

# Le portage asymptomatique de *Salmonella enterica* par les porcs : résultats issus de la constitution d'un modèle en conditions expérimentales

Philippe FRAVALO, Roland CARIOLET, Karine PROUX et Gilles SALVAT

Avec la collaboration technique de : B. BEAUREPAIRE, A. KERANFLEC'H, B. JAN, C. HOUDAYER, V. ROSE, S. QUEGUINER, Y. HASCOET.

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicoles et Porcines  
BP 53, 22440 Ploufragan

## Le portage asymptomatique de *Salmonella enterica* par les porcs : résultats issus de la constitution d'un modèle en conditions expérimentales

La problématique salmonelle dans la filière porcine se focalise sur l'identification des facteurs de risque notamment d'excrétion à l'élevage. Ceci nécessite l'établissement de modèles de portages asymptomatiques des salmonelles. Dans cette étude des doses comprises entre  $10^2$  et  $10^{10}$  *Salmonella* Typhimurium ont été inoculées à des porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés) en animaleries protégées. Le suivi clinique, technique, sérologique et bactériologique pour l'excrétion et la contamination des organes a été réalisé sur au moins six semaines. Les effets cliniques sont variables en fonction de la dose inoculée mais restent faibles de  $10^5$  à  $10^8$  UFC/porc avec des hyperthermies et des diarrhées limitées (48h) et non généralisées au sein du groupe. Pour  $10^4$  salmonelles par porc on peut parler de portage asymptomatique. Techniquement les performances ne sont altérées que pour des animaux ayant subi une inoculation importante. Cette étude permet de montrer que la sérologie définit à  $10^4$  *Salmonella* la dose minimum infectante. Pour cette dose le portage et l'excrétion, devenue intermittente en fin d'essai, ne sont confirmés que pour une partie du groupe d'animaux. Par contre dans les trois premières semaines post-inoculation (PI) les effets observés en bactériologie tant pour l'excrétion que pour la contamination des organes sont variables en fonction de la dose. Une dose contaminante très faible, légèrement inférieure à  $10^4$  UFC/porc avec une excrétion à partir de  $10^3$  *Salmonella* est mise en évidence. Les abattages ont été réalisés précocement ou à la fin de l'essai pour étudier les effets à court et à moyen termes d'un portage asymptomatique sur la contamination des organes.

## The asymptomatic carrying of *Salmonella enterica* by pigs : results obtained from a model of experimental infection

The problem of *Salmonella* in pig production is focused on the identification of risk factors namely excretion in the herd. A model of asymptomatic carriage was needed in order to study excretion in the herd. Therefore, we inoculated per os increasing doses, from  $10^2$  to  $10^{10}$ , of *Salmonella* Typhimurium in specific pathogen-free pigs maintained in protected animal housing. The clinical, technical, serological and bacteriological aspects of excretion and contamination of organs was monitored for at least 6 weeks. The effects of infection depended on the amount inoculation, but were small from  $10^5$  to  $10^8$  CFU/pig, with fever and diarrhoea only sporadically being seen for short periods (48 hours) within the group. The  $10^4$  CFU dose produced asymptomatic carriage. Growth performance was only decreased when higher inoculation doses were used. This study allowed us to define  $10^4$  *Salmonella* per pig as the seroconversion dose : after 6 weeks all the pigs were seropositive as opposed to the  $10^3$  CFU dose for which no seroconversion could be observed. When focusing on the bacteriological data from the first 3 weeks after inoculation the trial showed a dose related effect for both the frequency of excretion and organ contamination. Contamination occurred with slightly less than  $10^4$  CFU/pig, while excretion occurred after the  $10^3$  *Salmonella* inoculation level. The pigs were slaughtered during or at the end of the trial to study the short and medium term effects of asymptomatic carriage on contamination of organs.

