traitement thermique à une température de 65° C pendant 10 mn au minimum et que les résultats d'analyses *a posteriori* en matière de salmonelloses soient négatifs conformément aux dispositions de l'arrêté interministériel du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, susvisé ;
- les véhicules ayant transporté le cheptel avicole concerné, avant et après abattage, doivent être désinfectés immédiatement après utilisation ;
- la destruction de tous les oeufs issus de cet élevage sauf en cas de présence de salmonellose à *salmonella pullorum gallinarum* où les oeufs seront autorisés à la consommation humaine.

## 2/ A l'égard des oeufs à couvrir et des poussins éclos dans un couvoir :

- séquestration du couvoir ;
- arrêt de l'incubation de ces oeufs ;
- destruction de tous les oeufs et de tous les poussins éclos.

Art. 6. -- Une enquête épidémiologique doit être effectuée par l'inspection vétérinaire de wilaya afin de détecter l'origine de l'infection.

Art. 7. -- La remise en exploitation des bâtiments d'élevage et d'accouaison ne pourra avoir lieu que si une désinfection des murs, du sol et de tout le matériel d'élevage a été effectuée, que ces infrastructures ont été vidées pendant un (1) mois et qu'un contrôle bactériologique de cette désinfection sur des prélèvements de surface sur les murs et le matériel d'élevage s'est révélé négatif.

Art. 8. -- Le traitement anti-infectieux du cheptel avicole reconnu atteint de salmonellose à ***salmonella enteritidis, typhimurium, typhi, arizona, dublin, parathyphi*** et ***pullorum gallinarum***, est interdit.

Art. 9. -- Lorsque toutes les mesures sanitaires prescrites ont été effectuées, l'inspecteur vétérinaire de wilaya ou son représentant dûment mandaté, s'assure de leur exécution, en particulier la désinfection, le contrôle bactériologique et l'extinction du foyer. L'inspecteur vétérinaire de wilaya adresse un rapport au wali et à l'autorité vétérinaire nationale déclarant la fin de l'infection qui sera prononcée par arrêté du wali conformément à la réglementation en vigueur.

Art. 10. -- Le présent arrêté sera publié au ***Journal officiel*** de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 17 Dhou El Kaada 1423 correspondant au 20 janvier 2003.

Le ministre de la santé, de la population et de la réforme hospitalière Le ministre de l'agriculture et du développement rural

**Abdelhamid ABERKANE Saïd BARKAT**

Le ministre du commerce  
**Noureddine BOUKROUH**

## APPENDICE E

158

Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

## CARACTERISATION DES SALMONELLES ISOLEES PAR UNE METHODE ALTERNATIVE ISO 16 140 DANS LES TUERIES AVICOLE DE LA WILAYA DE BLIDA

M. Medjbar (1), A. Bouyoucef (1), T. Benayad (2), K. Zerrouki (2)

(1) - Laboratoire de Microbiologie Médicale Vétérinaire, Département des Sciences Vétérinaires, Université de Blida.  
 (2) - Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique, Département de Contrôle de Qualité Alimentaire/ Environnement, Ben Aknoun, Alger.  
 E-mail: medjbar\_mohand@yahoo.fr

### INTRODUCTION

La fonction d'abattage des produits avicoles en Algérie apparaît beaucoup plus complexe et fait intervenir une multitude de circuits et d'agents. En effet, outre les abattoirs des entreprises publiques dont la part de marché est modeste, l'abattage dans les tueries privées implique un nombre important et varié d'opérateurs (grossistes, collecteurs - livreurs) qui évoluent dans le cadre de circuits informels. Le potentiel d'abattage du poulet de chair en Algérie est estimé à 334 000 tonnes de viandes blanches par an, dont 93% est pris en charge par le circuit privé [1].

Le prix ainsi que la qualité nutritionnelle de la viande de volaille en font un produit attractif pour le consommateur. Cependant, cette viande s'est révélée une des principales causes de nombreux cas de Toxi-infections Alimentaires Collectives (TIAC) [1, 2], souvent liées aux mauvaises conditions d'hygiène dans certains abattoirs et tueries avicoles. Ces structures, échappent souvent aux contrôles sanitaires, constituant ainsi un danger potentiel pour la santé publique. Par ailleurs, la viande de volaille constitue le réservoir principal du germe *Salmonella* qui est pathogène pour l'Homme [1].

La Direction des Services Vétérinaires dans ses bulletins vétérinaires annuels note depuis ces trois dernières années la recrudescence de foyers de salmonelloses dus à *Salmonella* Enteritidis (SE), espèce pathogène pour

l'Homme, par rapport au sérotype Pullorum Gallinarum (SPG) qui est non pathogène pour l'Homme, le sérotype SE est la cause principale de nombreux cas de Toxi-infections Alimentaires Collectives d'origine bactérienne. [3, 4, 5, 13].

A l'heure actuelle, très peu d'études ont été réalisées sur le portage bactérien de *Salmonella* chez le poulet de chair dans la wilaya de Blida ; Pour établir un état de la situation sur le terrain et évaluer la qualité bactériologique de la viande de poulet produite dans les tueries avicoles de la wilaya de Blida et destinée à la consommation humaine, 5 échantillons d'eau d'échouage de 5 tueries ont été prélevés, dont la capacité d'abattage est de 500 kg/j. Ces prélèvements ont été soumis à des analyses microbiologiques du germe *Salmonella* selon la méthode classique utilisée dans les laboratoires publics et comparés à une méthode alternative validée ISO 16 140, utilisant un milieu chromogénique sélectif : " RAPID'*Salmonella* ".

Enfin, les souches de *Salmonella* isolées sont testées et évaluées quant à leur sensibilité aux antibiotiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### a) Population étudiée et taille de l'échantillon

Notre étude a été conduite de juillet 2007 au laboratoire Centrale de Police Scientifique et Technique, Département Contrôle de Qualité

Alimentaire/Environnement à Alger, où nous avons évalué les techniques classiques de recherches du germe *Salmonella* et comparé avec la méthode ISO 16 140 sur des échantillons divers provenant au laboratoire ; une enquête sur terrain a été entreprise dans la wilaya de Blida et ce, jusqu'à avril 2008, au cours de laquelle 5 tueries avicoles privées agréées par les services vétérinaires sont visitées.

La wilaya comporte 46 tueries fonctionnelles dont la capacité d'abattage est de 500 kg par jour, et un abattoir fermé suite à de mauvaises conditions d'hygiène.

Pour avoir un échantillon représentatif des tueries, nous avons ciblé en concertation avec les services vétérinaires de Wilaya de Blida trois (03) communes sur les 25 existantes (12%), dont la capacité de production est importante. Les communes sont Chiffa, Boufarik et Bougara (Figure 1). Pour les deux premières communes nous avons ciblé deux tueries A et B, pour la troisième commune, nous n'avons pu accéder qu'à une seule tuerie A (Tableau I).

Pour chaque tuerie nous avons établi une fiche d'enquête/abattage dans laquelle nous avons relevé les pratiques d'abattage, d'échaudage,

d'éviscération et de transport. Nous avons prélevé 1 flacon de 225ml du bac d'échaudage après la fin des opérations d'abattage de chaque lot d'animaux abattus.

Nous avons choisi ce site de prélèvement car l'échaudage est responsable d'une contamination homogène des carcasses.

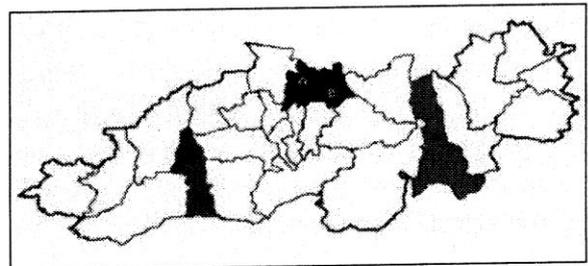


Figure 1 : Répartition des tueries avicoles échantillonnées sur le territoire de la wilaya de Blida.

#### b) Laboratoires d'analyses

Pour les analyses de laboratoire, les prélèvements sont acheminés sous froid au Laboratoire Central de Police Scientifique et Technique, Département de Contrôle de Qualité/Environnement, Ben Aknoun, Alger. Ils sont soumis à des analyses bactériologiques classiques en parallèle de la méthode ISO 16 140.

