

Sommaire

Sommaire	9
Abréviations	11
Liste des figures et tableaux	12
Introduction	13
Partie 1 : Etude bibliographique	14
I Salmonelles: agents pathogènes ubiquistes responsables de zoonoses	14
II Situation des productions avicoles et porcines au Chili	15
II.1 secteur industriel avicole	15
II.2 secteur industriel porcin	16
II.3 Système d'élevage familial	17
III Situation actuelle des salmonelloses humaines et animales au Chili	18
Partie 2 : Mise en évidence et typage de salmonelles dans les élevages familiaux de la région VI du Chili	21
I Matériel et méthodes	21
I.1 Zone d'étude et échantillonnage	21
I.1.1 Choix de la zone d'étude	21
I.1.2 Détermination de la méthode d'échantillonnage	22
I.1.3 Collecte des échantillons	24
I.2 Dépistage : détection et typage de <i>Salmonella</i>	25
I.2.1 Culture bactériologique (Annexe 2)	25
I.2.2 Confirmation biochimique	26
I.2.3 Confirmation par détection du gène <i>invA</i> par PCR	26
I.2.4 Typage des souches de <i>Salmonella</i>	27
I.3 Antibiorésistance des souches isolées	27
II Résultats	29
II.1 Echantillonnage	29
II.2 Résultats du dépistage et sérotypage des souches de <i>Salmonella</i>	29
II.2.1 Résultats préliminaires et changement de protocole	29
II.2.2 Dépistage de <i>Salmonella</i> dans la population étudiée et caractérisation des souches	30
II.3 Antibiorésistance des souches isolées	32
III Discussion	33
III.1 Interprétation et limites des résultats	33
III.2 Impact des résultats obtenus sur la poursuite du projet	36

Partie 3 : Rôle des systèmes d'élevage familiaux de volailles et porcs dans le maintien et la circulation de pathogènes : résultats préliminaires du projet global	38
I Facteurs de risque de maintien du pathogène	38
II Facteurs de risque de dissémination, diffusion	39
Conclusion	41
Bibliographie	43
Annexe 1 : Cartographie des régions du Chili et détails de la région VI	48
Annexe 2 : Préparation et caractéristiques des milieux de culture en bactériologie	49
Annexe 3 : Identification biochimique de <i>Salmonella</i>	50
Annexe 4 : Protocole de détection du gène <i>invA</i> par PCR	52
Annexe 5 : Protocole d'électrophorèse sur gel d'Agarose (1.5%)	53
Annexe 6 : Protocole de sensibilité/ résistance <i>in vitro</i> aux antibiotiques des souches de <i>Salmonella</i>	54
Annexe 7: Localisation des BPS échantillonnés au sein de la région VI	55
Annexe 8 : Résumé de certaines données recueillies au cours de l'enquête dans les BPS ..	56

Abréviations

AMEVEA = « Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura » : association de médecins vétérinaires spécialistes en aviculture

APA = « Asociación de Productores Avícolas de Chile » : association de producteurs avicoles du Chili

ASOHUEVO : « Asociación de Productores de huevos de Chile » : association de producteurs d'œufs du Chili

ASPROCER = « Asociación Gremial de Productores de Cerdos de Chile » : association corporative de producteurs de porcs au Chili

BVO : Bulletin vétérinaire officiel

BPS = « Backyard productive system » : système d'élevage familial

CDC = « Centers for Disease Control and Prevention » : Centre de contrôle et prévention des maladies

CIM : concentration inhibitrice minimale

INE = « Instituto Nacional de Estadísticas » : Institut National de statistiques de recensement

ISP = « Instituto de Salud Pública » : institut de santé publique

PCR = Polymerase Chain Reaction : réaction en chaîne par polymérase

PRODESAL = « programa de desarrollo local » : programme de développement local

SAG = « Servicio Agrícola y Ganadero » : Service de l'agriculture et de l'élevage

Se : sensibilité

Sp : spécificité

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Répartition de la consommation annuelle de viande par personne et kilogramme au Chili (D'après APA, ASPROCER, 2007)	16
Figure 2 : Tonnes de viandes produites au Chili entre 1965 et 2007 (D'après INE, 2008)	17
Figure 3 : Sérotype de <i>Salmonella</i> spp isolés en 2009 et 2010 en production aviaire au Chili, en pourcentage (d'après le SAG, 2011)	19
Figure 4 : Région "Libertador General Bernardo O'Higgins"	21
Figure 5 : Zone d'étude et divisions de la sixième région du Chili	22
Figure 6 : Prélèvement cloacaux et rectaux sur des volailles et porcs (cliché S. Dépraz©)	24
Figure 7 : Echantillon à gauche : négatif dans milieu APT / échantillon à droite : positif dans milieu APT (Cliché S. Dépraz©).....	28
Figure 8 : Echantillon à gauche : positif / à droite : négatif sur gélose MSR/V (Cliché S. Dépraz©).....	28
Figure 9 : Echantillon positif sur gélose XLD (Cliché S. Dépraz©)	28
Figure 10 : Tests biochimiques positifs pour <i>Salmonella</i> : Tube 1 - Activité uréase ; tube 2 - gélose TSI ; tube 3 - gélose LIA ; tube 4 - activité phénylalanine désaminase ; tube 5 - gélose MOI (Cliché S. Dépraz©).....	28
Figure 11 : Antibiogramme avec disques imprégnés d'antibiotiques sur souches de <i>Salmonella</i> (Cliché S. Dépraz©).....	28
Figure 12 : Identification de <i>Salmonella enterica</i> sur gel d'électrophorèse des produits de la PCR.....	31

Tableaux

Tableau 1: Prévalence (%) annuelle de <i>Salmonella</i> spp obtenue par le programme de contrôle microbiologique du SAG (2011).....	20
Tableau 2: Résumé de l'échantillonnage réalisé dans la sixième région	29
Tableau 3 : Résultats de l'identification biochimique des cinq échantillons suspects sur gélose XLD (Xylose Lysine Desoxycholate)	31
Tableau 4 : Résultats biochimiques et PCR des échantillons suspects sur gélose XLD (Xylose Lysine Desoxycholate)	31
Tableau 5: Sérotypage des souches de <i>Salmonella</i> dépistées au cours de l'échantillonnage (réalisé par l'ISP de Santiago).....	32
Tableau 6 : Diamètre en mm des halos d'inhibition de l'antibiogramme et interprétation	32

Introduction

La présente étude a été réalisée dans le cadre d'un projet de recherche sur les élevages familiaux (Backyard Productive System : BPS) de volailles et de porcs au Chili. Les élevages familiaux sont la forme la plus commune de production animale dans le monde, et apportent un complément important des revenus des familles. Ce type d'élevage est souvent défini comme une unité de production ayant peu de mesures de biosécurité et peu de suivis sanitaires des animaux. Il peut donc jouer un rôle majeur dans le maintien et la propagation de maladies animales et d'agents pathogènes zoonotiques. Il s'agit d'un mode de production encore très présent au Chili donc l'objectif principal est l'autoconsommation et ne correspond pas à l'activité professionnelle principale de la famille. Le projet de recherche en cours est un programme pilote, prévu sur un an, avec trois périodes de prélèvement au cours de différentes saisons, dans la sixième région « Libertador General Bernardo O'Higgins », au centre du Chili. A la suite de ce projet sera mis en place un projet sur trois ans, dans toute la zone centrale du Chili selon les résultats obtenus dans ce projet pilote. Il a pour objectif, tout d'abord, de caractériser les élevages familiaux rencontrés, à partir d'une enquête permettant d'identifier les pratiques d'élevage et d'hygiène. Pour cela un questionnaire semi-structuré a été réalisé, permettant de définir le mode de fonctionnement de ces élevages (caractéristiques générales, éléments de biosécurité présents, connaissances des éleveurs, soins apportés, devenir des animaux...). L'objectif principal du projet était tout d'abord de détecter le virus de l'Influenza A dans les élevages de volailles et porcs. Il a ensuite été décidé de rechercher d'autres agents pathogènes pouvant être présents dans ces élevages, puisqu'il n'existe aucune donnée sur les élevages familiaux au Chili. Ainsi ont été rajoutées à l'étude les bactéries *Salmonella* et *Escherichia coli*, car ce sont des pathogènes encore bien présents en production aviaire et porcine, et ayant un impact en santé humaine non négligeable. Il a été choisi de s'intéresser à ces deux espèces tout d'abord car ce sont les plus présentes dans les élevages familiaux et car le porc est une espèce interface pour la propagation de l'Influenza. Mon projet a été de réaliser un dépistage de *Salmonella* au sein des élevages familiaux de la sixième région du Chili. Au vu du budget alloué au projet global (environ 20000 \$) il n'était pas possible d'envisager une évaluation de la prévalence de salmonelles, mais seulement de mettre en place une démarche qualitative sur le plus grand nombre d'élevages possible. L'objectif était de voir si l'on a présence ou non de salmonelles dans ces élevages et d'effectuer un sérotypage des souches rencontrées.

L'intérêt de ce projet était tout d'abord de pouvoir dresser un premier bilan des agents pathogènes zoonotiques pouvant circuler dans les élevages familiaux du Chili et de voir le rôle possible de réservoir de ce mode d'élevage. Ceci afin de mettre en place des normes de sécurité dans ces élevages pour éviter toute transmission aux industries nationales avicoles et porcines, productions très présentes au Chili, mais aussi au sein de la population humaine.

Partie 1 : Etude bibliographique

I Salmonelles: agents pathogènes ubiquistes responsables de zoonoses

Les salmonelles sont des entérobactéries aéro-anaérobies facultatives, gram - présentes chez l'animal mais aussi chez l'Homme. Elles fermentent le glucose en produisant souvent du gaz, réduisent les nitrates en nitrites et donnent un test des oxydases négatif. La plupart des salmonelles sont mobiles, sauf quelques exceptions telles que *S. Gallinarum* (Freney et al, 1994). Les caractéristiques suivantes des salmonelles sont utilisées pour l'identification de *Salmonella*: elles n'hydrolysent pas l'urée, ne désaminent pas le tryptophane et la phénylalanine, ne fermentent pas le lactose, sucrose et adonitol, produisent du sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir de thiosulfate, décarboxylent la lysine et l'ornithine (Grimont et al, 2000). Les hybrions ADN-ADN ont montré que le genre *Salmonella* ne comprend que trois espèces : *S. Bongori*, *S. Subterranea*, assez rares, et *S. Enterica*. Cette dernière comprend six sous-espèces : *enterica* (qui comprend un très grand nombre de souches), *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae* et *indica*. 99,7% des souches de *Salmonella* isolées en pathologies humaines ou animales appartiennent à la sous-espèce *enterica*. Les souches sont aussi classées par leurs sérotypes qui sont caractérisés par des antigènes somatiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (K) (Laval et al, 1991).

Les salmonelles sont essentiellement des parasites intestinaux des vertébrés, présentes dans le monde entier. Tous les animaux, y compris l'Homme peuvent héberger ces bactéries dans leur tube digestif (Schwartz, 1999). On trouve des sérovars hautement pathogènes pour l'Homme et qui n'ont pas de réservoir animal : *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi qui sont responsables de la fièvre typhoïde et paratyphoïde. Certains sérovars atteignent uniquement les animaux et sont spécifiques de certaines espèces de vertébrés tels que *Salmonella* Choleraesuis chez le porc, *Salmonella* Gallinarum chez les volailles. Les autres sont des sérovars ubiquistes, sans spécificité pathogénique et les principaux agents de salmonelloses. On retrouve entre autres *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Infanti. (Freney et al, 1994). Il existe aussi de nombreux sérovars qui ne sont pas forcément pathogènes pour les animaux mais qui le sont pour l'Homme telles que *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium qui atteignent les œufs et ovoproduits.

Les salmonelles peuvent survivre plusieurs mois dans l'eau et plusieurs semaines en milieu sec si elles restent à l'abri de la lumière. Elles se retrouvent donc fréquemment dans les milieux aquatiques pollués, la contamination par les excréments d'animaux porteurs étant très importante. La voie de contamination principale par les salmonelles est la voie oro-fécale pour les animaux et orale pour l'homme. Les volailles et les porcs étant des animaux fréquemment contaminés, les salmonelles peuvent aussi se retrouver dans les aliments, notamment les viandes et les œufs par contamination verticale (Berchieri et al,

2001). Elles entraînent une large variété de signes cliniques chez l'animal avec le plus fréquemment des diarrhées profuses et de l'hyperthermie mais aussi possibilité de septicémies aiguës, avortement, arthrite et des signes respiratoires (Kabir, 2010). Cependant dans de nombreux cas les porcs et les volailles adultes sont des porteurs asymptomatiques (Foley et al, 2011). Ces animaux ont donc un rôle important dans la diffusion des salmonelles mais également en tant que source de contamination des aliments à l'origine d'infection humaine.

En effet les salmonelles peuvent avoir des impacts plus ou moins importants sur l'homme, selon l'individu atteint et si elles ne sont pas gérées assez rapidement. Elles peuvent être responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïde et paratyphoïde (*S. Typhi* et *S. Paratyphi*). On retrouve aussi des complications plus graves chez les personnes affaiblies (vieillards, nouveau-nés, immunodéprimés) avec de la septicémie, méningite, endocardite et jusqu'au décès dans de rares cas. Par contre certains individus peuvent présenter des formes de portage sain, sans signe clinique (Temelli et al, 2010). L'infection se fait le plus souvent par des produits alimentaires venant d'un animal infecté ou par infection secondaire d'aliments par l'environnement. Il s'agit le plus souvent d'œufs ou produits à base d'œuf cru contaminés par *Salmonella* Enteritidis ou par des viandes mal conservées ou mal cuites. En France 50% des TIAC (Toxi-Infection Alimentaire Collective) sont dues à des salmonelles (dont 1/3 par *S. Enteritidis*). Les toxi-infections dues aux salmonelles provoquent des diarrhées fébriles, avec douleurs abdominales, nausées, vomissements possibles (Foley et al, 2011).