## INTRODUCTION

Les salmonelles sont des entérobactéries capables d'entraîner des toxi-infections alimentaires (HAEGHBAERT et al., 2002) chez l'homme en cas de consommation d'un aliment où elles se trouvent en grand nombre. La problématique de type hygiène alimentaire liée aux salmonelles dans une filière implique tous les éléments de la chaîne de production, de l'élevage aux consommateurs. Si chaque étage de la production doit participer à la maîtrise de la transmission ou de l'amplification de la contamination, les points clés pour accéder à cette maîtrise du risque sont différents en fonction des stades de la production. Les produits porcins ont été impliqués dans des épidémies de toxi-infection alimentaires en France (PRADIER et al. 2000) mais également à l'étranger (WEGENER et al. 1996, DELPECH et al. 1998). Suite à ces épidémies certains pays européens ont décidé de mettre en place des programmes de surveillance et de contrôle des salmonelles dans leur filière de production. Si différentes techniques permettent la surveillance (bactériologie, sérologie), la description et la hiérarchisation des facteurs de risque de contamination des animaux dès l'élevage sont encore trop incomplètes pour envisager un réel contrôle.

Le travail réalisé au laboratoire de l'AFSSA de Ploufragan vise, au travers des résultats d'une enquête épidémiologique analytique, à définir et hiérarchiser les facteurs de risques associés à la contamination, l'excrétion et la séroconversion des porcs charcutiers vis à vis de *Salmonella enterica*. La validation expérimentale du rôle de certains de ces facteurs de risque peut être avantageusement envisagée en animalerie protégée. De plus la perspective de travaux sur l'évolution de l'équilibre de la flore digestive face à la contamination par ce type de pathogène n'est envisageable qu'en conditions maîtrisées. C'est pourquoi un modèle de contamination par *Salmonella Typhimurium* de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) a été constitué dans les animaleries de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) site de Ploufragan.

Cette étude permet en fonction de la dose inoculée aux animaux, de décrire l'évolution qualitative et quantitative de l'excrétion. Le statut sérologique et les signes cliniques associés aux inoculations ont été relevés. Les résultats obtenus lors des abattages permettent de montrer l'importance d'un portage asymptomatique de *Salmonella* sur la contamination des carcasses.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche bactérienne utilisée est de sérotype *Salmonella Typhimurium*. Elle a été préalablement isolée de l'environnement d'un élevage de porcs en dehors de tout contexte pathologique. La souche est conservée par surgélation en milieu Brain Heart Infusion (BHI)/Glycérol à -60°C. Avant chaque essai la souche est isolée sur TSAYE (Trypton Soja Agar Yeast Extract) préalablement à la réalisation d'un bouillon riche de moins de 24 heures à 37°C. A partir de ce bouillon une culture de 16 heures à 37°C donne une suspension de l'ordre de 10<sup>9</sup>UFC/ml (Unité Formant Colonie). Avant inoculation, deux lavages en solution de Tryptone Sel

(TS) sont réalisés, la suspension mère ainsi constituée est dénombrée sur TSAYE. L'inoculum représente la quantité de bactéries dans un volume de 9 ml de TS. Les animaux témoins et contacts sont systématiquement inoculés avec 9 ml de TS stérile.

Les animaux sont des porcs EOPS secondaires âgés de 12 semaines au début des essais. Les températures rectales (un thermomètre nettoyé et désinfecté par porc et par jour) ainsi que les prises alimentaires à l'échelle du groupe et la consistance des matières fécales sont relevées quotidiennement. Les inoculations sont réalisées *per os* et les relevés sont identifiés par un délai PI (Post-Inoculation).

Des inoculations sont réalisées à des doses variant de 10<sup>2</sup> à 10<sup>10</sup> bactéries par animal. Le nombre d'animaux relevant des différentes conditions est noté dans les tableaux de résultats. Les prélèvements fécaux et des prises de sang sont réalisés individuellement 48 heures PI puis une fois par semaine jusqu'à la fin de l'essai. A l'autopsie, les amygdales, le foie, la rate, les ganglions mésentériques, un tronçon iléal et du contenu caecal sont prélevés.

Pour les essais concernant les inoculum de 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> et 10<sup>8</sup> *Salmonella*, des animaux non inoculés dits « contacts » sont maintenus dans le parc des animaux inoculés. Ces porcs sont suivis au même titre que les animaux inoculés.