Tableau I : Répartition des prélèvements de tueries selon la commune et le nombre d'animaux de chaque lot.

Commune	Chiffa		Boufarik		Bougara
	A	B	A	B	A
Prélèvement de l'eau d'échaudage	1 fl. 225 ml				
Nombre de poulets composant le lot abattu le jour de la visite	200	350	250	300	250

Cette méthode est validée AFNOR comme méthode alternative à la norme de référence NF EN ISO 6579 pour la recherche de *Salmonella spp* pour tous produits d'alimentation humaine et animale. La validation AFNOR a été obtenue selon le protocole ISO 16 140, sous le n° d'attestation : BRD 07/11-12/05.

### c) Protocole d'analyses bactériologiques

Pour chaque échantillon d'eau d'échaudage, 25 mL ont été mélangés avec le même volume de l'Eau Peptonnée Tamponnée (E.P.T) (I.P.Algérie), qui permet de revivifier les bactéries stressées au cours du transport et la conservation au niveau du laboratoire, elle constitue l'étape de pré-enrichissement non sélectif. La suspension obtenue est incubée pendant 24 h à 37°C.

Après 24 h d'incubation, 0,1 mL du bouillon de pré-enrichissement est inoculé sur les boîtes de gélose Semi Solide du milieu MSRV (Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis) (I.P.Algérie) [6, 7, 8], le milieu est additionné d'une solution de Novobiocine à 2% avant de couler les boîtes de Petri pour inhiber les cultures de bactéries Gram positif [9]. Les boîtes sont incubées à 41,5°C ± 0,5, pendant 24 h, couvercle en haut.

Les boîtes du milieu MSRV sont examinées après 24 h ± 2 h. Si la migration est supérieure à 20mm du point d'inoculation, un inoculum est prélevé de la zone de migration et ensemencé sur le milieu chromogénique RAPID' *Salmonella* par une technique d'isolement appropriée.

En parallèle, 1 mL de la suspension mère est transféré dans des tubes du milieu au Sélénite Cystine (SC) (I.P.Algérie), les tubes sont incubés pendant 24 h à 37°C. Après 24 h d'incubation, le milieu Hektoen et *Salmonella*-Shigella (I.P.Algérie) sont ensemencés. (Indiqués dans la méthode classique).

Les boîtes de Petri ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 h, et retirées pour examen, identification biochimique (Galerie API 20E BioMérieux) et sérologique avec les sérums mélanges OMA, OMB (I.P.Algérie).

Les souches isolées sont testées quant à leur sensibilité contre cinq (05) antibiotiques : Acide Nalidixique (NA), Gentamicine (CN), Ampicilline (AM), Tétracycline (TE), Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (SXT) (Oxoid, Angleterre).

### d) Analyses statistiques

Nous avons utilisé les numérations en UFC/mL (cellules bactériennes souches/millilitre). Le total des cellules bactériennes souches (UFC)/Surface totale (cm<sup>2</sup>) = (nombre de UFC/mL dénombrées x mL de liquide utilisé dans l'eau d'échaudage / ((0,87 × ρ) + 635).

Le dénominateur est obtenu par la formule établie par THOMAS N.L. (1978).

Nous avons utilisé la version 7 d'Excel™, pour la saisie des données sur les 5 tueries.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse a été effectuée sur 5 échantillons prélevés de l'eau d'échaudage de la volaille, représentant chacun un lot d'animaux abattus et destinés à la consommation humaine.

Sur les cinq échantillons analysés, le prélèvement provenant de la tuerie Chiffa B, issu de l'abattage d'un lot de 350 sujets s'est révélé positif pour *Salmonella spp* en utilisant la méthode ISO 16 140, comparativement à la méthode classique dans laquelle tous les résultats se sont révélés négatifs.

La souche de *Salmonella spp* isolée, est identifiée biochimiquement en utilisant la gélose TSI et la galerie API 20E, ensuite nous avons sérotypé la souche par les sérums mélanges OMA et OMB. La souche de *Salmonella* a présenté une agglutination vis-à-vis du sérum OMA, ce qui la classe parmi les groupes (A, B, D, E, L). Le sérotypage complet sera réalisé ultérieurement.

Enfin, la souche isolée a été testée quant à sa sensibilité à cinq antibiotiques. Il a été constaté qu'elle est sensible à 4 d'entre eux à savoir Gentamicine, Tétracycline, Triméthoprime/Sulfaméthoxazole et Ampicilline, et résistante à l'Acide Nalidixique. Ces résultats concordent avec ceux du 6<sup>ème</sup> Rapport d'évaluation et de Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques 2004 [13].

L'utilisation du milieu modifié Semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) est fondé sur la capacité des espèces de *Salmonella* de se reproduire et d'être mobiles dans le milieu après incubation à 41,5°C sous des conditions adéquate d'humidité [6, 7,8], la plupart des souches de *Salmonella* sont capables de migrer à plus de 20 mm du point d'inoculation en 24 à 48 h.

Le milieu peut réduire de 24 heures le temps requis pour l'identification d'un échantillon positif comparativement à la méthode conventionnelle de culture [7], dans laquelle l'enrichissement sélectif utilisant le milieu Sélénite Cystine (SC) ne donne aucune indication sur le genre bactérien après 24 heures d'incubation.

En effet, SCHÖNENBRÜCHER, *et al.*, ont démontré en 2008 [12] dans des conditions expérimentales, que le milieu Rappaport-Vassiliadis est le plus sélectif (97,4%) comparé au milieu au Tétrathionate de Novobiocine (MKTTn, 94,9% et Sélénite Cystine qui est de (SC, 38,5%).

Ensuite, l'isolement est effectué sur le milieu RAPID'*Salmonella*. Le principe de ce dernier repose sur la mise en évidence de deux activités enzymatiques. Les *Salmonella spp* se présentent sous forme de colonies caractéristiques de

couleur magenta (détection C8 estérase), facile à identifier [9, 10, 12]. Une contre sélection est utilisée pour faire apparaître les autres genres bactériens avec une coloration différente.

RAPID'*Salmonella* permet la détection des salmonelles mobiles et immobiles, ainsi que les *Salmonella* lactose positive, incluant *Salmonella Typhi* et *Salmonella Paratyphi* [9, 10, 11].

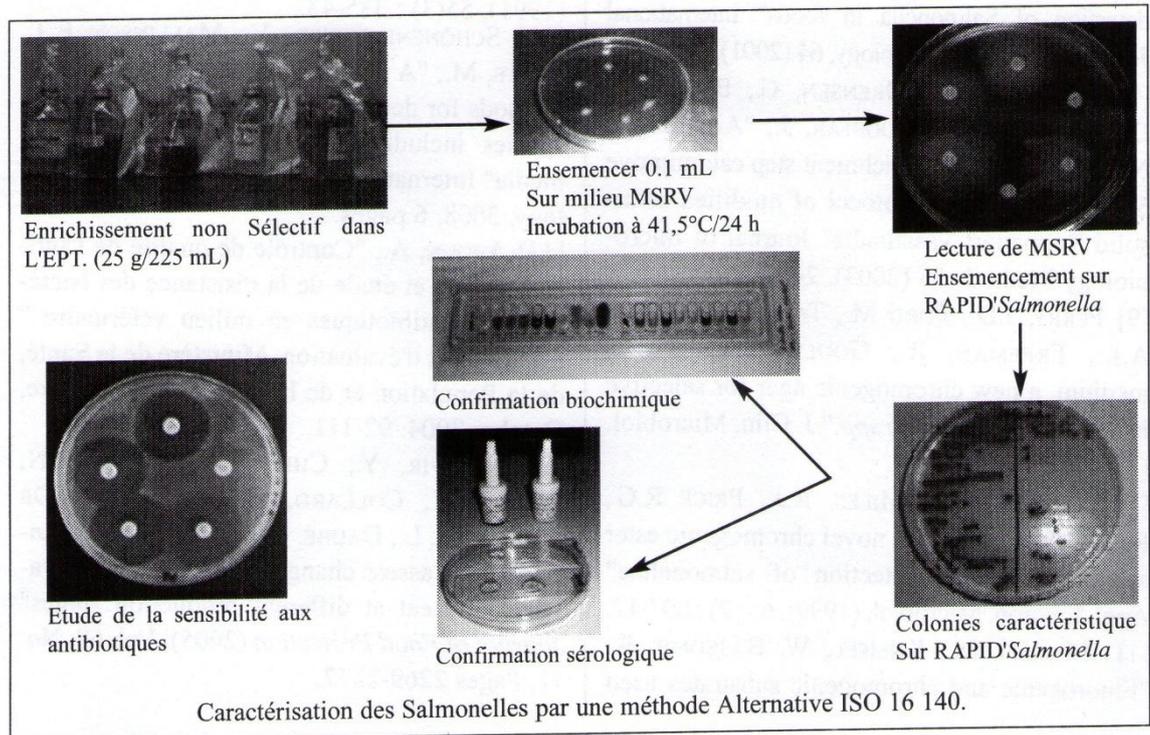
Sur ce milieu, les colonies de *Salmonella* sont facilement repérables et ne nécessitent pas un deuxième repiquage, comparativement au milieu Hektoen, dont les colonies de *Salmonella* peuvent apparaître gris bleu avec ou sans centre noir, parfois de très petites colonies vertes à transparentes souvent confondues avec les colonies de *Proteus* ou masquées par celles de *E. Coli*, ce qui conduit à l'apparition de faux négatif, probablement dans le cas de la présente étude.