II Situation des productions avicoles et porcines au Chili

Le secteur aviaire-porc au Chili a développé sa production et ses normes de qualité depuis les années 1990, ce qui en fait aujourd'hui un système d'élevage très industrialisé et très présent dans ce pays. Les secteurs avicole et porcin comprennent une partie importante de production commerciale avec de grandes entreprises et une production familiale encore très présente à but non commerciale mais plutôt d'autoconsommation, il s'agit du système d'élevage familial appelé « backyard productive systems » : BPS, et se disant SPT « sistemas de producción de traspatio » en espagnol.

II.1 secteur industriel avicole

Environ 95% de la production de viande de volailles est localisée dans la zone centrale du Chili, comprenant les régions de Valparaíso (V), Libertador General Bernardo O'Higgins (VI) et la région métropolitaine (RM, XIII) (Annexe 1). En effet elles présentent un climat tempéré et un environnement favorable pour l'élevage de volailles (APA, 2007). 49% de la viande est produite dans la sixième région et 37% dans la région métropolitaine. Il existe actuellement huit grosses industries dans le secteur de la volaille de chair, qui représentent 96% de la production nationale de viande de poulets et canards, tel que

Agrosuper (85% de la production), Ariztía, Don pollo, Sopraval, Tarapacá. Elles sont regroupées au sein de l'association APA (BVO, 2008).

En 2006 la production de volailles au Chili fut de 613757 tonnes avec 84% pour les poulets, 15% pour les canards et 1% pour les autres espèces (BVO, 2008).

La production de viande de volailles a connu une croissance très importante dans les années 1990 due à une augmentation de la demande, une explosion du secteur industriel avicole par une amélioration des procédés de production et prise en compte des thèmes de santé animale, et diminution des coûts des aliments. (Guererro, 2007). Depuis les années 1990, la production avicole a dépassé la production bovine et reste aujourd'hui la production la plus importante au Chili, avec un marché national d'environ 500 millions de dollars, dont $\frac{3}{4}$ pour le poulet. Sur le total de viande consommée au niveau national, la volaille est en tête avec 27,3 kilogramme consommé par personne par an (voir figure 1).

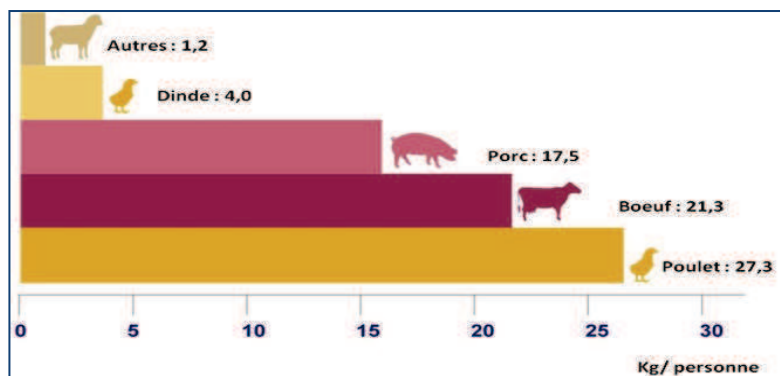


Figure 1 : Répartition de la consommation annuelle de viande par personne et kilogramme au Chili (D'après APA, ASPROCER, 2007)

Aujourd'hui le secteur aviaire au Chili est même suffisamment développé pour couvrir toute la demande nationale et pour réaliser des exportations (18% de la production nationale). Ces exportations se sont développées à partir de l'an 2000 et sont allées en augmentant jusqu'à atteindre un chiffre d'affaire de 308 millions de dollars en 2010, en exportant à des pays de hautes exigences tel que le Mexique, l'Union européenne, le Japon, la Chine (APA, 2007).

En 2005 la production d'œufs au Chili avoisinait les 2.500 millions d'œufs, soit environ 144.771 tonnes, avec une consommation annuelle de 10 kilos environ par personne. Il existe 173 producteurs industriels d'œufs au Chili, regroupés pour la plupart dans l'association de producteurs d'œufs : ASOHUEVO (BVO, 2008).

II.2 secteur industriel porcin

La production porcine au Chili est essentiellement une production industrielle massive qui produit environ 90% de la viande porcine (Pinto et Urcelay, 2003). Parmi les grandes entreprises de production de porc on retrouve Agrosuper, Aasa pork, Friosa,

Maxagro, regroupés dans l'association ASPROCER et Chile pork. La production porcine se localise dans la zone centro-sud du pays, incluant la zone centrale (régions V, VI, RM) et les régions du Maule (VII) et du Bio-Bio (VIII), avec 98% de la population de porcs du Chili. Les régions Libertador General Bernardo O'Higgins (VI) et la région métropolitaine (RM) concentrent 55% de la production porcine du Chili. Cette production, de même que la production avicole, a connu une croissance très importante au cours de la dernière décennie, avec une augmentation annuelle de 9,3% environ. Elle est ainsi passée de 500.000 à 1.300.000 tonnes entre 1990 et 2006 (Soto Arredondo, 2007). La viande de porc représente 24,7% de la consommation totale de viande par an au Chili. Aujourd'hui 60% de la production de viande porcine est destinée à la consommation nationale, mais au vu de la bonne qualité des produits obtenus en production industrielle porcine et des aides pour l'ouverture commerciale, l'exportation dans le secteur porcin prend de l'ampleur et le Chili exporte notamment au Japon, Mexique, UE (ASPROCER, 2006).

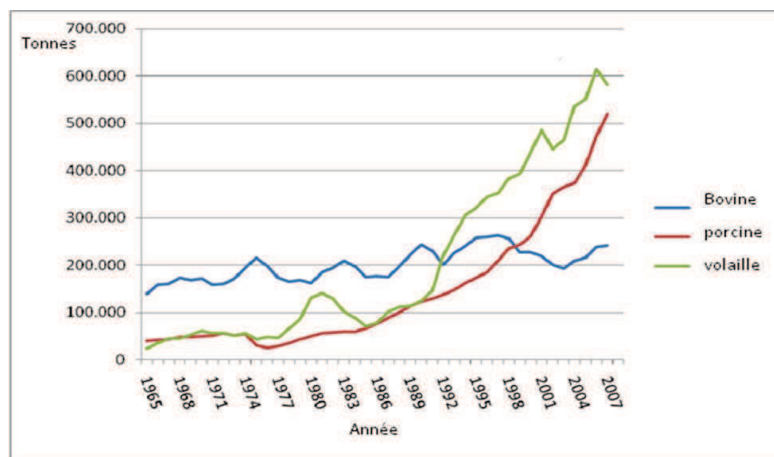


Figure 2 : Tonnes de viandes produites au Chili entre 1965 et 2007 (D'après INE, 2008)

II.3 Système d'élevage familial

Les systèmes d'élevage familiaux (BPS) sont encore très présents au Chili. Cette production est basée essentiellement sur l'élevage de volailles en basse-cour accompagnées de quelques autres animaux (porcs essentiellement), toujours de faible densité, sans objectif de haute production mais plutôt d'autoconsommation. Ce système d'élevage a été défini comme «de petits troupeaux, exploités par des familles rurales individuelles aux fins de sécurité alimentaire, de revenu, et d'emploi rémunérateur pour les femmes et les enfants» (Branckaert, cité par Sonaiya, FAO, 2004). Cependant il n'existe pas de définition très précise de ce qu'est un élevage familial, surtout en termes de taille d'élevage. Actuellement au Chili, très peu d'études ont été consacré à ce système l'élevage. D'après les données de l'institut de recensement (INE) de 2007 on a pu estimer le nombre de BPS au Chili à 150000 producteurs, avec plus de 3,7 millions de volailles et 400000 porcs, mais en prenant une définition assez large des BPS, c'est-à-dire toutes les exploitations de moins de 20 hectares

possédant des animaux d'élevage. Dans la zone centrale du Chili, les BPS sont estimés à 31300 unités avec 714000 volailles et dans la sixième région à 14000 unités avec une population de 415000 volailles et 20000 porcs environ (Hamilton-West et al, 2007; d'après les données de Giovianna Ayala basées sur les données de l'INE, 2007). Environ 18% des BPS élèvent plus d'une espèce de volaille, mais *gallus gallus* (poule, poulet, coq) est l'espèce la plus communément présente. La taille de ces élevages est en moyenne de 37 volailles. On trouve aussi des porcs ou ruminants, mais beaucoup plus rarement (Hamilton-West et al, 2011). L'élevage familial correspond à la forme la plus commune de production animale dans le monde, et représente un complément important de revenus des petits producteurs. Cependant, ce type de production est connu pour avoir de grandes déficiences au niveau de la biosécurité et des normes sanitaires. Il correspond au secteur 4 de la « classification de la production de volaille basée sur le niveau de biosécurité » mise en place par la FAO et OIE (FAO, 2010), c'est-à-dire « village ou production d'élevage familial avec une biosécurité minimale, et la production consommée localement ». D'après les données collectées au Chili sur les BPS (Hamilton-West et al, 2011), ce mode de production fonctionne avec un système d'entrée et sortie des animaux qui est très peu contrôlé et une alimentation basée sur la récupération de déchets ménagers disponibles complémentée par des céréales. Très peu de mesures d'hygiène basiques y sont pratiquées (pas de désinfection, de contrôle à l'introduction d'animaux...) et les fermiers les possédant n'ont aucune formation en biosécurité ou en reconnaissances de maladies. Ils s'appuient uniquement sur leurs propres expériences et partage de savoirs avec les voisins. Quelques traitements y sont dispensés, parfois des médicaments de santé humaine et ne faisant quasi jamais intervenir un vétérinaire. Les animaux de ces élevages familiaux et leurs dérivés sont habituellement consommés par leurs propriétaires, plus rarement vendus localement ou donnés comme cadeaux (Hamilton-West et al, 2011).

III Situation actuelle des salmonelloses humaines et animales au Chili

A partir des années 1980 les salmonelles ont commencé à être reconnues comme source de plusieurs foyers d'infection humaine au Chili. Jusqu'en 1986 on retrouvait surtout des cas de fièvre typhoïde (*S. Typhi* et *Paratyphi*), puis suite à l'amélioration des conditions de vie et d'hygiène au Chili, le nombre de cas a diminué, au profit de *Salmonella* Enteritidis (Fica et al, 2001). En 1994, une épidémie d'infection humaine par *Salmonella* Enteritidis a eu lieu sur la majeure partie du territoire chilien, dont l'origine au nord du pays pourrait être une importation de volailles destinées à la reproduction (Prat et al, 2001). Cela c'est traduit par de nombreux cas d'infection alimentaire, liés également à l'évolution de la production aviaire avec une importante centralisation et changement d'alimentation des animaux.

De plus, plusieurs cas d'intoxication par de la volaille ou des produits dérivés sont régulièrement rapportés au Chili. Dans la région métropolitaine, 40% des foyers d'infection

par *S. Enteritidis* sont associés à la consommation d'aliments contenant des œufs ou dérivés (Fica et al, 2001). De plus les salmonelles sont les bactéries les plus isolées dans les foyers d'infections alimentaires, avec *les Staphylococcus aureus* (Prado et al, 2002).

De nombreuses souches de *Salmonella*, notamment *S. Enteritidis* et Heidelberg, ont été détectées à partir de carcasses de poulets provenant de supermarchés ou de productions industrielles de volailles du Chili (Ulloa et al, 2009). Provenant de différentes compagnies de production porcine, 167 souches de *Salmonella spp.* ont été isolées en 2011, avec pour sérotypes les plus fréquents : *S. Infantis*, *S. Typhimurium* and *S. Anatum*, suivis par *S. Heidelberg*, *S. Derby*, *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka* and *S. Bredeney* (Villamil et al, 2012).

Pour réguler et limiter ces cas de salmonelloses animales et possiblement humaines, le Chili a mis en place des programmes de contrôle de *Salmonella*. A partir de 1998, le SAG associé à ASOHUEVO et selon les recommandations de l'OMS, a initié un programme national de contrôle de *Salmonella* chez les groupes de producteurs de volailles (Polanco, 2002). En 2009 a été mis en place le programme de contrôle de *Salmonella spp.* au sein des productions commerciales avicoles. Ce contrôle est obligatoire dans les filières volailles de chair et œufs et toutes celles qui exportent leur produits, reste volontaire chez les autres entreprises mais non appliqué dans les élevages familiaux. Au sein du programme, des cultures bactériologiques sont réalisées sur méconium ou écouvillons selon le type de production. Il a été trouvé une prévalence de *Salmonella spp.* de 3% chez les poules reproductrices en 2010 (26,3% en 2009) et jusqu'à 47,3% chez les poulets d'engraissement. Le programme couvre certains sérotypes (*S.Typhimurium*, *S.Enteritidis*, *S.Infantis*, *S.Virchow*, *S.Adar* pour les poules reproductrices et *S.Typhimurium* et *S.Enteritidis* pour les dindes reproductrices et les poulets et dindes d'engraissement). Dans le cas de détection de ces sérotypes, les volailles sont exclues de la chaîne de vente et d'exportations (SAG, 2011).