L'effet d'inoculations répétées de 10<sup>3</sup> *Salmonella* aux mêmes animaux à 48 heures d'intervalle a été comparé au statut d'un lot d'animaux ne recevant qu'une inoculation de 10<sup>4</sup> UFC. L'autopsie de ces animaux a été réalisée soit 48 heures ou après respectivement 1 et 3 semaines PI. Aux prélèvements réalisés de façon systématique lors des abattages, ont été ajoutés des prélèvements de muscle du diaphragme, de poumons et des contenus stomacaux.

Les séroconversions entraînées par les inoculations sont étudiées par le test ELISA mis au point au laboratoire de Ploufragan (PROUX et al., 2000). La différence entre les densités optiques avec antigènes positif et négatif est directement réalisée et les résultats sont calibrés par rapport aux sérums positifs et négatifs de contrôle. Le calcul suivant est donc effectué :

DOC = Densité optique calibrée  
 = (DOE-DON / DOPp-DON) x (DOPmoy / DOPp)  
 DOE = DO de l'échantillon  
 DON = DO du sérum négatif de contrôle  
 DOPp = DO du sérum positif de la plaque  
 DOPmoy = DO du sérum positif moyenne sur 50 plaques.

Le seuil de positivité de 0,400 a été calculé avec la formule suivante :

DOC moyenne de porcs conventionnels non contaminés + 1,99 écart-type (p = 0,975).

Les prélèvements à visée bactériologique correspondant à des contenus sont prélevés stérilement et sont analysés directement. Les prélèvements d'organes sont flambés en surface puis une fraction comprise entre 10 et 25 grammes est isolée et dilacérée avant analyse. La méthode bactériologique de

détection comprend, après un pré-enrichissement en eau peptonnée, deux enrichissements l'un en bouillon au Tetrathionate et l'autre sur gélose MSRV (gélose semi-solide de Rappaport Vassiliadis), avant isolement respectivement sur XLT4 et Rambach. Les colonies caractéristiques sont confirmées biochimiquement sur Kligler et par agglutination spécifique avec un antisérum O4,5.

Afin de compléter l'analyse qualitative, un protocole permettant une évaluation semi quantitative a été mis en œuvre. En isolement direct sur gélose Rambach (contenant 10 mg/ml d'ampicilline) d'une dilution au 1/10 de l'échantillon dans de l'EPT, 100 micro-litre sont déposés en spire sur chaque boîte. La limite de détection est alors de 2 log/gramme de matière fécale, si le dénombrement est obtenu, l'échantillon est noté A. Un échantillon pour lequel le dénombrement est infructueux mais qui présente une culture positive après enrichissement est noté B, si la détection nécessite la combinaison pré-enrichissement et enrichissement, l'échantillon est noté C et est noté D un échantillon ne permettant pas la détection de *Salmonella* dans 25 g.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Signes cliniques et résultats techniques

L'infection par  $10^2$  et  $10^3$  salmonelles n'entraîne pas de signes cliniques dans les six semaines PI. Pour les animaux inoculés par  $10^4$  UFC/porc, les seuls relevés cliniques sont des hyperthermies qui ne concernent pas tous les animaux et restent transitoires et faibles en intensité (ne durent pas au delà de 48 heures PI), la consistance des matières fécales reste normale.

Dans l'animalerie deux porcs inoculés par  $10^5$  UFC présentent une hyperthermie 72 heures après l'inoculation avec une diarrhée pour l'un d'eux pendant les deux jours consécutifs. Le porc contact de ces deux animaux déclenche une franche hyperthermie le lendemain de l'épisode diarrhéique. Les six semaines suivantes aucun symptôme n'est enregistré sur ces animaux. Les porcs inoculés par  $10^6$  *Salmonella* ne montrent pas de signes cliniques.