## CONCLUSION

*Salmonella* est la première cause de toxi-infections alimentaires collectives bactériennes dans le monde, elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire.

Il ressort de cette étude, que la plupart des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire recherchent le germe *Salmonella* selon les méthodes classiques ne leur permettant pas souvent d'isoler le genre *Salmonella* à cause de leur faible sensibilité, alors que, la nouvelle méthode ISO 16 140 s'est avérée beaucoup plus sensible. Le sérotype et l'antibiotype restent des moyens complémentaires de diagnostic de laboratoire.

Il est recommandé d'introduire les méthodes d'analyse de référence, selon les normes internationales et les généraliser au niveau de tous les laboratoires de contrôle de qualité à l'échelle nationale.



**Remerciements :** Nous tenons à exprimer notre gratitude, pour le Directeur du Laboratoire Central de la Police Scientifique et Technique, Mr Ferrag A., pour la prise en charge financière totale de la présente étude, ainsi que tout le personnel du Département de Contrôle de Qualité Alimentaire/Environnement, Ben Aknoun, Alger.

### Références bibliographiques

- [1] ANONYME, " Plan National de Salubrité des Aliment ", Avant Projet de loi, Alger Septembre 2006, 111 pages.
- [2] OUAHDI M., Institut National de Santé Publique (I.N.S.P.), Communication personnelle non publiée.
- [3] ANONYME, " Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2004 ", Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, Direction des Services Vétérinaires, 2005, 6 pages.
- [4] ANONYME, " Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2005 ", Ministère de l'Agriculture et de

Développement Rural, Direction des Services Vétérinaires, 2006, 6 pages.

[5] ANONYME, " Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2006 ", Ministère de l'Agriculture et de Développement Rural, Direction des Services Vétérinaires 2007, 6 pages.

[6] DESMEDT, J.M., BOLDERDIJK, R.F., RAPPOLD, H.F., LAUTENSCHLAAGER, D., "Rapid Salmonella detection in foods by motility enrichment on a Modified Semi-solide Rappaport-Vassiliadis medium", 1986, J. Food Prot. 49: 510-514.

[7] POPPE, C., MANN, E.D., SHAW, S., WARBURTON, D., SEWELL, A., "Méthode d'isolement du genre *Salmonella* sur le milieu modifié semi-solide de rappaport-vassiliadis (MSRV)", Gouvernement du Canada, Agence canadienne d'inspection des aliments, Ottawa, MFLP-75, juin 2004, 6 pages.

[8] WORCMAN-BARNINKA, D., DESTROS, M.T., FERNANDES, S.A., LANGDRAF, M. "Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid

- Rappaport-Vassiliadis medium (MRSV) for the detection of *Salmonella* in foods" *International Journal of Food Microbiology*, 64 (2001), 387-393.
- [9] JENSEN, A.N., SØRENSEN, G., BAGGESEN, D.L., BØDKER, R., HOORFAR, J., "Addition of Novobiocine in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis" *Journal of microbiology Methods* 55 (2003), 249-255.
- [9] PERRY, J.D., FORD M., TAYLOR, J., JONES, A.L., FREEMAN, R., GOULD, F.K., "ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella spp.*" *J. Clin. Microbiol.* (1999), 37(3):766-8.
- [10] COOKE, V.M., MILES, R.J., PRICE R.G., RICHARDSON, A.C., "A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae" *Appl. Environ. Microbiol.* (1999), 65 (2) : 807-12.
- [11] MANAFI, M., KNEIFEL, W. BASCOMB, S., "Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics" *Microbiol. Rev.* (1991), 55(3) : 335-48.
- [12] SCHÖNENBRÜCHER, V., MALLINSON E.T., BÜLTE, M., "A comparison of standard cultural methods for detection of foodborne *Salmonella* species including three chromogenic plating media" *International Journal of Food microbiology*, 2008, 6 pages.
- [13] ABOUN, A., "Contrôle de qualité de l'antibiogramme et étude de la résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu vétérinaire " 6<sup>ème</sup> Rapport d'évaluation, Ministère de la Santé, de la Population et de la réforme Hospitalière, Octobre 2004. 92-111.
- [14] GHAFIR, Y., CHINA, B., KORSACK, N., DIERICK K, COLLARD, J.-M., GODARD, DE ZUTTER, C., L., DAUBE, G., "Belgian surveillance plans to assess changes in salmonella prevalence in meat at different production stages" *Journal of Food Protection* (2005), Vol. 68, No. 11, Pages 2269-2277.

## APPENDICE F

### Identification biochimique :

#### 1) Galerie biochimique classique :

Dans un tube d'eau distillée stérile, une suspension bactérienne dense (ou inoculum) est préparée à partir de la culture obtenue sur GN ; elle est utilisée pour ensemençer les milieux suivants :

a) Gélose inclinée au Triple Sugar Iron (TSI) : à partir de la GN, l'ensemencement du milieu au TSI s'effectue à l'aide d'une pipette Pasteur, par des stries serrées au niveau de la pente suivi d'une piqûre centrale profonde. Les tubes, ne devant pas être fermés hermétiquement, sont étuvés à 37°C pendant 18-24h.

Une culture typique de *Salmonella* correspond à :

- Une pente alcaline rouge, signe de la non-dégradation du lactose et / ou du saccharose.
- Un culot acide jaune, signe de la fermentation du glucose.
- Un dégagement de gaz qui se traduit par la formation de bulles, soulevant parfois la gélose.
- Une production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), signe de l'utilisation du chlorure ferreux, d'où le noircissement de la gélose.

Compte tenu de quelques exceptions pouvant exister au sein du genre *Salmonella*, les caractères biochimiques révélés par la gélose au TSI peuvent être ceux des autres entérobactéries à Gram négatif non éliminées lors de la culture sur géloses sélectives (*Proteus*, *Edwardsiella* et *Providencia* qui sont lactose -, et *Citrobacter* qui ne dégradent le lactose que tardivement).

Les tests suivants permettent de les éliminer au fur et à mesure.

b) Milieu urée-indole : ce milieu synthétique permet la mise en évidence de l'uréase, une enzyme qui hydrolyse l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniac responsables de l'alcalinisation du milieu ; elle est décelable par un indicateur coloré.

0.5 ml du milieu urée-indole est abondamment ensemencé avec la culture obtenue sur TSI suspect.

Après 18-24h d'incubation à 37°C, la réaction est positive si la couleur vire au rouge violacé; elle est considérée comme négative si la couleur reste inchangée (jaune).

Si le second cas de figure se présente, ce qui nous permet d'éliminer les *Proteus*, le milieu urée-indole ensemencé sera utilisé afin de rechercher deux autres paramètres :

c) Recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :

Cette enzyme dégrade le tryptophane en libérant l'acide indolpyruvique. Les *Salmonella* n'en possèdent pas, contrairement aux *Proteus* et aux *Providencia*.