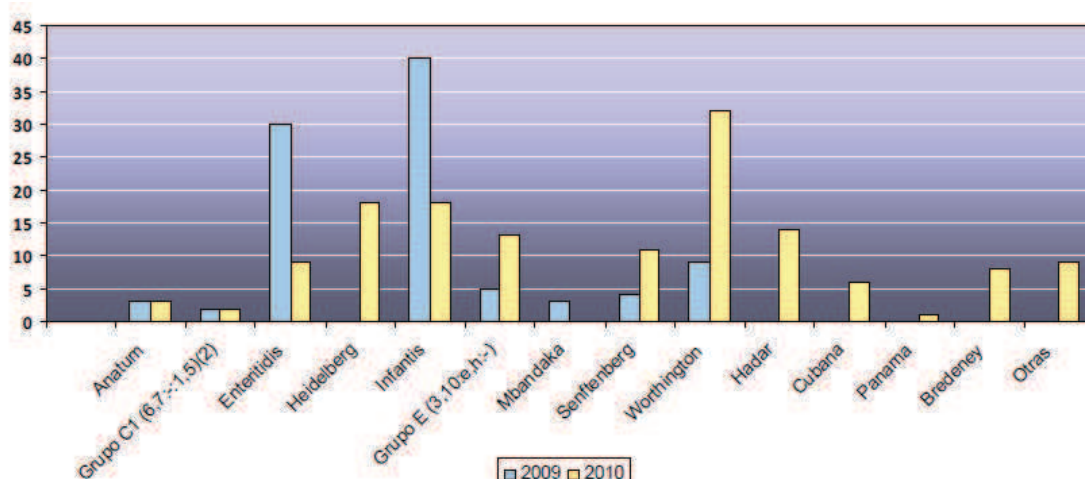


Figure 3 : Sérotipo de *Salmonella spp* isolés en 2009 et 2010 en production aviaire au Chili, en pourcentage (d'après le SAG, 2011)

Ce programme fait parti d'un programme plus vaste, le « Programme de réduction de pathogènes » qui s'applique à tous les groupements d'abattoirs exportateurs afin de garantir une haute fiabilité de la viande en provenance du Chili. Les agents indicateurs utilisés sont les souches d'*Escherichia coli* et *Salmonella* spp. identifiées dans les productions de porcs, ovins, caprins, bovins et volailles. Le vétérinaire officiel de l'abattoir prélève des échantillons chaque semaine ; ceux-ci sont analysés par le laboratoire de référence du SAG (BVO, 2010).

Tableau 1: Prévalence (%) annuelle de *Salmonella* spp obtenue par le programme de contrôle microbiologique du SAG (2011)

Espèce	2004 *	2006	2008
Bovin	0,54	0,14	0,50
Ovin	ND	1,00	0,00
Porcin	5,45	6,46	1,46
Poules/poulets	1,98	3,52	0,43
Dindes	5,86	4,96	6,56

*Avril à Décembre 2004. ND : non déterminé

Partie 2 : Mise en évidence et typage de salmonelles dans les élevages familiaux de la région VI du Chili

I Matériel et méthodes

I.1 Zone d'étude et échantillonnage

I.1.1 Choix de la zone d'étude

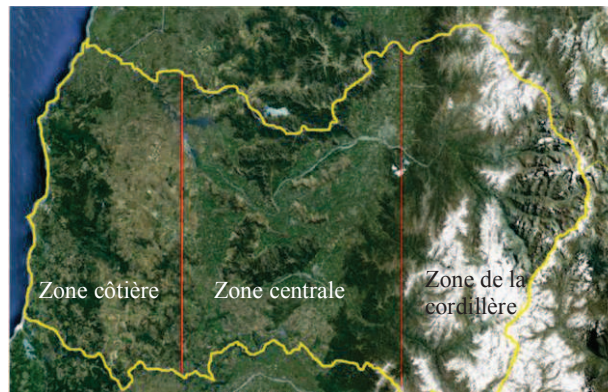
Cette étude préliminaire a débuté en Avril 2012 et s'est déroulée dans la sixième région du Chili, « Libertador General Bernardo O'Higgins » (Annexe 1, Figure 4). Cette région est située entre la région métropolitaine de Santiago au Nord, et la région du Maule (VII) au Sud, avec une superficie de 16 387 km² (Annexe 1). Elle est avant tout tournée vers l'agriculture et dans une moindre mesure la pêche. Notre choix s'est porté sur cette région car on y trouve la plus grande partie de la production industrielle de volailles et porcs au Chili (cf partie I). De plus on y trouve une présence importante de BPS, avec environ 14000 familles profitant de l'élevage familial (Hamilton-West, 2011), soit 9,3% du total d'élevages familiaux du Chili. Elle nous a donc semblé être une zone potentiellement « à risque » pour la circulation et transmission d'agents pathogènes chez les volailles et les porcs, et donc particulièrement adaptée pour réaliser une première étude préliminaire. De plus il s'agit d'une zone proche de Santiago et facile d'accès.



Sources : http://en.wikipedia.org/wiki/Libertador_General_Bernardo_O%27Higgins_Region et http://www.dirplan.cl/Cuenta_Publica/ohiggins.html

Figure 4 : Région "Libertador General Bernardo O'Higgins"

Pour faciliter l'échantillonnage, la région a été découpée en 3 zones : zone centrale, zone côtière à l'Ouest et zone de la cordillère à l'Est.



Source : stéphanie Dépraz d'après Google earth©

Figure 5 : Zone d'étude et divisions de la sixième région du Chili

I.1.2 Détermination de la méthode d'échantillonnage

Pour définir les élevages correspondant à des élevages familiaux nous nous sommes appuyés sur la caractérisation des systèmes de production d'élevages de la FAO (FAO, 2010) et sur les données de l'INE 2007 indiquant que la distribution de la taille des élevages de volailles au Chili est la suivante : beaucoup d'élevages avec moins de 100 animaux, une très faible proportion comprenant 100 à 3000 animaux puis une grande part d'élevages avec plus de 5000 volailles. Comme il n'existe pas de définition standard des BPS, nous avons défini que tout système d'élevage comprenant moins de 100 volailles et moins de 50 porcs seraient considérés comme des élevages familiaux, dans la mesure où l'élevage ne correspond pas à l'activité professionnelle principale des « éleveurs ». Selon les données du recensement 2007 de l'INE, on a constaté qu'il y a 1159 élevages recensés dans la sixième région qui présentent ces critères, ce qui représente 38489 volailles et 4037 porcs.

L'objectif initial était de réaliser des prélèvements dans 30 BPS dans chacune des trois zones, dans leurs secteurs ruraux, soit 90 BPS, et cela répété sur trois périodes de prélèvement étalées sur un an : automne-hiver (avril à juin), au printemps (septembre à novembre) et en été (février à mars), afin d'avoir des échantillons prélevés à différentes saisons, les variations climatiques et environnementales pouvant en effet avoir une influence sur la présence d'agents pathogènes. Une première sortie a été réalisée dans la commune de Maria Pinto, à proximité de Santiago, pour tester le questionnaire et le mode d'échantillonnage, le budget nécessaire à chaque sortie et voir si l'objectif initial était réalisable. Suite à cette journée, l'estimation initiale du nombre de BPS qu'il était possible d'échantillonner par jour a été revue à la baisse (4 ou 5 en moyenne). En effet le temps nécessaire pour effectuer les prélèvements, surtout pour les porcs qui ne sont pas du tout habitués à être manipulés, s'est révélé plus long que prévu, ainsi que le temps de dialogue avec les familles. De plus il a été constaté qu'un minimum de 4 personnes était nécessaire

pour réaliser l'échantillonnage (prélèvements et questionnaire) de façon optimale, ce qui a limité le nombre de sorties possibles par semaines, au vu des disponibilités des autres thésards. Ainsi l'objectif a été ramené à 20-25 BPS dans la zone centrale et la zone côtière. La zone de la cordillère, présentant moins de zones rurales avec élevage, sera quand à elle effectuée lors de la prochaine période de prélèvements, prévue en septembre.

Les communautés où nous avons effectué les prélèvements ont été sélectionnées de manière empirique, par souci de commodités et de budget. En effet il était nécessaire de connaître des vétérinaires ou organismes d'aide à l'élevage sur place afin de savoir où l'on pouvait rencontrer des gens possédant à la fois des porcs et des volailles car il n'existe actuellement aucun recensement précis des BPS au Chili, ni d'adresse précise des habitations. De plus, la présence d'un intermédiaire connu des habitants de la commune était utile pour aborder plus facilement les éleveurs familiaux et avoir leur accord pour participer de manière volontaire à notre projet. Ainsi nous avons travaillé en collaboration avec des vétérinaires ou techniciens de PRODESAL, organisme gouvernemental fournissant un service de développement et d'aide aux petits producteurs agricoles locaux.

Dans chaque communauté ont été choisis des élevages familiaux possédant à la fois des volailles et des porcs, et ont été privilégiés les élevages se trouvant dans des zones supposées plus « à risque » pour la circulation de l'influenza et le contact avec la faune sauvage (proximité de zones aquatiques, zones de passages des flux migratoires d'oiseaux sauvages...). Dans chaque élevage, cinq prélèvements sont effectués sur la sous espèce *Gallus gallus* (poules, poulets, coqs), et dix prélèvements si sont présentes d'autres espèces de volailles (dindes, oies, canards principalement) et que l'on a suffisamment d'animaux. Ce nombre a été choisi de la manière suivante : nous avons décidé de fixer un taux de prévalence troupeau limite à 50%. Etant donné qu'il n'y a aucune donnée existante sur les BPS au Chili, au vu des conditions d'élevage pratiquées, on a supposé que l'on aurait un taux de prévalence troupeau assez important si une souche de salmonelles était présente. Or avec un taux de prévalence limite de 50%, la taille des échantillons nécessaire pour détecter une maladie, pour un risque d'erreur de 5%, est de 5 pour une population allant de 30 à 40 individus (or, d'après les données de l'INE 2007, la moyenne de volailles par BPS possédant des volailles et porcs dans la région VI est de 33,2). Pour les porcs il a été décidé de prélever au maximum 3 porcs adultes dans chaque élevage, sachant que la moyenne de porcs par BPS dans la sixième région est de 3,5 (INE, 2007).

Les individus au sein d'un BPS ont été choisis de manière aléatoire orientée. En effet nous avons d'abord sélectionné les individus adultes de l'élevage, en privilégiant les animaux malades s'il y en avait, puis nous avons ensuite choisi aléatoirement les individus échantillonnés au sein de cette sélection. Les poussins et les porcelets de moins de deux mois ont été écartés de l'échantillonnage car les individus adultes ont une plus grande probabilité d'avoir été exposés à des agents pathogènes, et car le taux d'infection par les salmonelloses aviaires est plus élevée chez les volailles adultes (Rahman et al, 2004). Pour

les porcs, les animaux adultes de plus de 400 kilos n'ont pas été prélevés, au vue des difficultés de contention.

I.1.3 Collecte des échantillons

Les prélèvements ont été faits par des écouvillonnages rectaux et cloacaux pour déterminer la présence de salmonelles. Les écouvillons utilisés étaient de type gel agar Cary-Blair (Copan Venturi Transystem[®]), particulièrement indiqué pour le prélèvement et le transport d'échantillons fécaux et rectaux pour l'analyse de bactéries pathogènes entériques (Swab guide Copan, 2010). La tête de l'écouvillon était introduite dans le cloaque ou le rectum de l'animal et une légère pression devait être exercée, en effectuant des mouvements circulaires, l'objectif étant de collecter un maximum de contenu fécal. Les écouvillons ont ensuite été identifiés puis maintenus au froid et à l'obscurité dans une glacière durant l'échantillonnage (maximum 24h) puis placés dans un réfrigérateur à 4°C en attendant d'être analysés. Comme l'échantillonnage supposait un possible contact avec des agents pathogènes et des prélèvements possiblement infectés, il a été mis en place un protocole de biosécurité. L'objectif étant de limiter le transport et la dissémination de germes entre les élevages, ainsi que de limiter la contamination des prélèvements et des personnes effectuant l'échantillonnage. Pour cela chaque prélèvement a été effectué avec des gants, combinaison jetable, charlotte, masque et pédiluve à l'entrée et à la sortie de l'élevage.



Figure 6 : Prélèvement cloacaux et rectaux sur des volailles et porcs (cliché S. Dépraz©)

I.2 Dépistage : détection et typage de *Salmonella*

Il a été réalisé un isolement de salmonelles à partir d'écouvillons cloacaux et rectaux, avec un dépistage par culture bactériologique confirmé par analyses biochimiques et PCR. Nous avons utilisé le protocole ISO standard 6579, recommandé par le SAG du Chili, d'après les recommandations de l'OIE (SAG.ISO 6579, 2000). Un typage a ensuite été réalisé sur les échantillons confirmés positifs par analyses biochimiques et PCR, ainsi qu'un antibiogramme pour vérifier si l'on avait des souches résistantes.

I.2.1 Culture bactériologique (Annexe 2)

Aux cours des étapes de la culture bactériologique, on a considéré les échantillons comme positifs lorsqu'ils correspondaient au critère de sélection du milieu, mais la confirmation d'un échantillon positif pour *Salmonella enterica* n'est certaine qu'après des analyses biochimiques et PCR car les milieux de culture ne sont pas spécifiques des salmonelles.

Etape 1 : pré-enrichissement

Le pré-enrichissement sélectif a été fait avec un bouillon APT : eau peptonnée phosphatée (Difco™ APT Broth).

On a introduit l'écouvillon dans un tube à essai contenant 5mL du milieu APT qui a été mis à incuber de 18h à 24h à 37°C. On doit obtenir un dépôt blanchâtre au fond du tube ou/et un milieu trouble, indiquant un développement dans le milieu APT (SAG, 2000, voir figure 7).