Pour les porcs inoculés à doses de  $10^8$  et  $10^{10}$  UFC/animal apparaît dans les 24 heures PI une franche hyperthermie pour tous les porcs, accompagnée, pour certains d'entre eux, de dyspnée, de coups de flanc et d'anorexie. Deux épisodes diarrhéiques sont observés dans cette animalerie concernant un porc infecté et un contact. Les deux porcs contacts ont présenté une hyperthermie franche respectivement 48 heures et 4 jours après l'inoculation de leurs congénères. Par la suite le tableau clinique disparaît et aucun signe n'est apparu sur ces animaux après les quatre jours et ce jusqu'à six semaines PI.

Les résultats techniques obtenus sur les animaux dans le cadre d'un portage asymptomatique ne permettent pas de différencier les porcs inoculés des témoins. Seuls les porcs inoculés par des doses massives montrent une diminution transitoire du GMQ.

### 2.2. Excrétion et séroconversion en fonction du temps et de la dose inoculée (tableau 1).

La proportion de matières fécales présentant des salmonelles est la plus importante pour les prélèvements réalisés deux jours après l'inoculation indépendamment de la dose inoculée. Plus

**Tableau 1** - Effet au cours du temps de l'inoculation de quantités variables de *Salmonella* Typhimurium

Log10 CFU/porc	Délai PI	Présence de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les matières fécales (25 g)							
		J+2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S10
2		1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3		2/27	1/12	1/10	0/9	0/5	0/5	0/5	ND
4		23/27	9/12	5/12	6/12	0/6	1/6	1/6	ND
5		4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4
6		5/5	5/5	5/5	5/5	4/4	4/4	4/4	ND
8		8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	5/6
10		2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

Log10 CFU/porc	Délai PI	Sérologie							
		J+2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S10
2		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4*
3		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	ND
4		0/8	0/8	4/8	6/8	8/8	8/8	8/8	ND
5		0/4	4/4**	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
6		0/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	ND
8		0/4	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
10		0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

\* la semaine précédente deux animaux ont montré une sérologie supérieure au seuil 0,4 de positivité (0,448 et 0,441)

\*\* un des quatre animaux montre une sérologie limite du seuil de positivité de 0,4 (0,433)

avant dans les essais, deux populations apparaissent concernant l'excrétion. Pour des inoculum supérieurs à  $10^4$  salmonelles par porc, tous les animaux sont excréteurs et le restent jusqu'à la sixième semaine de l'essai. Pour des doses inférieures à  $10^4$  UFC une relation dose effet entre l'inoculum et la proportion de fèces contenant des salmonelles apparaît dès les premières analyses. Pour cette population, les données des semaines successives montrent une diminution de la proportion de porc détectés excréteurs, jusqu'à la quatrième semaine à partir de laquelle on peut considérer que tous les animaux inoculés par moins de  $10^4$  salmonelles sont non excréteurs.

La diminution d'intensité d'excrétion pour le groupe est étudiée pour des populations inoculées par  $10^5$  et plus de *Salmonella* par porc. Cette donnée fait appel à la quantification des salmonelles dans les échantillons (tableau 2). Pour le groupe à  $10^8$  UFC/porc, l'inoculation entraîne dès 48 heures PI une excrétion massive et quantifiable des salmonelles. Les dénombrements permettent de mettre en évidence une stabilité de l'intensité de l'excrétion pendant les 3 premières semaines. Même si les prélèvements réalisés de la semaine 4 à la semaine 7 PI ne sont plus dénombrables, ils restent à un niveau important d'intensité d'excrétion.

Les animaux inoculés par  $10^5$  *Salmonella* sont tous excréteurs 48 heures PI et le restent jusqu'à la semaine 8 PI (sauf semaine 6 ou 3/4 sont positifs). Une hétérogénéité des niveaux de contamination apparaît à partir de la semaine 4. Deux animaux montrent un passage par un niveau faible d'excrétion encadrés par des prélèvements intensément contaminés par *Salmonella*, voire dénombrables.