Quelques gouttes de réactif pour la recherche de la TDA : le perchlorure de fer, sont ajoutées au milieu urée-indole ensemencé et incubé. Une couleur brun-chamois signe la présence d'une TDA.

d) Recherche de la production d'indole: la tryptophanase bactérienne permet la dégradation du tryptophane présent dans le milieu urée-indole, en indole et pyruvate. Les *Salmonella* ne produisent pas d'indole, contrairement aux *Edwarsiella*.

Quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu urée-indole ensemencé et incubé. La présence d'indole est révélée par la formation d'un anneau rouge à la surface du milieu.

Si uréase -, TDA- et indole -, une suspension dense « laiteuse » est préparée à partir d'un mélange de 2ml d'eau distillée stérile et de la culture obtenue sur le milieu au TSI ; c'est à partir de cet inoculum que s'effectuera l'ensemencement des milieux suivants:

e) Réactif pour la recherche de la  $\beta$ -galactosidase : l'utilisation du lactose fait intervenir deux enzymes : une galactoside perméase qui facilite la pénétration du lactose dans la bactérie et une  $\beta$ -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose.

L'incapacité de certains organismes à avoir un métabolisme normal du lactose peut traduire une incapacité à synthétiser la galactoside perméase ; afin de détecter la présence de la  $\beta$ -galactosidase dans de tels organismes, une substance synthétique est utilisée, l'Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside (ONPG), analogue de structure du lactose qui peut pénétrer dans la cellule sans perméase spécifique.

Ce composé incolore est clivé par la  $\beta$ -galactosidase en libérant l'ortho-nitro-phénol, composé soluble de couleur jaune.

Un disque imprégné d'ONPG est placé dans un tube contenant 0.5ml de suspension bactérienne. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 18-24h.

La couleur jaune de la suspension bactérienne traduit la présence d'une  $\beta$ -galactosidase et par conséquent, la faculté de la bactérie à dégrader le lactose ; une des caractéristiques des *Salmonella* appartenant à la sous-espèce *arizonae*.

Une suspension bactérienne de couleur inchangée signe l'absence d'une  $\beta$ -galactosidase ; la bactérie est dans ce cas dite, lactose négative ; caractéristique des *Salmonella* appartenant à la sous-espèce *enterica*.

f) Milieus de Moeller : milieux alcalins de couleur violet pourpre, ils sont au nombre de quatre :

- . Le milieu Moeller + 1% L-Lysine.
- . Le milieu Moeller + 1% L-Ornithine.
- . Le milieu Moeller + 1% L-Arginine
- . Le milieu Moeller témoin, exempt de tout acide aminé.

Les trois premiers milieux permettent de mettre en évidence trois enzymes respectives : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine déshydrogénase (ADH).

Cette recherche est favorisée par un pH acide (la couleur du milieu devient jaune) obtenu avec la fermentation du glucose. Le CO<sub>2</sub> qui s'y libère mais ne pouvant

s'évaporer, est utilisé comme catalyseur par les différentes enzymes afin de dégrader les acides aminés suivants : lysine, ornithine et arginine, respectivement en cadavérine, putrescine et agmatine. La production d'amines réalcalinise le milieu qui de nouveau, retrouve sa couleur initiale.

Chaque milieu (y compris le milieu témoin) estensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne ; avant d'incuber à 37°C pendant 18-24h, ajouter l'huile de vaseline stérile pour créer les conditions d'anaérobiose.

Une couleur pourpre des milieux Moeller contenant les acides aminés indique une réaction positive ; la bactérie possède les enzymes nécessaires à la dégradation des acides aminés.

Concernant le milieu Moeller témoin, il doit devenir et rester jaune.

Contrairement aux *Citrobacter*, les *Salmonella* possèdent une LDC.

g) Milieu de Clark et Lubs : ce milieu glucosé est utilisé pour effectuer deux réactions permettant de différencier la fermentation acide mixte, voie métabolique empruntée par les *Salmonella* produisant de l'éthanol et plusieurs acides organiques, de la fermentation butanediolique, chez les entérobactéries.

Ensemencer un tube contenant le milieu de Clark et Lubs à partir de la suspension bactérienne. Si après incubation à 37°C pendant 18-24h, la couleur de ce milieu initialement jaune ne vire pas au marron, nous effectuons les deux réactions suivantes :

h) Réaction au rouge de méthyle (test RM) : au contact de la culture obtenue à partir du milieu de Clark et Lubs, le réactif au rouge de méthyle garde sa couleur s'il y a production de métabolites acides en utilisant la voie de fermentation acide mixte du glucose.

La couleur du milieu est jaune si le pH est supérieur ou égal à 6.2 ; quand l'organisme est RM positif, la culture prend la teinte rouge.

i) Réaction de Voges-Proskauer (test VP): ajouter successivement quelques gouttes du réactif VPI (solution d'alpha-naphtol) puis du réactif VP II. Le tube est

alors vigoureusement agité, placé en position incliné pour exposer le maximum de la culture à l'air, puis examiné.

Cette réaction est négative (couleur inchangée) si la bactérie ne dégrade pas le glucose en empruntant la voie de fermentation butanediolique; l'acétoïne, métabolite final spécifique à cette voie et généralement réduit en butanediol, est révélée par un test VP positif (couleur marron du milieu).

j) Milieu Mannitol-Mobilité : le milieu gélosé contenant du mannitol est ensemencé par piqûre centrale profonde ; l'incubation s'effectue à 37°C pendant 18-24h.

Le virage de la couleur du rouge à l'orangé indique la dégradation du mannitol ; la mobilité est mise en évidence par la présence d'une culture bactérienne sous forme d'un voile autour de la piqûre centrale.

k) Milieu au citrate de Simmons : ce milieu permet de rechercher la citrate perméase, une enzyme qui catalyse la dégradation du citrate de sodium pour donner du pyruvate et du CO<sub>2</sub>.

Ce test détermine si la bactérie est capable d'utiliser l'acide citrique comme seule source de carbone [17 ; 49], une spécificité des bactéries prototrophes.

À partir de la suspension bactérienne, nous ensemençons en stries serrées la moitié de la pente du milieu gélosé de citrates de Simmons, puis on incube à 37°C pendant 18-24h.

Ne pas visser à fond le bouchon métallique afin de permettre au CO<sub>2</sub> résultant de la décarboxylation du citrate, de s'échapper.

La présence d'une citrate perméase se traduit par le virage de la couleur du vert au bleu suite à l'alcalinisation du milieu par libération des radicaux hydroxyles (-OH).

l) Réactif pour la recherche de l'oxydase : le caractère oxydase positif signifie en fait, que la bactérie possède une enzyme capable d'oxyder le substrat utilisé et ne signifie pas la présence d'une oxydase particulière [28] ; les bactéries possédant en fin de la chaîne respiratoire un cytochrome c associé à cette enzyme, oxydent en présence d'oxygène atmosphérique, le phénylènediamine (contenu du réactif)

pour former immédiatement ou dans les quelques secondes qui suivent, un composé coloré en violet, l'indophénol.

Sur du papier buvard stérile humecté d'une goutte de réactif, nous étalons à l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie présomptive préalablement purifiée sur GN. Le résultat est négatif si au-delà de 30 secondes, la couleur ne vire pas au violet.

Dans un souci de gain de temps et d'économie en milieux et en réactifs, la phase d'identification biochimique s'est donc déroulée en deux étapes ; la première étape consiste à ensemencer uniquement le milieu au TSI et le milieu urée-indole. Si les résultats s'avèrent en faveur d'une présence éventuelle de *Salmonella* (TSI caractéristique, urée<sup>-</sup>, indole<sup>-</sup> et TDA<sup>-</sup>), la seconde étape consistera à ensemencer le reste des milieux suscités.

Les interprétations typiques des réactions biochimiques les plus fréquemment attribués aux *Salmonella* et retenus lors de notre étude, sont résumées dans le tableau 4.4.