Etape 2 : Enrichissement

L'enrichissement a été fait par une inoculation sur gélose MRSV : gélose modifiée semi-solide Rappaport Vassiliadis (Difco™ Rappaport-Vassiliadis Medium, Semisolid Modification) avec un supplément sélectif de Novobiocine à 20mg/l. La Novobiocine est un antibiotique qui permet d'inhiber les microorganismes contaminants à Gram positif, ainsi que les *Proteus*, *Pseudomonas* et permet donc un enrichissement sélectif des salmonelles (De Smedt et al, 1986). On a déposé environ 50 µl (3 gouttes) du milieu précédent sur MSR/V et laissé à incuber 24h à 41,5°C. Si nécessaire on peut laisser incuber 24h de plus à 37°C, si on note un début de croissance sur MSR/V au bout de 24h. Ce test se base sur la caractéristique de mobilité des salmonelles. Le milieu ne permet donc pas de détecter les salmonelles immobiles (*S. Gallinarum*, spécifique des volailles). Les coliformes sont inhibés par la combinaison de la pression osmotique et le malachite vert du milieu, ainsi que par la température (H. Dusch et M. Altwegg, 1995).

Si l'on observe un halo de croissance blanc/gris, opaque, diffus autour du point d'inoculation, aux bords bien définis, l'échantillon testé est considéré comme positif, c'est-à-dire pouvant potentiellement contenir des souches de *salmonella* spp mobiles, et sera analysé à l'étape suivante. Si le milieu reste bleu, sans aucune croissance, l'échantillon est considéré comme négatif. (SAG, 2000, voir figure 8).

Etape 3: isolement sélectif

L'isolement sélectif a été fait par un ensemencement sur gélose XLD : Xylose Lysine Desoxycholate (Difco XLD; Becton Dickinson) et incubation durant 24h à 37°C. La différenciation des salmonelles sur ce milieu est basée sur la fermentation du xylose, du lactose et du sucrose de même que sur la décarboxylation de la lysine et la production de sulfure d'hydrogène. Cette dernière est mise en évidence à l'aide de fer ferrique contenu dans le milieu. Pour cela un peu de zone de croissance a été prélevée à l'aide d'une anse stérile à l'extrémité du halo dans la gélose MSR/V et striée sur le milieu gélosé XLD. L'échantillon est considéré comme positif sur XLD, c'est-à-dire pouvant potentiellement contenir des souches de *salmonella* spp., si on a présence de colonies rouges avec un centre noir (voir figure 9). Cet aspect est dû aux propriétés d'absence de fermentation du lactose et de la production de H₂S des salmonelles (SAG, 2000).

Dans le cas de colonies positives sur XLD, une colonie est repiquée sur le milieu agar XLD pour réaliser l'identification biochimique.

I.2.2 Confirmation biochimique

On a réalisé une confirmation biochimique permettant de différencier les Entérobactéries, à partir des milieux Agar TSI, Agar LIA, Agar MIO, Agar Urée (annexe 3). Les analyses biochimiques ont été effectuées sur les échantillons considérés positifs sur gélose XLD. Pour cela on a sélectionné une colonie pure de l'échantillon suspect, puis les tests ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de maladies infectieuses de l'Université des sciences vétérinaires de Santiago. Une seule identification positive est nécessaire pour déclarer un échantillon positif pour la présence de salmonelles.

Les preuves biochimiques ont ensuite été confirmées par PCR.

I.2.3 Confirmation par détection du gène *invA* par PCR

Une PCR standard (standard polymerase chain reaction) a été effectuée pour diagnostiquer des *Salmonella enterica* (les conditions de la PCR sont détaillées en annexe 4). Une extraction d'ADN par chaleur a été réalisée sur tous les échantillons positifs sur XLD qui ont ensuite été amplifiés par PCR avec les amorces *invA1* et *invA2* permettant la mise en évidence du gène *invA* (284 bp). On a utilisé un contrôle positif (*Salmonella enterica*) et un contrôle négatif (sans ajout d'ADN) (Malorny, 2003).

Une fois la réplique effectuée on a réalisé l'électrophorèse avec 10 µl de chaque mix d'échantillon et des deux contrôles à 100V pendant 45 minutes (Annexe 5).

I.2.4 Typage des souches de *Salmonella*

Dans le cas d'un résultat positif en PCR, l'échantillon a été de nouveau ensemencé sur une plaque XLD pour sélectionner une colonie pure qui a été envoyée au laboratoire de référence de bactériologie ETA « maladies transmises par les aliments » de l'ISP à Santiago. Il y est effectué un sérotypage de la souche de salmonella identifiée, selon le schéma Kauffman-White (Kauffman, 1972 ; Rowe et Hall, 1980), basé sur la détection des antigènes somatiques O, flagellaires H et de surfaces par agglutination active directe sur lame. Les animaux qui ont été prélevés n'ont reçu aucune vaccination, il était donc possible de faire un sérotypage car il n'y avait pas d'altération du diagnostic sérologique.

I.3 Antibiorésistance des souches isolées

Un antibiogramme est réalisé pour tester la susceptibilité antimicrobienne et voir si les souches de *Salmonella* rencontrées présentent une résistance aux antibiotiques. L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vivo*. Pour cela est utilisée la méthode de diffusion de Kirby Bauer (Watts et al, 2002), recommandée par l'OMS, basée sur la diffusion de disques imprégnés d'antibiotiques et de mesure des diamètres des halos d'inhibition (Annexe 6, voir figure 11).

Les antibiotiques suivants ont été testés : Gentamicine (CN, aminoside), Cephadrine (CE, céphalosporine 1^{ère} génération), Cefotaxime (CTX, céphalosporine 3^{ème} génération), Tétracycline (TE, cycline), Amoxicilline+acide clavulanique (AMC, bêta-lactamine), Triméthoprim-sulfaméthoxazole (SXT, sulfonamide), Cefradroxyle (CFR, céphalosporine 1^{ère} génération), Ampicilline (AMP, bêta-lactamine), Cefotiofur (EFT, céphalosporine 3^{ème} génération, usage vétérinaire uniquement), Enrofloxacin (ENR, fluoroquinolone nouvelle génération, usage vétérinaire uniquement). Dans le cas des salmonelles, en dépistage de routine, seule l'ampicilline, une quinolone et le Triméthoprim-sulfaméthoxazole sont testés (Watts et al, 2002). Ici un ensemble d'antibiotiques humains et vétérinaires sont testés, pour avoir un panel plus large car aucun antibiotique en particulier n'est utilisé habituellement dans les BPS et que certains éleveurs ont l'habitude d'utiliser des traitements humains pour soigner leurs animaux.

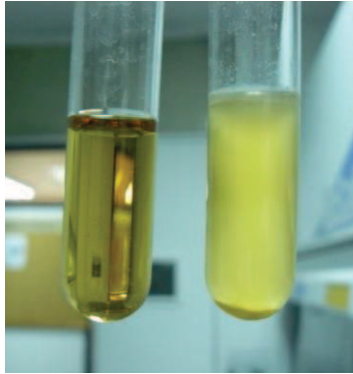


Figure 7 : Echantillon à gauche : négatif dans milieu APT / échantillon à droite : positif dans milieu APT (Cliché S. Dépraz©)

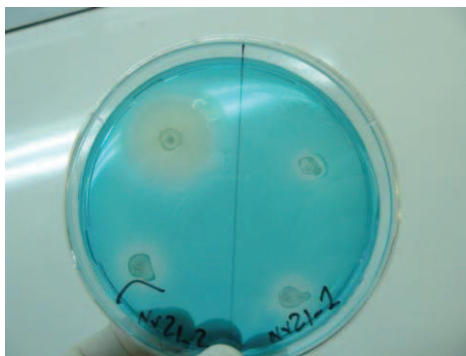


Figure 8 : Echantillon à gauche : positif / à droite : négatif sur gélose MSR (Cliché S. Dépraz©)



Figure 9 : Echantillon positif sur gélose XLD (Cliché S. Dépraz©)

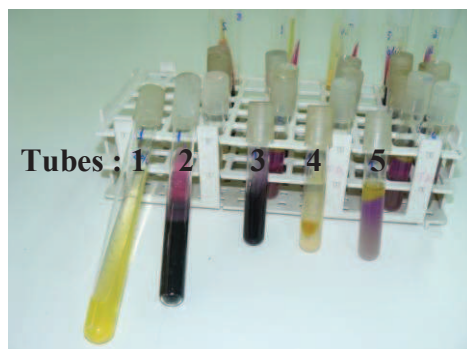


Figure 10 : Tests biochimiques positifs pour Salmonella : Tube 1 - Activité uréase ; tube 2 - gélose TSI ; tube 3 - gélose LIA ; tube 4 - activité phénylalanine désaminase ; tube 5 - gélose MOI (Cliché S. Dépraz©)

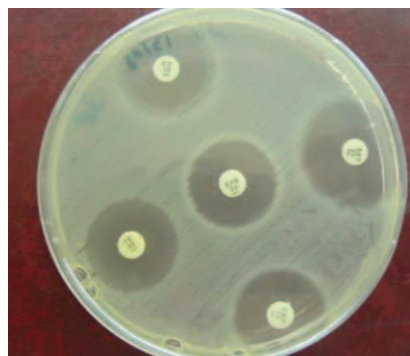


Figure 11 : Antibiogramme avec disques imprégnés d'antibiotiques sur souches de Salmonella (Cliché S. Dépraz©)

II Résultats

II.1 Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés dans 51 BPS dans la sixième région. Un total de 365 échantillons, volailles et porcs confondus, ont été collectés. Cependant 4 BPS échantillonnés ne correspondaient pas au critère « volailles ET porcs » dans l'élevage (trois sans porcs, et un sans volaille, échantillonnés à la demande de PRODESAL), ils ont donc été analysés mais pas pris en compte dans les résultats de l'étude. Ainsi 47 BPS ont été comptabilisés dans l'étude, soit 346 échantillons, selon une répartition décrite dans le tableau 2. Les résultats présentés dans ce rapport correspondent aux résultats de la première période de prélèvement, réalisée d'Avril à Juin.

Tableau 2: Résumé de l'échantillonnage réalisé dans la sixième région

Prélèvement	Zone centrale	Zone côtière	Total
<u>BPS</u>	26	21	47
<u>échantillons</u>	198	148	346
<u>Volailles</u>	136	108	244
<u>Porcs</u>	62	40	102

La répartition géographique des BPS est représentée sur la carte en annexe 7. La collecte a été effectuée sur 4 communes : Placilla, Nancagua, Malloa et Navidad. On a obtenu une médiane de 7 animaux échantillonnés dans chaque BPS, avec une médiane de 5 volailles et 2 porcs échantillonnés. Or la moyenne pour le nombre de porcs présents dans ces 47 élevages étant de 2,17, la quasi-totalité des porcs ont été prélevés. Environ 17% des volailles présentes dans chaque élevage ont été échantillonnées. Treize animaux malades (douze poules, poulets et un porc), soit 3,75% de la totalité des animaux, ont été prélevés. La plupart des volailles malades présentaient des signes respiratoires (sécrétions nasales, matériel caséux) ou une très faible condition physique. Le porc malade présentait de la diarrhée et était cachexique.

II.2 Résultats du dépistage et sérotypage des souches de *Salmonella*

II.2.1 Résultats préliminaires et changement de protocole

Le protocole de culture bactériologique a été testé sur tous les échantillons de la commune de Placilla (157 échantillons). Cependant on a obtenu très peu d'échantillons positifs sur gélose MSRV (15) et un seul sur XLD. De plus il a été constaté au cours des autres études sur *Salmonella* réalisées au sein du même laboratoire, utilisant le même protocole,

que l'on rencontrait beaucoup d'échantillons suspects de *Salmonella* qui se révélèrent finalement être des *Proteus*. On a donc supposé qu'il y avait un phénomène de croissance de flore compétitive dans le milieu qui pouvait empêcher le diagnostic de *Salmonella*. En effet, d'après la littérature (OIE, 2005), le milieu de pré-enrichissement aide au développement du faible nombre de salmonelles, mais si on a des souches peu vigoureuses, collectées à partir de fèces, on peut avoir une croissance de flore compétitive durant cette étape, qui peut inhiber la croissance de *Salmonella*. Pour éviter ce phénomène il faut donc utiliser un milieu de pré-enrichissement sélectif.

Il a été décidé de modifier le protocole initial (présenté dans I.2) et d'ajouter au cours de la phase de pré-enrichissement un agent sélectif dans le milieu APT: la Novobiocine à 4mg/ml, qui inhibe entre autres les bactéries du genre *Proteus*. L'ajout de la Novobiocine permet d'augmenter la spécificité mais aussi la sensibilité (Jensen et al, 2003). Le reste du protocole est resté inchangé. Les 157 échantillons provenant de Placilla déjà testés ont tous été répétés. Cette fois on a obtenu 38 échantillons positifs sur gélose MSR/V (les 15 obtenus par le protocole antérieur et 23 qui étaient négatifs avec le premier protocole). Nous avons obtenus un seul échantillon positif sur XLD, le même qu'avec l'ancien protocole. Ainsi nous n'avons pas obtenu plus d'échantillons révélés positifs sur la dernière gélose (XLD) mais nous savons que ce nouveau protocole permet néanmoins une meilleure sélectivité aidant à la croissance de salmonelles (Jensen et al, 2003). Il a été décidé de conserver ce nouveau protocole pour la suite de l'étude.