La quantification permet de montrer une multiplication intestinale des salmonelles, observée pour les trois conditions

d'inoculation ( $10^8$ ,  $10^5$  et  $10^2$  UFC/porc). Les effets ne sont cependant pas équivalents à une ingestion puisque un animal excréteur 4.6 log de *Salmonella* par gramme de matière fécale 48 heures après une inoculation de  $10^2$  UFC ne montre plus d'excrétion dans les semaines suivantes.

La séroconversion des animaux a été suivie dans le temps pour des doses croissantes de salmonelles inoculées (tableau 1). Les animaux partent tous d'un statut séronégatif. Pour des inoculations par plus de  $10^5$  *Salmonella* par porc, ils séroconvertissent après une semaine PI et restent séropositifs jusqu'à la semaine 6 et même semaine 10 PI. Pour les animaux inoculés par  $10^2$  et  $10^3$  salmonelles, aucune séroconversion n'intervient dans les 6 premières semaines PI. Les animaux inoculés par  $10^2$  salmonelles restent séronégatifs à 10 semaines même si leur DO corrigée est passée très légèrement au dessus du seuil de positivité la semaine précédente. Pour les animaux inoculés par  $10^4$  *Salmonella*, la séroconversion au sein du groupe évolue avec le temps pour concerner tous les animaux uniquement après la semaine 4 PI. La sérologie permet de dissocier clairement deux populations d'animaux séropositifs ou séronégatifs selon qu'ils aient été inoculés par plus ou moins de  $10^4$  *Salmonella* par porc.

Pour la dose de  $10^4$  UFC/porc alors que l'excrétion diminue avec le temps, la séropositivité se généralise au sein du groupe.

### 2.3. Abattage en fin d'essai (tableau 3)

Au moins six semaines post inoculation, les abattages sont réalisés et permettent de relever pour les amygdales, la rate, le foie, les ganglions, l'ileum et le caecum, la fréquence de présence de *Salmonella* en fonction de l'inoculum.

**Tableau 2** - Evolution de l'intensité de l'excrétion des porcs en fonction de l'inoculum et du temps

inoculum	J+2	J+8 (S1)	J+15 (S2)	S3	S4	S5	S6	S7	S8
8,1	A (7)	A (4,9)	B	A (2,3)	B	B	B	B	C
8,1	A (6,8)	B	A (2,6)	A (2,8)	B	B	B	B	C
ctc	A (2,7)	A (3,3)	A (3,6)	A (2)	B	B	B	B	C
8,1	A (7)	A (3,3)	A (3,2)	B	B	B	B	B	B
8,1	A (2,5)	C	B	A (2,5)	B	B	B	B	C
ctc	A (2,9)	A (3,9)	A (3,0)	A (2)	B	B	B	B	C
5,1	B	A (2,3)	B	B	B	B	B	B	B
5,1	A (5,1)	A (2,7)	B	B	B	C	A (2)	B	C
ctc	D	B	B	A (3,4)	B	A (2)	B	C	B
5,1	B	A (3,5)	A (3,2)	A (3)	B	C	B	B	B
5,1	B	B	B	B	C	B	D	B	C
ctc	D	A (3,6)	B	np	D	D	D	D	D
2,1	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2,1	D	D	D	D	D	D	D	D	D
ctc	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2,1	A (4,6)	D	D	D	D	D	D	D	D
2,1	D	D	D	D	D	D	D	D	D
ctc	D	D	D	D	D	D	D	D	D

A (x) : excrétion détectée en direct (log CFU/gramme de matière fécale)

B : excrétion détectée après enrichissement

C : excrétion détectée uniquement après pré-enrichissement

D : excrétion non détectée

np : non prélevé, ctc : contact des animaux inoculés, inoculum : log CFU *Salmonella Typhimurium*/porc