## 2. Galerie biochimique miniaturisée :

Nous avons utilisé un des systèmes manuels les plus courants pour l'identification rapide des espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ; les galeries API 20E commercialisées par le laboratoire BioMérieux, comportent des microtubes contenant chacun un milieu déshydraté différent.

Elles nous ont permis de mettre en évidence simultanément, vingt (20) paramètres biochimiques et n'ont été utilisées qu'une fois les essais d'orientation se sont révélés en faveur d'une forte présomption de *Salmonella*.

Nous procédons à l'humidification de la boîte d'incubation en remplissant les microcupules d'eau distillée stérile. Après avoir préparé une suspension bactérienne à partir de la culture obtenue sur un TSI suspect, nous inoculons la galerie sans former des bulles d'air en respectant ces quelques consignes :

- Les microtubes ainsi que les cupules des tests CIT, VP et GEL. sont entièrement remplis ;
- Nous ensemençons uniquement les microtubes des tests ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE ; leurs cupules sont remplies d'huile de vaseline stérile.
- Pour les tests restants, ensemencer uniquement les microtubes.

Tableau récapitulatif de l'interprétation des tests biochimiques pour la recherche de *Salmonella* sur une galerie classique.

Test	Réaction
Fermentation du glucose	+
Formation de gaz	+
Fermentation du lactose	-
Formation de sulfure d'hydrogène	+
Décomposition de l'urée	-
Production d'indole	-
Recherche de la TDA	-
Réaction à la $\beta$ -galactosidase	+ /-
Décarboxylation de la lysine	+
Décarboxylation de l'ornithine	+
Déshydrogénation de l'arginine	-
Réaction de Voges-Proskauer	-
Réaction au rouge de méthyle	+
Utilisation du citrate	+
Fermentation du mannitol	+
Mobilité	+
Recherche de l'oxydase	-

La boîte refermée, l'incubation de la galerie s'effectue à 37°C pendant 18-24h. L'interprétation des tests TDA, IND, VP nécessite l'adjonction respective de quelques gouttes des réactifs TDA, Kovacs et VPI, VP II.

Le tableau 4.5 résume les résultats des réactions biochimiques retenus en faveur d'une *Salmonella arizonae* et d'une *Salmonella* spp. sur galerie API 20E.

Le profil numérique composé de 7 chiffres, est reporté sur la fiche des résultats et l'identification est effectuée à partir de la base de données que comprend le catalogue analytique API 20E.

## REFERENCES

1. Dedet, J-P., "La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes", Éditions Dunod, Paris, (2007), 262 p.
2. Frobisher, M., Fuerst, R., "Microbiologie clinique", Éditions HRW LTÉE, Canada, (1976), 507p.
3. Humbert, F., "Les salmonelles", In "Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments", (Federighi, M.), 2ème Édition Economica, Paris, (2005), 1-23.
4. Humbert, F., « Les salmonelles », In « Manuel de bactériologie alimentaire », (Sutra, L., Federighi, M., Jouve, J-L), 1ère Édition Polytechnica, Paris, (1998), 27-52.
5. Le Minor, L., « *Salmonella* », In « Bactériologie médicale » (Le Minor, L., Veron, M.), 2ème Édition Flammarion Médecine-Sciences, Paris, (1989), 411-427.
6. Bell, C., Kyriakides, A., "Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods", Éditions Blackwell Sciences, United Kingdom, (2002), 330 p.
7. Su, L-H., Chiu, C-H., "*Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature", *Chang Gung Medicine Journal*, 30 (3), (May-June 2007), 210-219.
8. Jay, J. M., Loessner, .M. J., Golden, D. A., "Modern Food Microbiology", Seventh Edition, Food Science Text Series, Springer Edition, USA,(2005), 790p.
9. Euzéby. J. P., 1999; Revised Salmonella Nomenclature: Designation of *Salmonella enterica* (Ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 Sp. Nov., Nom. Rev. As the neotype species of the genus *Salmonella* Lignières 1900 (Approved Lists 1980), Rejection of the name *Salmonella Choleraesuis* (Smith 1894), Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella Typhi* (Schroeter 1886) Warren And Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 927-930.
10. Abgrall, B. R., "Poissons et autres produits de la mer", In « Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments » (Bourgeois, C. M., Mescle, J-M., Zucca, J. R.), Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (1996), 348-363.

11. Desenclos, J-C., Bouvet, P., Benz-Lemoine, E., Grimont, F., Desqueyroux, H., Rebiere, I., Grimont, P.A., "Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, France, 1993: A case finding and epidemiological study", *BMJ*, 312, (1996), 91-94.
12. Guthertz, L. S., Fruin, J. T., Spicer, D., Fowler, J. L., "Microbiology of fresh comminuted turkey meat", *Journal Of Food Science*, 39, (1976), 823-829.
13. Lederer, J., «Les intoxications alimentaires», In « Encyclopédie moderne de l'hygiène alimentaire », Tome IV, Éditions Nauwelaerts, (1970), 156 p.
14. Moustardier, G., « Bactériologie médicale », 3ème Édition Maloine, Paris, (1968), 1123 p.
15. Le Minor, L., Richard, C., «Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries », Éditions de l'Institut Pasteur, France, (1993), 217p.
16. Le Minor, L., « Le diagnostic de laboratoire des bacilles à Gram négatif », In «Entérobactéries», Tome I, 4ème Édition, De La Tourelle, (1972), 228 p.
17. Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., « Microbiologie » ; 3ème Édition française traduction de la 5ème Édition américaine, (2003), 1137p.
18. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., « Introduction à la microbiologie », Editions du renouveau pédagogique Inc., (2003) , 945p.
19. Deb, M., Kapoor, L., "Salmonella nomenclature seen in the literature", *Indian Journal of Medicine and Microbiology*, 23, (2005), 204-205.
20. Gledel, J. R., « Le genre *Salmonella* », In: "Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments ", (Bourgeois, C. M., Mescle, J-M., Zucca, J. ; R), Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (1996), 62-77.
21. Grimont, P. A. D., Weill, F. X., "Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars", 9th Edition WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, (2007), 60p.
22. Gledel, J., Corbion, B., « Le Genre *Salmonella* ». In «Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : Le Contrôle microbiologique » (Bourgeois, C. M., Leveau, J. Y.), Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (1991), 260-273.
23. Brenner, F. W., Villard, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., Swaminathan, B., "Salmonella nomenclature", *Journal of Clinical Microbiology*, 38,7, (2000), 2465-2467.
24. Le Minor, L., « Taxonomie et nomenclature des *Salmonella* ». *Médecine des Maladies Infectieuses*, N°22 Spécial, (1992), 246-248.
25. Le Minor, L., « Comment désigner les sérotypes de *Salmonella* ? », *Médecine et Maladies Infectieuses*, 12, (1988), 859-862.
26. Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., Euzéby, J. P., "Nomenclature

- and taxonomy of the genus *Salmonella*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, (2005), 521-524.
27. Fauchère, J-L., Avril, J-L., « Bactériologie générale et médicale », Éditions Ellipses,(2002), 365p.
  28. Guiraud, J-P., « Microbiologie alimentaire » , Éditions Dunod, Paris, (2003), 652p.
  29. Zhao, S., White, D. G., Friedman, S. L., Glenn, A., Blickenstaff, K., Ayers, S. L., Abbott, J. W., Hall-Robinson, E., Mcdermott, P. F., "Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006", *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 21, (2008), 6656-6662.
  30. Bouvet, P. J-M., "Salmonelles et salmonelloses en France", In "Sécurité alimentaire du consommateur" (Moll, M., Moll, N.) , 2ème Édition Tec & Doc Lavoisier, Paris, (2002), 1-33.
  31. Leclerc. H., Mossel. D. A. A., 1989 ; *Microbiologie : Le tube digestif, l'eau et les aliments* ; Éditions Doin, Paris, 529p.
  32. Yan. S. S., Pendrak. M. L., Abela-Rider. B., Punderson. J. W., Fedorko. D. P., Foley. S. L., 2003; An overview of *Salmonella* typing. Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4: 189-204.
  33. Leclerc, H., Gaillard, J. L., Simonet, M., "Microbiologie générale" ; Éditions Doin, Paris, (1995), 535p.
  34. Le Minor, L., "Lysogénie et classification des *Salmonella*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 18, 3, (1968),197-201.
  35. Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., Brenner, F. W., "Supplement to the Kauffmann-White scheme", *Research Microbiology*, 151, (2000), 63-65.
  36. Korsak, N., Clinquart, A., Daube, G., "*Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ?", *Revue de Médecine Vétérinaire*, 148, (2004),174-193.
  37. Leyral, G., Vierling, E., "Microbiologie et toxicologie des aliments, Hygiène et sécurité alimentaires", Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Collection Biosciences Et Techniques, Éditions Doin, Paris, (2001), 277p.
  38. Pilet, C., Boudon, J. L., Toma, B., Marchal, N., Balbastre, C., Person, J. M., "Bactériologie médicale et vétérinaire, Systématique bactérienne" ; 3ème Édition Doin, Paris, (1975) ;474p.
  39. Le Minor, L., "Entérobactéries", In "Bactériologie médicale", (Le Minor, L., Veron, M.), 2ème Édition Flammarion Médecine-Sciences, Paris, (1989), 389-395.
  40. Singleton, P., "Bactériologie pour la médecine, la biologie et les