II.2.2 Dépistage de *Salmonella* dans la population étudiée et caractérisation des souches

Confirmation de présence de *Salmonella* :

Trois échantillons ont été déterminés comme positifs sur gélose XLD : PL20-7, NV20-7, NV20-9. Deux autres échantillons ont présenté une croissance douteuse (obtention de colonies noires mais sur milieu jaune, caractéristique de souches H₂S positives mais lactoses positives, et colonies blanches rosées sur milieu rouge caractéristique de lactoses négatives mais H₂S négatives) : PL01-8, NV01-3. On a donc réalisé la confirmation biochimique et PCR pour ces 5 échantillons (Tableau 3 et 4).

Tableau 3 : Résultats de l'identification biochimique des cinq échantillons suspects sur gélose XLD (Xylose Lysine Desoxycholate)

Echantillon	Gélose TSI			Gélose LIA			Gélose MIO			Urease	Phénylalanine	Microorganisme
	TSI	GAS	H2S	LIA	GAS	H2S	Mob.	Indole	Ornithine			
PL20-7	K/A	+	+	K/A	+	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella sp.</i> <i>Citrobacterfreundii</i> *
NV20-7	K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> subspecie I Autres <i>Salmonella</i>
NV20-9	K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> subspecie I Autres <i>Salmonella</i>
PL01-8	K/K	+	+	K/A	-	+	+	+	-	-	-	Non salmonella
NV01-3	K/K	+	+	K/A	+	+	-	+	-	-	-	Non salmonella

* Peut donner des réactions similaires.

Tableau 4 : Résultats biochimiques et PCR des échantillons suspects sur gélose XLD (Xylose Lysine Desoxycholate)

Echantillon	Culture bactériologique	Confirmation biochimique	PCR invA
PL01-8	+	(douteux)	-
PL20-7	+		+
NV01-3	+	(douteux)	-
NV20-7	+		+
NV20-9	+		+

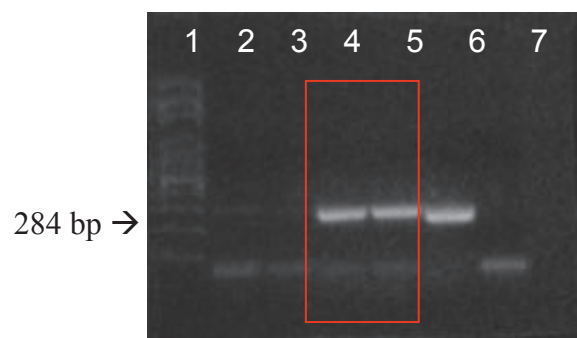


Figure 12 : Identification de *Salmonella enterica* sur gel d'électrophorèse des produits de la PCR
1 : Poids moléculaire standard ; 2 et 3 : échantillons négatifs (PL01-8, NV01-3) ; 4 et 5 : échantillons positifs (NV20-7, NV20-9) ; 6 et 7 : contrôle positif et négatif

Ainsi trois échantillons sur les 346 testés ont été confirmés positifs par tests biochimiques et PCR (détection du gène *invA*) pour *Salmonella enterica* : PL20-7, NV20-7, NV20-9. Un échantillon provient d'un élevage familial de la zone centrale de la sixième région, dans la commune de Placilla. Les deux autres proviennent du même élevage familial, situé dans la zone côtière de la sixième région, dans la commune de Navidad. Les trois échantillons positifs proviennent de porcs (un jeune et deux adultes), ne présentant pas de symptômes apparents et en bonne condition physique. Aucune souche de *Salmonella* n'a été détectée chez les volailles. Sur les treize individus malades prélevés, aucun échantillon n'a été positif.

La présence de salmonelles a été observée chez 4.2% des élevages familiaux échantillonnés (un élevage familial est considéré positif quand au moins un des échantillons prélevés dans cet élevage est positif). 2,94% des porcs testés ont présenté un résultat positif à *Salmonella enterica*, 0% chez les volailles.

Caractérisation des souches de salmonella isolées :

Seuls deux des échantillons positifs ont été sérotypés (tableau 5). En effet, il n'a pas été possible d'obtenir une nouvelle croissance de colonies nécessaires pour faire le sérotypage, à partir de l'échantillon PL20-7. Il semblerait que la souche de salmonelle était présente en très faible quantité car très peu de colonies avaient été obtenues lors du diagnostic de culture bactérienne, ce qui n'a pas permis une deuxième croissance.

Tableau 5: Sérotypage des souches de *Salmonella* dépistées au cours de l'échantillonnage (réalisé par l'ISP de Santiago)

Echantillons	Souches de <i>salmonella</i>
NV20-7	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Falkensee
NV20-9	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Mbandaka

II.3 Antibiorésistance des souches isolées

Tableau 6 : Diamètre en mm des halos d'inhibition de l'antibiogramme et interprétation
S : sensible ; I : intermédiaire

Résultats de l'antibiogramme	CN (10µg)	CE (30µg)	EFT (30µg)	CTX (30µg)	ENR (5µg)	TE (30µg)	AMC (30µg)	SXT (25µg)	CFR (30µg)	AMP (10µg)
<i>S. enterica</i> Falkensee	20,8	22,4	25,4	30	30	21,6	28	30	21,4	26
Résultat	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> Mbandaka	18,8	16	19	24,8	24	20	25,4	24	18,8	20
Résultat	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S

D'après les tables d'interprétation du halo d'inhibition des disques d'antibiotiques (Annexe 6), la souche *Salmonella enterica* serovar Falkensee a été trouvée sensible à tous les antibiotiques testés. La souche *Salmonella enterica* serovar Mbandaka a présenté une sensibilité intermédiaire pour l'antibiotique Ceftiofur (EFT, céphalosporine de troisième génération, d'usage vétérinaire uniquement) ainsi que pour l'antibiotique cephadrine (CE, céphalosporine de première génération, utilisé en médecine humaine). Le statut intermédiaire signifie que l'antibiotique n'est efficace que dans certaines conditions, à fortes doses. L'antibiogramme n'a pas été fait sur la souche de l'échantillon PL20-7, pour les mêmes raisons que précédemment.

III Discussion

III.1 Interprétation et limites des résultats

Pour la première fois la présence de souches de salmonelles dans des élevages familiaux de volailles et porcs a été mise en évidence au Chili. Suite à ce premier échantillonnage au sein de la région « Libertador General Bernardo O'Higgins », 4,2% des BPS ont été diagnostiqués positifs. La population étudiée présente donc une faible proportion d'élevages positifs. Il est difficile de comparer cette valeur à d'autres études réalisées sur les BPS en Amérique du sud, car elles sont d'abord peu nombreuses et on constate que les résultats sont très variables. Même si l'ampleur de l'étude et la méthode diagnostique sont différentes (2441 échantillons collectés dans 256 élevages familiaux et testés par agglutination rapide sur lame), il a été trouvé une prévalence moyenne de 22,8% d'élevages testés séropositifs pour *Salmonella* sur les trois périodes de prélèvements dans des BPS dans l'état « Entre Rios » en Argentine (Xavier et al, 2011). Une étude au Mexique (Rosario, 2011), réalisée sur 30 échantillons dans des élevages familiaux n'a décelé quant à elle aucune présence de *Salmonella* (confirmation par hybridation d'ADN) et une étude au Paraguay en 2009 (Leotta et al, 2010) a obtenu 3,5% d'échantillons positifs sur 400 échantillons de volailles dans des BPS.

Même si nos analyses montrent que des élevages de la région étudiée sont clairement infectés par des salmonelles, il est possible que l'estimation de la présence de *Salmonella* dans cette région ne soit pas exacte. En effet il faut interpréter les résultats en prenant en compte un certain nombre de considérations incluant des limites épidémiologiques et expérimentales. Tout d'abord la faible valeur de BPS positifs peut être due à une faible présence de bactérie circulant dans cette région, cependant le mode d'échantillonnage ne permet pas de conclure sur ce point. De plus le nombre de BPS inclus dans l'étude et leur localisation a également été revu à la baisse par un impératif budgétaire. Il faut aussi considérer que le pourcentage d'élevage positif a pu être sous estimé au vu du choix d'individus prélevés dans chaque BPS. En effet, le nombre de volailles échantillonnées

a été fixé en choisissant un taux de prévalence limite dans l'élevage de 50 % pour un risque d'erreur de 5%. Or cette valeur a été choisie arbitrairement au vu de l'absence de bibliographie, ce qui ne nous a peut être pas permis d'avoir un échantillon représentatif de l'élevage, et donc d'obtenir des faux négatifs.

Il faut aussi prendre en compte le fait qu'il y a une excrétion intermittente des salmonelles chez les porcs et les volailles qui sont donc souvent porteurs asymptomatiques. En effet il a été montré que des porcs, chez qui on a inoculé 10^4 UFC de *S.Typhimurium*, présentent une excrétion très intermittente 4 semaines après l'inoculation, mais restent excréteurs jusqu'à 10 semaines (Fravalo et al, 2003). Il est donc possible que des individus considérés négatifs dans cette étude soit en fait porteurs de la bactérie. Pour vérifier cela il faudrait de nouveau échantillonner ces individus, à intervalles réguliers, ce qui semble peu envisageable d'un point de vu financier.

Le mode de prélèvement a aussi une influence importante sur les résultats car il a été montré que les écouvillons rectaux ne sont pas le mode de prélèvement le plus sensible pour la détection de salmonelles (Stone and al, 1995 ; Wood and al, 1989), en particulier par la faible quantité de matière fécale collectée. Cependant les autres modes de prélèvement semblent peu envisageables dans le contexte de l'élevage familial. En effet le prélèvement d'une portion de cæcum est une des méthodes les plus sensibles, mais il n'est pas possible de demander aux familles de sacrifier certains de leurs animaux pour des raisons éthiques. Quant aux techniques de prélèvement dans l'environnement (chiffonnettes), elles semblent moins adaptées à ce mode d'élevage cependant elles restent envisageables.

La faible proportion d'échantillons positifs peut aussi s'expliquer par la technique de dépistage utilisée, même si ce protocole (ISO 6579) est celui recommandé par l'OIE et utilisé par le SAG au Chili. En effet le milieu MSR/V présente une sensibilité assez faible de 63.4% et une spécificité de 99.0% pour *Salmonella*, on peut donc avoir une part importante de faux négatifs. Cependant il s'agit d'un des milieux les plus sensibles pour les salmonelles, et qui présente la plus grande facilité de lecture (temps de travail, spécificité) par rapport à d'autres milieux tel que la gélose Hektoen enteric ou milieu au tétrathionate-vert brillant (Dusch et Altwegg, 1995). Le milieu XLD quant à lui présente de bonnes sensibilité (93, 3%) et spécificité (95,2%) (Stringer et al, 2003) ; mais ces valeurs sont plus faibles pour des échantillons fécaux (Se : 68,8% et Sp :79%) lorsqu'ils sont diagnostiqués uniquement par XLD. Par contre, sur la gélose XLD, on utilise les critères biochimiques des salmonelles pour effectuer le dépistage, or il existe certaines souches de salmonelles atypiques, tel que les Salmonelles H₂S négatives (13% des colonies présentent chez les volailles d'après Waltman, 2000) qui croissent sous forme de colonies roses, et les souches lactose positives qui forment des colonies jaunes avec un centre noir ou non (SAG, 2000). Ces critères ont été pris en compte pour la lecture des échantillons, mais on ne peut écarter certains faux négatifs.

Enfin il ne faut pas oublier qu'une bactériologie négative ne signifie pas forcément absence de salmonelles car on ne peut pas détecter l'agent pathogène s'il est en trop faible quantité dans l'échantillon.

La technique PCR *Salmonella* présente une sensibilité de 99,6% et une spécificité de 100% pour le gène *invA* (Malorny et al, 2002), on a donc une très grande fiabilité de cette méthode. Cependant il n'est pas possible de l'utiliser comme unique test sur tous les échantillons au vu de son coût élevé.

Nous avons constaté qu'aucune souche de salmonelle n'a été détectée chez les volailles échantillonnées. Ceci peut s'expliquer par l'absence de salmonelles chez cette espèce, mais cela semble peu probable puisqu'elle est aussi sensible que l'espèce porcine (Poppe, 2000). Cependant on a constaté que les écouvillons cloacaux permettaient de prélever très peu de matière fécale, en comparaison avec les écouvillons rectaux réalisés chez les porcs, ce qui pourrait être un facteur à l'origine de faux négatifs. Il faut aussi considérer que le diagnostic ISO 6579 utilise la gélose MSRV, qui se base sur une détection des salmonelles mobiles. Or les salmonelles *S. Gallinarum* sont des salmonelles immobiles, spécifiques des volailles, qui vont quand même présenter une grande croissance sur MSRV, mais pas de diffusion, et donc être possiblement écartées. On a donc de grande chance d'avoir sous estimé le nombre d'individus atteints par ses souches de salmonelles, non zoonotiques.

Les sérovars rencontrés sont des sérovars non spécifiques d'hôte. Il s'agit de souches qui ne sont pas des plus communes chez le porc (Willeberg, 2000). On peut retrouver *S. enterica* Mbandaka chez les volailles, les porcs et les hommes, mais aussi chez les bovins, ovins (Davis et al, 2004 ; Hozowski et Wasyl, 2001). Cette souche de salmonelles peut aussi être rencontrée dans l'alimentation des animaux et les produits d'origine animale (Hozowski et al, 1999, Gill et al, 2003). Des souches de *S. Mbandaka* ont déjà été observées en Europe notamment en Belgique, Italie ainsi qu'en Australie et aux Etats-Unis plus récemment (Hozowski et Wasyl, 2000). Le nombre de cas humain dûs à *S. Mbandaka* augmente depuis les années 1990, et les volailles et porcs représentent une importante source de *S. Mbandaka* pour l'homme (Filioussis et al, 2008). *S. enterica* serovar Mbandaka est placé au 13^{ième} et 17^{ième} rang parmi les trente sérovars de salmonelles les plus fréquemment rapportés de source respectivement non humaine non-clinique et non humaine clinique aux Etats-Unis en 2005. Les cas cliniques de *S. Mbandaka* provenaient principalement de bovins, puis de porcs et assez peu de volailles. Ce sérovar est aussi à l'origine de nombre de cas non négligeable en santé humaine, puisqu'il fait parti des 30 sérovars de *Salmonella* les plus fréquemment rencontrés aux Etats-Unis en 2005 (CDC, 2007). De plus le sérovar Mbandaka a déjà été isolé en production commerciale avicole au Chili en 2009 (SAG, 2011) ainsi qu'en production porcine (Villamil et al, 2012). Ainsi, même si il n'est pas parmi les sérovars les plus souvent rencontrés, *S. Mandaka* est quand même responsable de nombreux cas en santé humaine, mais aussi chez les volailles et porcs partout dans le monde et donc potentiellement responsables d'infections graves.

Le sérovar Falkensee apparait beaucoup plus rarement dans la littérature, même si des cas chez le porc ont déjà été rapportés, entre autres au Danemark (Willeberg, 2000) et

aux Etats-Unis (Davis et al, 2003). On peut aussi le retrouver chez l'homme même si il reste un sérovar inhabituel (Old et al, 1994). Aux Etats-Unis, le nombre de cas clinique humains rapporté du à *S. Falkensee* entre 1995 et 2005 est de 8, alors qu'on a 1962 cas rapportés dûs à *S. Mandaka* et entre 70000 et 80000 pour les sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium*, les deux sérovars plus fréquents en humaine (CDC, 2007). On voit donc qu'il s'agit d'un sérovar assez peu fréquent et non rencontré au Chili dans la littérature.

Le risque de transmission et circulation de ces sérovars est important puisqu'ils peuvent avoir pour hôte d'autres animaux, mais aussi les hommes. De plus, les élevages familiaux agissent comme des réservoirs de sérovars de *Salmonella* qui ne sont peut être pas présents chez les animaux en production industrielle et chez l'homme au Chili, ce qui représente un risque majeur pour la santé humaine et la production chilienne.

L'antibiogramme réalisé sur ces deux souches de salmonelles ne nous a pas permis de confirmer une résistance aux antibiotiques. Il est nécessaire de faire une CIM pour le sérovar Mbandaka qui présente deux statuts intermédiaires pour Ceftiofur et Cefradine (céphalosporines). En effet, dans le cas d'un statut intermédiaire, il est considéré que la bactérie pourrait être résistante *in vivo*, or les salmonelles sont censées être sensibles aux céphalosporines. Cependant il y a absence de programme de pharmacovigilance dans les BPS et selon l'enquête réalisée dans cet élevage aucun traitement antibiotique n'a été appliqué chez les porcs ni chez les volailles. Ainsi, si l'on conclue à une certaine résistance, il pourrait donc s'agir de phénomène de résistance environnementale avec circulation de souches déjà résistantes dans un environnement ou il n'y a pas d'utilisation d'antibiotiques. Ceci soulignerait alors un gros problème d'utilisation des antibiotiques et sa conséquence sur les souches de *Salmonella* circulantes. Au Chili, des souches de salmonelles résistantes à des antibiotiques de médecine humaine ont déjà été mises en évidence (San Martin et al, 2005 ; Villamil et al, 2012). De plus cela aurait aussi un impact au niveau de la santé humaine, avec circulation de souches résistantes à des antibiotiques utilisés en santé humaine. De plus la Ceftiofur est une céphalosporine de 3^{ième} génération d'usage vétérinaire, qui est apparentée à d'autres céphalosporines qui sont utilisées dans le traitement de plusieurs types d'infections, notamment les cas de salmonelloses graves chez les enfants.

III.2 Impact des résultats obtenus sur la poursuite du projet

Une nouvelle phase d'échantillonnage va être réalisée de septembre à novembre, avec pour objectif d'aller plus au sud dans les zones de la côte et centrale, ainsi que de faire des prélèvements dans la zone de la Cordillère. Cela permettra d'avoir un échantillonnage à différentes saisons, et ainsi avoir une représentation plus précise des possibles agents pathogènes circulant dans les BPS. Cependant la détection de souche de *Salmonella* au cours de ce premier échantillonnage permet déjà d'inclure les salmonelles au sein du projet plus

vaste de recherche et évaluation de la prévalence des agents pathogènes circulant dans les BPS de la région centrale du Chili. Ce projet est prévu sur trois ans et aura comme objectif principal la détection d'influenza A et de *Salmonella*, *E.coli* et *mycoplasma*. Cette fois une prévalence sera déterminée à partir d'un échantillonnage aléatoire d'environ 450 BPS. Il est envisagé de modifier le protocole de prélèvement et de dépistage pour les salmonelles lors de ce prochain projet, afin d'avoir une meilleure sensibilité.

Suite à la détection de *Salmonella*, les éleveurs présentant des animaux positifs ont été informés par l'intermédiaire des intervenants de Prodesal. Des réunions de conseils et d'informations vont aussi être mises en place pour tous les éleveurs familiaux des communes visitées, en partenariat avec Prodesal.

Rapport-Gratuit.com

Partie 3 : Rôle des systèmes d'élevage familiaux de volailles et porcs dans le maintien et la circulation de pathogènes : résultats préliminaires du projet global

Nous avons vu qu'il y avait présence de salmonelles dans les BPS de la sixième région du Chili. Des analyses sont encore en cours pour savoir s'il y a également présence d'*E. coli* et de virus influenza A dans ces élevages. Cependant la question se pose alors de l'impact et du rôle de ce système d'élevage dans le maintien et la circulation d'agents pathogènes au Chili. Pour cela il était nécessaire de caractériser le fonctionnement de ces élevages familiaux de porcs et volailles, ce qui a été l'objet de la thèse d'une autre étudiante, à l'aide du questionnaire réalisé auprès de tous les propriétaires des élevages chez qui nous avons effectué les prélèvements. Ne sont représentés ici que certains résultats de l'enquête (voir annexe 8) qui nous permettent d'avoir un premier aperçu du possible rôle des BPS comme réservoirs et sources de diffusion d'agents pathogènes.

En considérant que l'on a présence de salmonelles dans un élevage, nous allons aborder ici quelques facteurs de risque de maintien et dissémination de cet agent pathogène au vue des conditions d'élevage pratiquées dans les BPS que nous avons échantillonnés.

I Facteurs de risque de maintien de l'agent pathogène

Très peu de soins sont dispensés aux animaux malades, et en majorité il s'agit de traitements antiparasitaires. De plus dans 94% des BPS visités, les porcs ne sont pas vaccinés, et dans 96% des BPS les volailles non plus. Peu de règles d'hygiène strictes sont appliquées dans l'élevage et aucun pédiluve n'est utilisé dans ces élevages. Cependant 82% des familles ont dit se nettoyer suite au maniement des animaux, mais parfois juste les mains et qu'avec de l'eau, et rarement si les animaux ne sont pas touchés directement. De plus le programme de contrôle du SAG en production aviaire et porcine n'est pas appliqué aux élevages familiaux.

On peut donc voir qu'il y a de forte chance qu'une bactérie *Salmonella*, présent dans l'élevage, ne soit pas éliminée. En effet les conditions d'hygiène et de biosécurité restent encore faibles et constituent donc un critère de maintien d'agents pathogènes. De plus les animaux porteurs peuvent être asymptomatiques, comme on l'a vu chez les trois porcs positifs pour *Salmonella enterica*. Par contre on peut voir que peu d'éleveurs de BPS nourrissent les animaux avec des restes d'alimentation, et la plupart leur donnent de l'eau potable, ce qui limite déjà une possible contamination. De même la gestion de la mortalité se fait dans de bonnes conditions d'hygiène pour les porcs (85% enterrent ou brûlent les animaux morts) mais beaucoup moins pour la volaille (seulement 52%).

II Facteurs de risque de dissémination, diffusion de l'agent pathogène

Il y a tout d'abord un contact possible entre les différents animaux de l'élevage, qui partagent le même environnement, car même si les porcs sont le plus souvent confinés (83%), les volailles elles circulent librement sur la propriété. De plus 65% des élevages adjacents élèvent aussi des volailles et porcs et on a souvent un contact avec les animaux des élevages voisins car seulement 22% ont une délimitation réelle de leur parcelle. Le contact des animaux avec l'environnement extérieur est aussi possible. Les familles estiment dans 96% des cas que leurs volailles peuvent avoir un contact avec des oiseaux sauvages. De plus 67% des BPS ont un cours d'eau à proximité de l'élevage, accessible par les animaux. Enfin les animaux de l'élevage et les membres de la famille ont un contact étroit permanent et dans 94% des cas, les personnes extérieures à la ferme, venant sur la propriété, peuvent avoir un contact direct avec les volailles. Ainsi la dissémination d'agents pathogènes est également possible par le biais humain. Ainsi on a un fort risque de maintien et de transmission de *Salmonella* aux animaux et à l'homme dans les BPS, au vue des conditions d'élevage.

Au niveau de l'élevage des porcs (qui ont été les seuls porteurs de salmonelles détectés lors de cette étude) on constate de manière générale qu'ils sont la plupart du temps confinés tous ensembles, dans le même enclos, avec peu d'hygiène (contact de l'eau avec les excréments, l'aliment...). Ce facteur peut être une source de prolifération d'un agent pathogène une fois qu'il est présent dans l'élevage. Cependant les porcs ne sont jamais en liberté sur la propriété et sont peu déplacés, ce qui diminue le risque de dissémination. Mais dans 65% des BPS visités, le renouvellement des porcs se fait par achat de jeunes porcelets dans le voisinage. De plus, pour la reproduction, il y a le plus souvent qu'un seul male reproducteur dans une zone, et il est transporté d'un élevage à l'autre pour l'accouplement. Ces deux paramètres représentent donc des facteurs de risque importants de dissémination d'agents pathogènes. Dans le cas des volailles, on a constaté également que leur mode d'élevage peut entraîner de fort risque de dissémination de germes, même si lors de cette étude nous n'avons pas détecté de présence de salmonelles chez cette espèce. En effet dans 94% de ces BPS, les volailles ne sont pas confinés en permanence et dans 60% sont en contact avec les animaux du voisinage (avec seulement 29% pour le porc), et dans 94% avec les visiteurs. De plus 44% des éleveurs interrogés jettent leurs volailles mortes à la poubelle ou dans les champs environnants (seulement 8% pour les porcs), et 76% n'apportent aucun soin ou traitement à leurs volailles malades. Tous ces critères entraînent de forts risques de propagation d'agents pathogènes.

Ainsi les élevages familiaux du Chili ont un potentiel de réservoirs de souches de *Salmonella* et possiblement d'autres germes, ainsi que de diffusion, ce qui représente un risque important au niveau national pour l'homme mais aussi pour la production industrielle.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de déterminer la présence ou non de souches de *Salmonella* dans les élevages familiaux de volailles et porcs dans la sixième région du Chili « Libertador General Bernardo O'Higgins ». L'étude a été menée sur 47 élevages familiaux, soit 346 animaux, dans quatre communes. Le dépistage a été réalisé par culture bactériologique et les échantillons positifs ont été confirmés par analyses biochimiques et PCR *invA*. Un sérotypage ainsi qu'un antibiogramme ont été réalisés sur les souches rencontrées.

Au cours de l'étude, trois échantillons ont été confirmés positifs, tous provenant de porcs. La présence de salmonelles a été observée chez 4.2% des élevages familiaux échantillonnés (un élevage familial étant considéré positif quand au moins un des échantillons prélevés dans cet élevage est positif). Ainsi, pour la première fois au Chili, la présence de *Salmonella* en élevage familial a été démontrée. Or ce type d'élevage, caractérisé par un nombre d'animaux assez restreint, est aussi connu pour avoir un manque de normes sanitaires et de biosécurité. Ainsi il peut représenter un facteur de risque de maintien et diffusion de salmonelles, au sein des élevages familiaux eux-mêmes mais aussi à la production industrielle avicole et porcine et à la population humaine. De plus deux des souches rencontrées ont été sérotypées : il s'agit de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Falkensee et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka. Or il s'agit de souches zoonotiques, assez rares en production de volailles et porcs. De plus, aucune information de la présence de la souche *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Falkensee au Chili n'a été trouvée dans la littérature. L'antibiogramme a rapporté que la souche *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka présentait un statut de résistance intermédiaire à deux antibiotiques, ce qui pourrait indiquer la circulation de souches résistantes dans l'environnement.

L'étude a été réalisée au sein d'un projet préliminaire de recherche ayant pour objectif une caractérisation de ce type d'élevage au Chili, ainsi que la détermination de présence de virus influenza A. Le projet doit ensuite se poursuivre sur trois ans ou l'étude sera approfondie en effectuant un échantillonnage aléatoire sur plus d'élevages et plus de régions afin de pouvoir déterminer une prévalence des élevages atteints par les salmonelles, influenza A et autres agents pathogènes.


Avec cette étude on a constaté d'une manière globale que les élevages familiaux peuvent être une source de circulation d'agents pathogènes. De plus il s'agit d'un type de production très peu contrôlée par les services vétérinaires et, au vue des conditions d'élevages, qui présente un risque de diffusion rapide de germes. Ceci représente alors un danger aussi bien en santé animale qu'en santé publique.