- biotechnologies" ; 6ème Édition Dunod, Paris, (2005), 542p.
41. Joly, B., Reynaud, A., "Entérobactéries, systématique et méthodes de diagnostic", Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (2003), 356p.
  42. Pilet, C., Bourdon, J. L., Toma, B., Marchal, N., Balbastre, C., "Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématique bactérienne", 2ème Édition Doin, Paris, (1979), 121-138.
  43. El-Gazzar, F.E., Marth, E.H., "Dairy foods, Salmonellae, salmonellosis, and dairy foods: A review", *Journal of Dairy Sciences*, 75, (1992), 2327-2343.
  44. Larpent, J-P., Larpent-Gourgaud, M., "Mémento technique de microbiologie" ; 3ème Édition Tec & Doc, Paris, (1997), 1039p.
  45. Larpent, J.P. R., "Lait et produits laitiers non fermentés", In "Microbiologie alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments", (Bourgeois, C. M., Mescle, J-M., Zucca, J., R), Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (1996), 272-295.
  46. Ben Salah, R., Denden, I., Bakhrouf, A., "Devenir de Salmonella dans les produits carnés (Merguez) conservés par différents moyens", *MHA*, 16, 47, (2004), 60-66.
  47. Hirsh, D. C., "Salmonella", In "Veterinary Microbiology" (Hirsh, D. C., Zee, Y. C.), Blackwell Publishing, USA, (1999), 75-79.
  48. Milord, P., "TIAC dues à Salmonella Enteritidis, Étude épidémiologique à partir d'ovoproduits en région Limousin", Thèse pour le doctorat vétérinaire, E.N.V d'Alfort, (1993), 129p.
  49. Singleton, P., "Abrégé de bactériologie" ; Éditions Masson, (1994), 247p.
  50. Leclerc, H., Izard, D., Husson, M. Q., Wattre, P., Jakubczak, M., "Microbiologie générale" ; Éditions Doin, Paris, (1983), 1039p.
  51. Le Minor, L., Veron, M., "Bactériologie médicale", Editions Flammarion, Paris, (1989), 1107p.
  52. Le coanet, J., "Salmonelloses Aviaires", In "Manuel de pathologie aviaire", (Picoux, J. et Silim, A.), E.N.V. Alfort. Paris, Faculté de Med. Vét. De Montréal, Quebec, (1992), 225-235.
  53. Moury, F., "Epidémio-surveillance des salmonelles d'origine non humaine. Données récentes du réseau Salmonella", *Froid et denrées périssables*, n° 1053, (2005), 47-52.
  54. Carlier, V., Lagrange, P., "Salmonella, service d'information alimentaire", H.C.S. International, Paris, (2001), pp: 84.

55. Gledel, J., Corbion, B., "Le genre Salmonella dans: Microbiologie Alimentaire", (Bourgeois et Mescle), 1ere edition, 2eme tirage, techniques et documentation, Paris, (1995).
56. Weill, F.X., "Synthèse des résultats du CNR : Souches humaines, 2005", 10<sup>ème</sup> réunion annuelle du réseau Salmonella, (2006), Afssa, Maisons Alfort, Paris.
57. Swerlow et Atekruse, "Emerging Infections 2", (Scheld, W.M. et col.), ASM Press, Washington D.C., (1998), 273-294.
58. Letrilliart, L., Flahault, A., "Diarrhées estivales : 950.000 cas observés entre juin et septembre 1998", Le quotidien du médecin, n° 6348, (1998), p 21.
59. Bell, C., Kyriakides, A., "Salmonella in: Foodborne Pathogens, Hazards, risk analysis and control", Woodhead Publishing Limited, (2002), 307-334.
60. Rostagno, M.H., Wesley, I., Trampel, D., Hurd, H., "Salmonella prevalence in market-age turkeys on farm and at slaughter", Poultry science, 85, 10, (2006), 1838-1842.
61. ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods), "Poultry and poultry products", Microorganisms in foods 6, Microbial ecology of food commodities, Blackie academic & professional edition, (1998), 76-129.
62. Chemaly, M., Huneau, A., Rouxel, S., Lalande, F., Bohnert, M., Petetin, I., Le Bouquin, S., Fravallo, P., "Enquêtes communautaires sur la prévalence de Salmonella en filières avicoles", Communication, 10<sup>ème</sup> Réunion annuelle du Réseau Salmonella, (2006), Afssa, Maisons Alfort, Paris.
63. Ghafir, Y., "Surveillance des salmonelles isolées de denrées d'origine animale en Belgique: Modalités et résultats", Communication, 10<sup>e</sup> réunion annuelle du Réseau Salmonella, (2006), Afssa, Maisons Alfort. Paris.
64. Nisbet, D.J., Ziprin, R.L., "Salmonellosis in animals", In "Foodborne Disease Handbook", Second edition, Vol. 1: "Bacterial Pathogens" (Hui, Y. H. et col), Marcel Dekker Inc., New York-Basel, (2001), 265-284.
65. Shivaprassad, H.L., "Pullorum disease and fowl typhoid" In "Diseases of poultry, 11<sup>th</sup>" (Saif, Y.M. et col.), Iowa state press, USA, (2003), 567-582.
66. Gast, R.K., "Salmonella: Paratyphoid infections", chap.16, In "Diseases of poultry, 11<sup>th</sup>" (Saif, Y.M. et col.), Iowa state press, publishing company, (2003).
67. Humbert, F., "Les Salmonelloses", In "Manuel de Bactériologie Alimentaire", ed. Polytechnica, (1998), Paris.
68. Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2002, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie, (2002), pp 6.

69. Davos, D., "Antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. Of human and non human origin in Australia", Proceedings I3S, Saint Malo, France, (2006), 145-148.
70. Anonyme, The community Summary Report on trends and sources of zoonoses, "zoonotic agents, Antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2005", The EFSA journal, 94, (2006), 234pp.
71. Anonyme, "Salmonella in food stuffs, Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health", European commission, Health and consumer protection directorate general, (14-15 April 2003), pp 65.
72. Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Pasmans, F., Bertrand, S., Collard, J.M., Saegerman, C., Hooyberchs, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., "Salmonella dans la viande de volaille et dans les oeufs: Un danger pour le consommateur qui demande la mise en place d'un programme de lutte efficace", Ann. Méd. Vét., 149, (2005), 34-48.
73. Humphrey, T.J., "Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella* enteric serovar Enteritidis", In "Salmonella enterica serovar Enteritidis in Humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control", First edition A.M. SAEED, Iowa State Press, Ames, Iowa, (1999), 183-192.
74. Saeed, A.M., Thiagarajan, D., Asem, E., "Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis in laying hens" In "Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control", First edition A.M. SAEED, Iowa State Press, Ames, Iowa, (1999), 193-211.
75. Moury, F., Frémy, S., Brisabois, A., "Épidémiologie des salmonelles d'origine non humaine", Données du réseau Salmonella – Année 2005, Bulletin épidémiologique de l'AFSSA, N° 20, (mars 2006), 1-6.
76. Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2003, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie, (2003), 6 pp.
77. Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2004, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie, (2004), 6 pp.
78. Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2005, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie, (2005), 6 pp.
79. Bulletin Sanitaire Vétérinaire Année 2006, Direction des services vétérinaires, Ministère de l'agriculture et du développement rural, Algérie, (2006), 6 pp.
80. Anonyme, "Evaluation des risques liés à *Salmonella* dans les œufs et les poulets de chair", OMS / FAO, Série évaluation des risques microbiologiques 1. Résumé interprétatif, (2002), 77pp.