AGREMENT SCIENTIFIQUE


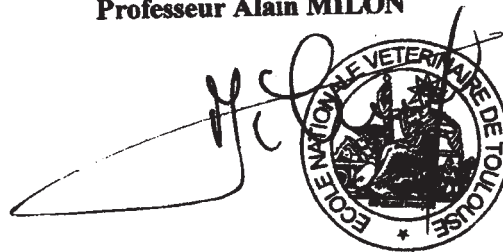
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, *Jean-Luc GUERIN*, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de *DEPRAZ Stéphanie* intitulée « *Détection et typage de salmonelles dans les élevages familiaux de volailles et porcs dans la région « Libertador General Bernardo O'higgins » au Chili* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 16/11/2012
Docteur Jean-Luc GUERIN
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeure *Christine DOQUES*



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT



Mlle *DEPRAZ Stéphanie*
a été admis(e) sur concours en : 2007
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2011
a validé son année d'approfondissement le : 25/09/2012
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Bibliographie

APA (2007). Una vision de la industria avicola chilena in : *Congrès d'agriculture du Chili*.

ASPROCER représenté par Gennaro (2006). El sector productivo desafíos para una producción sustentable. Présentation orale du responsable environnemental.

Berchieri Jr A, Murphy C.K, Marston K, Barrow P.A (2001). Observation on the persistence and vertical transmission *Salmonella enterica* serovars pullorum and gallinarum in chickens: Effect of bacterial and host genetic background. *Avian Pathology*, **30**, 221-231.

BVO (2010). Programa de Reducción de Patógenos. *Boletin veterinario oficial, salud animal y inocuidad de los alimentos*.

BVO (2008). Caracterización de la industria avícola nacional. *Boletin veterinario oficial, salud animal y inocuidad de los alimentos*.

Copan (2010): Swab guide, Venturi system : Product insert and how to use swab guide-technical note.

Davies RH, Dalziel R, Gibbens JC, Wilesmith JW, Ryan JMB, Evans SM, Byrne C, Paiba GA, Pascoe SJS et Teale CJ (2004). National survey for Salmonella in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999–2000). *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 750–760.

CDC (2007). Salmonella Surveillance in *Annual Summary,2005*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.

De Smedt J.M, Bolderdijk R.F, Rappold H, Lautenschlaeger D (1986). Rapid Salmonella Detection in Foods in Motility Enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium. *Journal of Food Protection* ,ISBN 49 510-514.

Dusch H et Altwegg M (1995). Evaluation of five new plating media for isolation of Salmonella species. *J. Clin. Microbiology*, **33:4**, 802

Kryger K.N, Thomsen K.A, Whyte M.A, Dissing M (2010). Smallholder poultry production livelihoods, food security and sociocultural significance. *FAO : Smallholder Poultry Production. Paper No. 4*. Rome.

Fica C, Alexandre S, Prat M, Fernandez R, Fernandez O, Heitmann G (2001). Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. *Rev Chil Infect*, **18:2**, 85-93.

Filioussis G, Petridou E, Johansson A, Christodoulopoulos G, Kritas S.K (2008). Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strains, isolated from a swine finishing farm in Greece. *African Journal of Microbiology Research*, **2**, 313-315.

Foley SL, Nayak R, Hanning IB, Johnson TJ, Han J, Ricke SC (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl. Environ. Microbiol*, **77:13**, 4273–4279.

Fravalo P, Cariolet R, Proux C et Salvat G (2003). Le portage asymptomatique de *Salmonella enterica* par les porcs : résultats issus de la constitution d'un modèle en conditions expérimentales. *Journées Recherche Porcine*, **35**, 393-400.

Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. *Manuel de bactériologie clinique 2^{ième} édition*, **2** Elsevier.

Gill C.J, Keene W.E, Mohle-Boetani J.C, Farrar J.A, Waller P.L, Hahn C.G, Cieslak P.R (2003). Alfalfa Seed Decontamination in a *Salmonella* Outbreak. *Emerging Infectious Diseases*, **9**, No. 4.

Grimont A, Grimont F et Bouvet P (2000). Taxonomy of the Genus *Salmonella* in *Salmonella* in domestic animals. *CABI Publishing*, 1-18

Guerrero P (2007). Industria avícola chilena *un desempeño exitoso en un mundo globalizado*. *Article du SAG*.

Hamilton-West C, Rojas H, Urcelay S. Backyard production systems spatial characterization, the first step to assess the risk level for the introduction and spread of highly pathogenic avian influenza in the main Chilean poultry production areas. in *GISVET*, Juillet 2007. Copenhagen, Denmark.

Hamilton-West C, Rojas H, Pinto J, Orozco J, Hervé-Claude LP, Urcelay S (2011). Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. *Res. Vet. Sci*.

Hoszowski A, Wasyl D (2001). Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates. *Veterinary Microbiology* **80**, 139-148.

Hoszowski A, Wasyl D, Truszczynski M (1999). Epidemiological investigation of *Salmonella* serovar Mbandaka strains isolated from animals, their feed and food products in Poland during the years 1995-1997. *Polish J. Vet. Sci*, **2**, 43-48.

INE. National agricultural census. 2007. Santiago, Chile. Données recueillies par Giovanna Ayala

Jensen A, Sørensen G, Baggesen D, Bødker R, Hoorfar J (2003). Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve Salmonella culture protocol of modified semisolid Rappaport–Vassiliadis. *Journal of Microbiological Methods*, **55:1**, 249-255.

Kabir SML (2010). Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **7:1**, 89–114.

Kauffmann F (1972). *Serological diagnosis of salmonella-species : Kauffmann-White-Schema*. Baltimore : Williams & Wilkins. 125p.

Laval A, Morvan H, Deperez G, Corbion B (1991). La salmonellose du porc. *Rec.Med. Vet*, **167**, 835-848.

Leotta G, K. Suzuki, F.L. Alvarez, L. Nuñez, M.G. Silva, L. Castro, M.L. Faccioli, N. Zarate, N. Weiler, M. Alvarez and J. Copes (2010). Prevalence of *Salmonella* Spp. in Backyard Chickens in Paraguay. *International Journal of Poultry Science*, **9:6**, 533-537.

Malorny, Hoorfar, Bunge and Helmuth (2003). Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl. Environ. Microbiol*, **69:1**, 290.

OIE (2005). SALMONELLOSES. *Manuel terrestre de l'OIE 2005*. Chapitre 2. 1 0. 3.

Old DC, Porter-Boveri M and Munrot DS (1994). Human infection in Tayside, Scotland due to *Salmonella* serotype Livingstone. *J. Med. Microbiol*, **40**, 134-140.

Pinto C, Urcelay S (2003). Biosecurity practices on intensive pig production systems in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, **59**, 139–145.

Polanco A (2002). PATÓGENOS ENTÉRICOS EMERGENTES: *Salmonella enterica*. Rapport du Département de Médecine Préventive Animale. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile.

Poppe C (2000). *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, 107-132.

Prado J, Solari G, M Alvarez A, Arellano C, Vidal A, Carreño C, Mamani M, Fuentes R, O’Ryan G, Muñoz F (2002). Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. *Rev. méd. Chile*, **130:5**.

Prat S, Fernández A, Fica A, Fernández J, Alexandre M, Heitmann I (2001). Phage typing of *Salmonella enteritidis* isolates from clinical, food, and poultry samples in Chile. *Revista Panamericana de Salud Pública*.

Rahman M.A, Samad M.A, Rahman M.B, Kabir S.M.L (2004). Bacterio-pathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. *Bangl. J. Vet. Med*, **2**, 1-8.

Dr Rosario (2011). Cepas diarreogénicas de *E. coli* y *Salmonella* en aves de traspatio. In : *XVII Congrès de l'association mondiale de vétérinaires aviaires (WVPA)*, Août 2011, Cancun, Mexique.

Rowe, Hall (1980). Kauffmann-White Scheme. Public Health Laboratory Service, Central Public Health Laboratory.

SAG (2000). Instructivo técnico para la detección de *salmonella spp.* móviles según metodología tradicional OIE, ISO 6579.

SAG (2011) . Programa de control de *Salmonella spp.* en establecimientos comerciales de aves in *Encuentro del Programa de Reducción de Patógenos*. 26 et 27 Avril 2011, Valdivia.

San Martin B, Lapierre L, Toro C, Bravo V, Cornejo J, Hormazabal JC, Borie C (2005). Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella spp.* from poultry farms. *Veterinary Microbiology*, **110**(3-4), 239-44.

Schwartz K.J (1999). Salmonellosis. Chapter 39 in Straw B.E, D'Allaire S, Mengeling W.L et Taylor D.J. *Diseases of Swine: 8th Edition*. Blackwell Science.

Sonaiya EB (2004). Poultry husbandry in small rural farms: a technical manual. FAO.

Sotto Arredondo (2007). *Estrategia de control y saneamiento predial del syndrome reproductive y respiratorio porcino (PRRS) en Chile*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Santo Tomas, Santiago. 64p.

Stone GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S, Galland JC, Curtiss R 3rd, Kelly SM, Chengappa MM (1995). Detection of *Salmonella typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR-hybridization. *J. Clin. Microbiol*, **33:5**, 1292-1295.

Temelli S, Kahya S, Eyigor A, Carli KT (2010). Incidence of *Salmonella* Enteritidis in chicken layer flocks in Turkey: results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods. *Poultry Sciences*, **89:7**, 1406–1410.

Ulloa J, Gonzalez M, Hernandez C, Villanueva MP, Fernandez H (2009). *Salmonella* Enteritidis in chicken carcasses and giblets in Southern Chile. *J Infect Dev Ctries*, **4:2**, 107-109.

Villamil A, González G, Ruiz A, Gadick P (2012). Characterization of *Salmonella spp.* strains isolated from Chilean swine farms in *22th IPVS congress*. 2012. Korea.

Waltman (2000). Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In *Salmonella in domestic animals*. *CABI Publishing*, 355-372.

Watts J.L, Shryock T.R, Apley M, Jones R.N, Lein D.H, Thornsberry C, Walker R.D, White D.G, Wu C.C (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition*, **22:6**.

Willeberg (2000). Salmonella in pork (Salinpork) : Pre-harvest and Harvest Control Options based on Epidemiologic, Diagnostic and Economic Research. Final report. *Salinpork group*. Contract No.fair1 CT95-0400.

Wood RL, Pospischil A, Rose R (1989). Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res*, **50:7**, 1015-1021.

Xavier J, Pascal D, Crespo E, Schell HL, Trinidad JA, Bueno DJ (2011). Seroprevalence of Salmonella and Mycoplasma infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. *Poultry Sciences*, **90:4**, 746-751.

Annexe 1 : Cartographie des régions du Chili et détails de la région VI



Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:ChileRegions.png> et http://www.patrimoniochileno.net/img/mapa_ohiggins.jpg

Annexe 2 : Préparation et caractéristiques des milieux de culture en bactériologie

Milieu APT (Difco™ APT Broth) : eau peptonnée phosphatée

Diluer 42, 6g de poudre dans 1L d'eau distillée et agiter jusqu'à dissolution complète. Le milieu est ensuite mis à l'autoclave à 121°C, pendant 15 minutes. La réponse culturale typique est la suivante (Biokar Diagnostics APT, 2009) :

Microorganismes	Croissance
⁽¹⁾ <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028	positive
⁽¹⁾ <i>Salmonella</i> Enteritidis CIP 82.97	positive
⁽²⁾ <i>Listeria monocytogenes</i> CIP 59.53	± 50% colonies / T ₀
⁽²⁾ <i>Listeria monocytogenes</i> CIP 78.31	± 50% colonies / T ₀
⁽³⁾ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	± 50% colonies / T ₀
⁽³⁾ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	± 50% colonies / T ₀

⁽¹⁾ 18 heures d'incubation à 37°C (Inoculum ≤10² microorganismes)

⁽²⁾ 60 minutes d'incubation à 20°C

⁽³⁾ 45 minutes d'incubation à 20-25°C

Gélose MSRV (Difco™ Rappaport-Vassiliadis Medium, Semisolid Modification) : gélose modifiée semi-solide Rappaport Vassiliadis.

Diluer 31,6g de poudre dans 1L d'eau distillée. Porter à ébullition pour dilution complète tout en agitant le mélange en continu (vitesse de 600tr/min). Attendre que le milieu refroidisse à 50°C et ajouter la Novobiocine de manière aseptique, reconstituée à 4mg/ml. Agiter bien à nouveau, puis distribuer rapidement le liquide dans les boîtes de pétri (il faut environ 100ml pour faire 4 plaques) et laisser la gélose se solidifier pendant 1h dans une hotte aspirante avant de refermer les boîtes. La réponse culturale typique est la suivante (Biokar Diagnostics MSRV, 2010) :

Microorganismes	halo/mobilité
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC™ 8090	negatif
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC™	negatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC™27853	negatif
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis ATCC™ 13076	positif
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC™ 14028	positif
<i>Salmonella senftenberg</i> (NCTC 10384)	positif

Gélose XLD (Difco™ XLD Agar): Xylose Lysine Desoxycholate

Diluer 45g de poudre dans 1L d'eau distillée. Porter à ébullition pour dilution complète tout en agitant le mélange en continu (vitesse de 600tr/min). Attendre que le milieu refroidisse à 50°C puis distribuer rapidement le liquide dans les plaques de pétri (il faut environ 100ml pour faire 6 plaques).

Microorganismes	caractéristiques
<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>	colonies jaunes
<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Salmonella</i>	colonies rouges
<i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i>	colonies rouges avec un centre noir

Annexe 3 : Identification biochimique de *Salmonella*

Protocole du laboratoire de maladies infectieuses de l'Université du Chili, Santiago
(Instructivo: Aislamiento de Salmonella y E. coli desde heces, Dr Retamal, d'après ISP, 2002).
Interprétation des tests biochimiques :

1. Gélose Triple Sugar Iron (TSI)

- a. Fermentation du glucose
 - Glucose fermenté: culot jaune (A).
 - Glucose non fermenté : culot rouge (K)
- b. Fermentation du lactose et/ou saccharose
 - Lactose et saccharose non fermenté : pente inclinée rouge (K)
 - Lactose et /ou saccharose fermenté(s) : pente inclinée jaune (A)
- c. Production de gaz
 - Apparition de gaz dans le culot
- d. Production de H₂S
 - formation d'une coloration noire entre le culot et la pente.

2. Gélose Lysine Iron Agar (LIA)

- a. Décarboxylation de la lysine
 - Lysine décarboxylée: culot pourpre (K).
 - Lysine non décarboxylée: culot jaune (A).
- b. Production de gaz
 - Apparition de gaz dans le culot
- c. Production de H₂S
 - formation d'une coloration noire entre le culot et la pente.
- d. Desamination de la lysine
 - Lysine désaminée : pente rouge (R).
 - Lysine non désaminée: pente pourpre (K).

3. Gélose Mobility Indole Ornithine (MIO)

- a. Mobilité

Les microorganismes immobiles croissent seulement sur la ligne d'ensemencement alors que les mobiles présentent un développement diffus éloigné de la ligne d'inoculation.

- b. Décarboxylation de la Ornithine

- Ornithine décarboxylée: coloration bleue, d'intensité variable
- Ornithine non décarboxylée: Coloration jaune.

c. Production de Indole

- Indole produite: Formation d'un anneau rouge à rosée à l'ajout du réactif de -Kovacs
- Pas de production d'Indole: anneau de couleur jaune.

Note: Le réactif de Kovacs se rajoute après la lecture de la mobilité et de la décarboxylation de la ornithine.

4. Activité uréase

- Uréase positive : coloration rose à fuscia
- Uréase négative : la coloration jaune du milieu se maintient

5. Phenylalanine désaminase

- Désamination : coloration rose
- Pas de désamination : la coloration jaune du milieu se maintient

Gélose TSI			Gélose LIA			Gélose MIO						
TSI	GAS	H2S	LIA	GAS	H2S	Mob.	Indole	Ornithine	Uréase	Phenylalanine	Microorganisme	
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> <i>subspecie I</i> <i>Otras Salmonella</i>	
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	<i>S. Choleraesuis</i> <i>Otras Salmonella</i>	
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	<i>Salmonella Typhi</i>	
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	<i>Salmonella sp</i> <i>S.Paratyphi A.</i>	
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	-	-	<i>S.Paratyphi A.</i>	
K/A	-	+	K/A	-	+	-	-	+	-	-	<i>S. Typhi (excepción)</i>	
A/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella subg. III</i> <i>(Arizona)</i>	
K/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella subesp.I</i> <i>Salmonella subg. III</i> <i>(Arizona)</i>	
K/A	+	+	K/A	+	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella sp.</i> <i>Citrobacterfreundii *</i>	

* Peut donner des réactions similaires.

NOTE: Pour TSI et LIA, il faut lire: pente/culot.

Annexe 4 : Protocole de détection du gène *invA* par PCR

(PROCEDIMIENTO LEI-P-006: PCR, Malorny et al, 2003)

Une colonie pure de chaque échantillon est prélevée sur gélose XLD et mélangé à 100 µl d'eau distillée ionisée. L'extraction d'ADN se fait par chaleur (10 minutes dans eau bouillante), puis les échantillons sont centrifugés (vitesse : 3000/5 min).

Etape 1 : Mix

Pour chaque échantillon un volume total de 12.5 µl/réaction de PCR est préparé. Pour ce faire 1 µl d'ADN de chaque échantillon est additionné à un mélange de réactifs (mix).

Le gène *invA* (284bp) est utilisé comme amorce, puisqu'il est présent chez toutes les souches de *Salmonella enterica*.

Réactifs	Concentration	Volumes (µL)
Buffer Taq 10 x	1x	1,25
MgCl ₂ 50 mM	1.6 mM	0,35
dNTPs 10 mM	0.2 mM	0,25
Primer 1 (<i>invA</i> 1)	0.5 uM	1,25
Primer 2 (<i>invA</i> 2)	0.5 uM	1,25
Taq pol	0.6-0.9 U	0,12
ADN échantillon		1
H ₂ O distillée		7.03
Volume final		12,5

Etape 2 : Thermocycleur (amplification de l'ADN)

Etape	Objectif	Température	Temps	Nombre cycles
1	Dénaturation initiale	94°C	5min	1
2	Dénaturation	94°C	0.35min	35
3	Liaison ou <i>annealing</i>	64.8°C	0.35min	35
4	Elongation	72°C	0.35min	35
5	Elongation finale	72°C	3min	1
6	Refroidissement	04°C		1

Annexe 5 : Protocole d' électrophorèse sur gel d' Agarose (1.5%)

Composition tampon TAE 1x : 20ml de TAE 50 x (Tris, acétate, EDTA) dans 1L d' eau distillée

Etape 1 : Préparation du gel

1. Diluer 1.5g d' Agarose (Agarose 100g) pour 100 ml de tampon TAE 1x.
2. Chauffer la solution aux micro-ondes jusqu' à homogénéisation de la solution.
3. Ajouter 2.5 μ l du réactif GelRed® pour 100 ml d' agarose.
3. Faire descendre la température à 60°C puis couler le gel et laisser sécher.
4. Enlever les peignes et placer le gel dans le *tank* d' électrophorèse.
5. Remplir le *tank* de TAE 1x jusqu' à immersion des puits.

Etape 2 : Electrophorèse

1. Ajouter 2.5 μ l de tampon de charge à chacun des échantillons (1 volume de tampon de charge pour 5 volume d' échantillon).
2. Placer 10 μ l de chaque échantillon dans les puits et 2.5 μ l de standard de poids moléculaire (Axygen®) dans le premier puit.
3. Fermer le couvercle et appliquer un champ électrique de 100 V pendant 60 minutes.
4. La lecture du gel se fait sous éclairage UV ($\lambda=302\text{nm}$, DyNA Light™, Labnet). La taille de l' ADN est estimée par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire 100 pb.

Annexe 6 : Protocole de sensibilité/ résistance *in vitro* aux antibiotiques des souches de *Salmonella*

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion en plaques de Kirby-Bauer (JL Watts et al, 2002). On le réalise sur gélose Muller-Hinton pour les entérobactéries.

Etape 1 : préparation de l'inoculum bactérien

Les souches à analyser et la souche contrôle (*Escherichia coli* ATCC 25922) sont ensemencées dans un milieu de culture (ici APT) mis à 37°C pendant 18-24h. Après cette période on ajuste l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique stérile ($1-5 \times 10^8$ UFC/ml) aux suspensions bactériennes pour obtenir une opacité équivalente à celle de l'étalon Mac Farland 0,5 .

Etape 2 : Inoculation et application des disques imprégnés

Chaque suspension bactérienne est striée de manière uniforme sur la gélose Muller- Hinton en utilisant un écouvillon de coton stérile. Une fois inoculées, on laisse les plaques sécher quelques minutes avant de déposer les disques imprégnés d'antibiotiques, en les éloignant au minimum d'un cm du bord. Les plaques sont ensuite mises à incuber à 37°C entre 18 à 24h.

Etape 3 : Lecture et interprétation

La lecture se fait en mesurant le diamètre du halo d'inhibition de croissance de la bactérie autour du disque imprégné. En les comparant avec les normes établies par le CLSI, on peut définir la souche de *Salmonella* comme sensible (S), sensibilité intermédiaire (I) ou résistant (R) à l'antibiotique testé.

Table des normes établies pour les antibiotiques testés au cours de cette étude.

Antibiotique	Résistant (diamètre en mm)	Intermédiaire (diamètre en mm)	Sensible (diamètre en mm)
Gentamicine	≤12	13-14	≥15
Cephadrine	≤14	15-17	≥18
Ceftiofur	≤17	18-20	≥21
Cefotaxime	≤14	15-22	≥23
Enrofloxacin	≤16	17-22	≥23
Tétracycline	≤14	15-18	≥19
Amoxicilline- Acide clavulanique	≤ 13	14-17	≥18
Trimethoprim- Sulfaméthoxazole	≤10	11-15	≥16
Cefradroxylo	≤14	15-17	≥18
Ampicilline	≤ 13	14-16	≥17

Annexe 8 : Résumé de certaines données recueillies au cours de l'enquête dans les BPS (D'après les données de Soledad Ruiz)

variable	catégorie	Moyenne (volailles)	Moyenne (porcs)
confinement	Libre	40%	6%
	Permanent	6%	83%
	mixte	54%	10%
Renouvellement	Auto-remplacement	70%	21%
	Achat aux voisins	10%	65%
	Achat au marché	0%	2%
	Achat à industries commerciales	6%	0%
	Par des projets de l'état	0%	4%
	Achat intermédiaire	14%	8%
Gestion mortalité	Enterré ou brûlé	52%	85%
	Mis à la poubelle	22%	4%
	Jeté loin de la maison	22%	4%
	Autoconsommation/vente	2%	2%
	Aucune	2%	0%
	Pas de réponse	0%	4%
alimentation	Restes de la consommation de la famille	0%	13%
	Alimentation de volailles/ porcs	22%	10%
	Fourrages, céréales	72%	60%
	Mixte	6%	17%
Origine de l'eau	Puit	14%	13%
	Canal	34%	27%
	Eau potable	52%	60%
Soins	Traitements chimiques	22%	54%
	Produits naturels	12%	2%
	Aucun	67%	44%
Vaccinations	Oui	4%	6%
	Non	96%	94%

Toulouse, 2012

NOM : Dépraz

PRENOM : Stéphanie

TITRE : *Détection et typage de salmonelles dans les élevages familiaux de volailles et porcs dans la région « Libertador General Bernardo O'Higgins » au Chili.*

RESUME :

Afin d'évaluer les agents pathogènes pouvant circuler dans les élevages familiaux du Chili, cette étude s'est concentrée sur la détection de *Salmonella enterica* et le sérotypage des souches rencontrées dans les élevages familiaux de la sixième région du Chili « Libertador General Bernardo O'Higgins ». Cette unité de production, encore très présente dans tout le Chili avec environ 150000 élevages, peut représenter une source de contamination des élevages industriels, ainsi qu'un danger zoonotique. L'étude a été réalisée sur 47 élevages possédant des volailles et des porcs avec un total de 346 échantillons prélevés. Le dépistage a été réalisé à partir d'écouvillons rectaux et cloacaux, analysés par culture bactériologique et confirmé par analyses biochimiques et PCR permettant de détecter le gène *invA* spécifique de *Salmonella enterica*. On a obtenu trois échantillons positifs, tous de porcs, dont deux dans le même élevage. Ainsi 4,2% des élevages échantillonnés ont été dépistés positifs pour *Salmonella enterica*. Deux des souches rencontrées ont été sérotypées : il s'agit de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Falkensee et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka. Ce sont des souches assez peu fréquentes en élevages de porcs et volailles mais potentiellement zoonotiques.

Cette étude a un impact important car elle a montré pour la première fois la présence de salmonelles dans les élevages familiaux du Chili. Le projet a aussi souligné le rôle que peut avoir ce type d'élevage dans le maintien et la circulation d'agents pathogènes au sein de populations animales et humaine. En effet, au vu des conditions d'élevages et des faibles mesures de biosécurité qui y sont appliquées, les systèmes d'élevage familiaux représentent un facteur de risque important de diffusion des salmonelles autant chez les animaux que chez l'homme, et qui plus est pourraient être résistantes à certains antibiotiques testés au cours de cette étude.

MOTS CLES : Salmonelles - élevages familiaux – volailles – porcs - Chili

ENGLISH TITLE: **Identification and typing of *Salmonella* in backyard poultry and pigs in the « Libertador General Bernardo O'Higgins » region of Chile.**

ABSTRACT

In order to investigate which pathogens could circulate in backyard productive system in Chile, we focused this study on detection of *Salmonella enterica* and on serotyping of strains in backyards in the sixth region of Chile « Libertador General Bernardo O'Higgins ». This production unit is still very common in Chile with no less than 150000 backyards, can play a major role in contamination of industrial production, and a zoonotic danger. 346 samples (rectal and cloacal swabs) were collected in 47 poultry and pigs backyards. The samples were first analyzed by bacteriological culture. Positive samples were confirmed by biochemical analysis and by PCR assay detecting *invA* gene, specific of *Salmonella enterica*. Three samples out of the 346 tested were determined positive for *S. enterica* using this method, all of them isolated from pigs. Two of the positive results were from the same farm, hence the overall prevalence of backyards infected with *Salmonella enterica* was determined to be 4.2 %. Two of the positive samples were further serotyped: one was *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Falkensee and the other one was *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka. These two strains are not very common in this type of production but they have a zoonotic potential.

This study is significant since it showed for the first time the presence of *Salmonella enterica* in backyards in Chile. Because of the management system of these farms and the poor biosecurity measures in place, our findings suggest the potential role of this farming system in the maintenance and the circulation of pathogens in animal and human populations of this region, pathogens which would be resistant to some antibiotics tested in this study .

KEY WORDS: *Salmonella* - backyard – poultry- pigs - Chile