81. Bornet, G., "Le poulet sans salmonelles : Mythe ou réalité?", *Rev.med.vet.*, 151, 12, (2000), 1083- 1094.
82. Guellouz, H., "Salmonella from food of animal origin (Tunis : 1992-1996)", *Proceedings, International Symposium Salmonella and Salmonellosis, Ploufragan, (1997)*, 419-422.
83. Gradel, K.O., Rattenborg, E., "Aquestionnaire-based retrospective field study of persistence of Salmonella Typhimurium in Danish broiler houses", *Prev. Vet. Med.*, 56, (2003), 267-284.
84. Acha P.N., Szyfrés, B., "Salmonella" In "Zoonoses des maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux", OIE, 2<sup>ème</sup> ed., Paris, France, (1989), 156-164.
85. Riggi, A., "Contribution à l'étude de l'efficacité d'une flore de barrière indéfinie contre la colonisation intestinale par les salmonelles en poulet de chair", *Thèse de doctorat vétérinaire, (1999)*, E.N.V. Alfort, Paris.
86. Villate, D., "Maladies des volailles", 2<sup>ème</sup> édition, France agricole, (2001), Paris.
87. Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Breslin, M., Davies, R.H., "Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of Salmonella Enteritidis infection in layer farms", *J. Appl. Microbiol.*, 94, (2003), 1024-1029.
88. Kimura, A.C., Reddy, V., Marcus, R., Cieslak, P.R., Mohle-Boetani, J.C., Kassenborg, H.D., Segler, S.D., Hardnett, F.P., Barrett, T., Swerdlow, D.L., "Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic Salmonella enterica serotype Enteritidis infections in the United States : a case control study in FoodNet sites", *Clin. Infect. Dis.*, 38, (2004), 244-252.
89. Skov, M.N., Spencer, A.G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B., Madsen, M., "The role of litter beetles as potential reservoir for Salmonella enterica and thermophilic Campylobacter spp. between broiler flocks", *Avian Dis.*, 48, (2004), 9-18.
90. Le Boucher, G., Cohen-Maurel, E., "Salmonelles: La prévention concerne toute la filière", *Filières avicoles*, 577, (Mai 1997), 18-21.
91. Liljebjelke, K.A., Hofacre, C.L., Liu, T., White, D.G., Ayers, S., Young, S., Maurer, J.J., "Vertical and Horizontal transmission of Salmonella within integrated broiler production system", *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.2, n°1, (2005), 90-102.
92. Anonyme, Arrêté interministériel, n° 006 du 20 janvier 2003, définissant les mesures de prévention et de lutte spécifiques aux salmonelloses aviaires à Salmonella Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Arizonna, Dublin, Paratyphi et Pullorum Gallinarum, *Algerie*, (2003), pp: 9.

93. Anonyme, "Salmonelles, Salmonelloses et portage : Les moyens de prévention", La plume technique, n° 5, (décembre 2001).
94. Grimont, P. A. D., Grimont, F., Bouvet, P., "Taxonomy of the genus *Salmonella*", In "Salmonella in domestic animals" (Wray, C., Wray, A.), CABI Publishing, (2000), 1-17.
95. Varnam, A., Evans, M., "Chapter 4 – *Salmonella*" In "Foodborne pathogens – an illustrated text" (Varnam A., Evans, M.), 2nd ed. Manson Publishing: London, (1996), 51-86.
96. Waltman, W., "Methods for the cultural isolation of *Salmonella*". In "Salmonella in Domestic Animals" (Wray C., Wray A.), CABI Publishing : Oxon, (2000), 355-372.
97. Oboegbulem, S., "Comparison of two enrichment media and three selective media for isolation of *salmonellae* from fresh chicken carcass rinse fluids and sewer swabs". *Int. J. Food Microbiol.*, 18, (1993), 167-170.
98. Busse, M., "Media for *salmonella*", *Int. J. Food Microbiol.*, 26, (1995), 117-13.
99. Bager, F., Petersen J., "Sensitivity and Specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs", *Acta Vet. Scand.*, 32, (1991), 473-481.
100. Association Française De Normalisation NF EN ISO 6579, «Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. », Association Française de Normalisation : Saint-Denis, (Décembre 2002), 27p.
101. De Smedt, J., Bolderdijk, R., "Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium", *J. Food Prot.*, 50, (1987), 658-661.
102. International Standard Organization. Amendment to ISO 6579:2002, Annex D (normative), "Detection of *Salmonella* spp." In "animal faeces and in samples of the primary production stage", Working document, (25 October 2004).
103. Landman, W., Hartman, E., Doornenbal, P., "*Salmonella*-isolatie uit pluimveemonsters: vergelijking diagnostic semi-solid *salmonella* (diasalm) en rappaport vassiliadis bouillon (rv) Detection of *Salmonella* spp." In "poultry samples: Comparison between Diagnostic Semisolid Agar (Diasalm) and Rappaport Vassiliadis broth (rv)", De Ware(n)-Chemicus", 26, (1996), 234-237.
104. De Zutter, L., Daube, G., "Improved isolation of *Salmonella* from meat using the diagnostic semisolid *Salmonella* agar Diasalm" In "Foodborne pathogens: detection and typing" (International Society for Fat research-International Standard Organization- Association of Official Analytical Chemists), International symposium sponsored by International Society for Fat research-

International Standard Organization Association of Official Analytical Chemists, Den Hagen, The Netherlands, (20-4-1998).

105. Dilasser, F., Grout, J., Tache, J., Fach, P., "Afnor evaluation of a PCR based test for detecting *Salmonella* spp." In "food samples: Proceedings of *Salmonella* and Salmonellosis '97" (Probelia TM. Colin P., Le Goux J.-M., Clement G.), , Ploufragan (France), (May 20-22 1997), 117-120.
106. Bennett, A., Greenwood D., Tennant C., Banks J., Betts R., "Rapid and definitive detection of *Salmonella*" In "foods by PCR", *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, (1998), 437- 44.
107. Cudjoe, K., Krona, R., "Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference method", *Int. J. Food Microbiol.*, 37, (1997), 55-62.
108. Lin, A., Usera, M., Barrett, T., Golsby R., "Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* enteritidis", *J. Clin. Microbiol.*, 34, (1996), 870-876.
109. Hilton, A., Banks, J., Penn, C., "Optimization of RAPID for fingerprinting *Salmonella*", *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 1997, 243-248.
110. Shangkuan, Y., Lin, H., "Application of Random Amplified Polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* typhi and other *Salmonella* species", *J. Appl. Microbiol.*, 85, 1998, 693-702.
111. Wegener, H., Baggesen, D., "Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella* enterica ssp. Enterica serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis", *Int. J. Food Microbiol.*, 32, (1996), 125-131.
112. Olive, D., Bean, P., "Principles and applications of methods for DNA-Based typing of microbial organisms", *J. Clin. Microbiol.*, 37, (1999), 1661-1669.
113. Baggesen, D., Sandvang, D, Aarestrup, F., "Characterization of *Salmonella* enterica serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States", *J. Clin. Microbiol.*, 38, (2000),1581-1586.
114. Bender, J., Hedberg, C., Boxrud, D., Besser, J., Wicklund, J., Smith, K., Osterholm, M., "Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella* enteric serotype Typhimurium", *N. Engl. J. Med.*, 344, (2001),189-195.
115. Anderson, E., Ward, L., De Saxe, M., De Sa, J., "Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* typhimurium", *J. Hyg.*, 78, (1977), 297-300.
116. Threlfall, E., "Epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone", *J. Antimicrob. Chemother.*, 46, (2000), 7-10.

117. Walker, R., Kinde, H., Anderson, R., Brown, A., "Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies", *Int. J. Food Microbiol.*, 67, (2001),123-129.
118. Parlement Européen et Conseil de l'union européenne, «Directive 2003/99/CE du Parlement Européen et du Conseil du 17 septembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil », *J. Off. Comm. Eur.*, L325, (12 décembre 2003), 31-40.
120. China, B., Ghafir, Y., Daube, G., «Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires », *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147, (2002), 99-109.
121. Bourgeois, C. M., Leveau, J. I., «Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Le contrôle microbiologique », Éditions Lavoisier R Tec & Doc, Paris, (1991), 454p.
122. Brisabois, A., « Intérêts et limites des techniques de caractérisation des *Salmonella* », *Épidémiologie et Santé Animale*, 39, (2001), 31-42.
123. Cuq, J. L., « Les méthodes modernes d'analyse rapide en microbiologie alimentaire agro-alimentaire », *Le point international, Centre de veille international de l'agro-alimentaire*, (1993), 76p.
124. Humbert, F., Lahellec, C., «Applications microbiologiques de l'immunologie » In « Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires : Le contrôle microbiologique » (Bourgeois. C. M., Leveau. J. Y.), Éditions Lavoisier - Tec & Doc, Paris, (1991), 454p, 82-91.
125. Lan, R., Reeves, P. R. "Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Salmonella enteric*" In " Methods in molecular biology, vol. 394, Salmonella: Methods and protocols" (Schatten, H., Eisenstark, A.), Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, (2007), 363p, 119-132.
126. Rasschaert, G., "Molecular epidemiology of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of poultry during transport and slaughter", Thesis submitted in the fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Veterinary Science (PhD), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, (March 2007), 158 pp.
127. Dalton, C. B., Gregory, J., Kirk, M. D., Stafford, R. J., Givney, R., Kraa, E., Gould, D., "Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000", *Commun Dis Intell*, 28, 2, (2004), 211-224.
128. Poppe, C., Mann, E.D., Shaw, S., Warburton, D., Sewell, A., "Méthode d'isolement du genre salmonella sur le milieu modifié semi-solide de

- RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV)“, Gouvernement du Canada, Agence canadienne d’inspection des aliments, Ottawa, MFLP-75, (juin 2004), 6 p.
129. Worcman-Barninka, D., Destros, M.T., Fernandes, S.A., Langdraf, M. “Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MRSV) for the detection of Salmonella in foods”, *International Journal of Food Microbiology*, 64, (2001), 387-393.
  130. Jensen, A.N., Sørensen, G., Baggesen, D.L., Bødker, R., Hoorfar, J., “Addition of Novobiocine in pre-enrichment step can improve Salmonella culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis”, *Journal of microbiology Methods* 55, (2003), 249-255.
  131. De Smedt, J.M., Bolderdijk, R.F., Rappold, H.F., Lautenschlaeger, D., “Rapid Salmonella detection in foods by motility enrichment on a Modified Semi-solide Rappaport-Vassiliadis medium”, *J. Food Prot.*, 49, 1986, 510-514.
  132. Poppe, C., Mann, E.D., Shaw, S., Warburton, D., Sewell, A., “methode d’isolement du genre salmonella sur le milieu modifie semi-solide de RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV) », Gouvernement du Canada, Agence canadienne d’inspection des aliments, Ottawa, MFLP-75, (juin 2004), 6 pages.
  133. Worcman-Barninka, D., Destros, M.T., Fernandes, S.A., Langdraf, M. “Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MRSV) for the detection of Salmonella in foods” *International Journal of Food Microbiology*, 64, (2001), 387-393.
  134. Schönenbrücher, V., Mallinson E.T., Bülte, M., “A comparison of standard cultural methods for detection of foodborne Salmonella species including three chromogenic plating media” *International Journal of Food microbiology*, (2008), 6 pages.
  135. Perry, J.D., Ford M., Taylor, J., Jones, A.L., Freeman, R., Gould, F.K., “ABC medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp.” *J. Clin. Microbiol.* 37, 3, (1999), 766-8.
  136. Cooke, V.M., Miles, R.J., Price R.G., Richardson, A.C., “A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae”, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2, (1999), 807-12.
  137. Manafi, M., Kneifel, W. Bascomb, S., “Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics”, *Microbiol. Rev.* 55, 3, (1991), 335-48.
  138. Anonyme, « Plan National de Salubrité des Aliment », Avant Projet de loi, Alger, (Septembre 2006), 111 pages.
  139. Deirdre, L. Church, Diana Emshey, Tracie Lloyd, Johann Pitout, “Clinical and economic evaluation of BBL™ CHROMagar™ Salmonella (CHROMSal)

- versus subculture after selenite broth enrichment to CHROMSal and Hektoen enteric agars to detect enteric Salmonella in a large regional microbiology laboratory” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, (2010), 13–19.
140. Perales I and Erkiaga E, “Comparison between semisolid Rappaport and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of Salmonella spp. from foods and feeds”, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 14, Issue 1, (1991), Pages 51-57.
  141. Zdragas, A., Tsakos, P., Mavrogeni, P., “Evaluation of two assays, MSR/V and RV, for the isolation of Salmonella spp. From wastewater samples and broiler chickens”, *Letters in Applied Microbiology*, 31, (2000), 328-331.
  142. Maddocks, S., Olma, T., Chen, S., “Comparison of CHROM-Agar Salmonella medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and Salmonella-Shigella Agars for isolation of Salmonella strains from stool samples”, *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 40, No. 8, (2002), p. 2999 à 3003.
  143. Perez, J. M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y., Freydiere, A. M., “Comparison of four Chromogenic media and Hektoen Agar for detection and presumptive identification of Salmonella strains in human stools”, *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 3, (2003), p. 1130 à 1134.
  144. Elgroud R., «Contaminations du poulet de chair par les salmonelles non typhiques en élevages et abattoirs de la wilaya de Constantine : Caractérisations phénotypiques et génotypiques par ERIC-PCR, IS-PCR et PFGE », Thèse de Doctorat, Université Mentouri Constantine, (2009), 157 p.
  145. Ayachi, A., « Epidémiologie de Salmonella Typhimurium et Salmonella Enteritidis dans la filière avicole », Thèse de Doctorat, Université de Batna, (2010), 133 p.
  146. Aboun, A.A. Benelmouffok, R., Bougueddour, A., Taril, M., Rezkallah et Selatnia, L., « Les salmonelloses aviaires diagnostiquées à l'institut Pasteur d'Algérie de 1988 à 2002: Sérotypes rencontrés, leurs antibiorésistances et les aspects réglementaires », *Archives de l'institut Pasteur d'Algérie*, 2000/2003, Ed. ANDS, T.64, (2003), 93-114.
  147. Chambers, J.R., Bisailon, J.R., Labbe, Y., Poppe, C., Langford, C.F., “Salmonella prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chicken at slaughter”, *Poult. Sci.*, 77,10, (1998), 1497-1501.
  148. Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., “Risk factors for Salmonella enterica subsp. enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period”, *Prev. Vet. Med.*, 39, (1999), 265-277.
  149. Brisabois, A., Danan, C., Frémy, S., Granier, S., Moury, F., Oudart, C., Piquet, C., Pires Gomes, C., « Inventaire du réseau Salmonella ; Sérotypage

et sensibilité aux antibiotiques, données 2004 », Editions AFSSA, Maisons Alfort, France, (2006), 114 pp.

150. Sackey, B.A., Mensah, P., Collison, E., Sakyi-Dawson, E., « Campylobacter, Salmonella, Shigella and E.Coli in live and dressed poultry from metropolitan ACCRA », International Journal of food Microbiology, 71, (2001), 21-28.
151. AFNOR, Rapport de synthèse, « Etude de validation du milieu RAPID'Salmonella pour la recherche de Salmonella dans les aliments », (mars 2006), 45p.
152. CEAEQ, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, « Recherche des salmonelles : méthode présence/absence », MA. 700 – Sal-PA 1.0, Rév. 1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, (2007), 25 p.
153. AFSSA LERQAP, Rapport de Synthèse, « Validation de la méthode : RAPIDYME SALMONELLA pour la détection de Salmonella selon le référentiel NF EN ISO 16140 », (2006), 39p.