**Tableau 3** - Effets de la dose sur la contamination des organes observés en fin d'essai

organe dose	durée P.I.	amygdales	rate	foie	muscle	poumon	ganglion	ileum	caecum	estomac
1,00E+02	6 semaines	0/4	0/4	0/4	np	np	0/4	0/4	0/4	np
1,00E+03	7 semaines	0/4	np	np	np	np	0/4	0/4	0/4	0/4
1,00E+04	7 semaines	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6	0/6
1,00E+05	6 semaines	3/4	0/4	0/4	np	np	0/4	2/4	3/4	np
1,00E+06	8 semaines	4/4	np	np	np	np	2/4	4/4	4/4	1/4
1,00E+08	6 semaines	4/4	0/4	0/4	np	np	1/4	4/4	4/4	np
	10 semaines	2/2	0/2	0/2	np	np	0/2	np	2/2	np
1,00E+10	10 semaines	2/2	1/2	1/2	np	np	0/2	np	2/2	np

Pour des animaux inoculés par  $10^3$  et moins de salmonelles aucun des prélèvements réalisés lors de l'autopsie ne permet la détection de la bactérie. Pour un inoculum de  $10^4$  UFC, seuls l'ileum et le contenu caecal montrent des prélèvements positifs mais dans une faible proportion. Pour  $10^5$  UFC/porc, les amygdales s'ajoutent aux prélèvements positifs, et la proportion de caecum et d'ileum présentant des salmonelles augmente. Pour des inoculum plus importants, les amygdales ont toujours été retrouvées positives, ainsi que le caecum et l'ileum. Par contre, le foie, la rate et les ganglions ne sont que plus inconstamment contaminés.

Retenant le caecum et les amygdales comme indicateurs du portage de salmonelles, le portage est retrouvé au delà de 6 semaines pour tous les animaux inoculés par  $10^6$  bactéries et plus.

#### 2.4. Doses répétées et abattage (tableau 4).

Afin de préciser la dose minimum inoculante dans les conditions expérimentales utilisées, le suivi de populations de porcs après répétition d'inoculations par  $10^3$  *Salmonella* est réalisé et comparé à la dose unique de  $10^4$  UFC/porc. Lorsque les animaux subissent deux inoculations par  $10^3$  salmonelles, il est possible de retrouver ces bactéries dans les fèces 48 heures après la seconde inoculation, mais plus après une et trois semaines PI (les effectifs sont alors faibles). Le fait de passer à trois inoculations successives de cette

dose confirme l'inoculation et surtout le maintien de son effet sur l'excrétion puisqu'elle est notée après trois semaines pour 3 animaux sur 4.

#### 2.5. Abattage précoces (tableau 4)

L'abattage a été réalisé pour une partie des animaux 48 heures PI et dans les premières semaines après inoculation. Lorsque l'inoculation est de deux fois  $10^3$  UFC/porc, une contamination des organes n'est retrouvée que 48 heures PI dans 2 ganglions sur 5 et dans 1 ileum sur 5. Les organes ne sont plus contaminés les semaines suivantes pour les 2 animaux restant dans l'essai.

Le fait de renouveler la dose montre une augmentation de la proportion d'organes positifs 48 heures PI et surtout la présence d'organes positifs 3 semaines après les inoculations. Trois inoculations successives par  $10^3$  *Salmonella* ont permis le maintien de la contamination sur la durée. La dose infectante est comprise entre  $10^3$  et  $10^4$  UFC/porc avec un effet additif des répétitions d'inoculation par  $10^3$  *Salmonella*.

Cet effet additif s'observe également la première semaine après des inoculations doubles ou triples par  $10^3$  salmonelles et uniques par  $10^4$  UFC/porc. Pour ces inoculations croissantes, la contamination concerne un nombre croissant de types d'organes contaminés et au sein d'un type, une plus grande proportion d'échantillons positifs. L'inoculation par

**Tableau 4** - Effets de la répétition de doses infra-contaminantes sur la présence de *Salmonella* dans les organes.

Inoculum (UFC/porc)	deux fois $10^3$			trois fois $10^3$		une fois $10^4$		
	J+2	S1	S3	J+2	S3	J+5	S1	S3
date abattage après la dernière inoculation								
<b>Organes</b>								
amygdales	0/5	0/2	0/2	1/4	1/4	7/8	4/7	3/6
rate	0/5	0/2	0/2	0/4	0/4	2/8	1/7	0/6
foie	0/5	0/2	0/2	0/4	0/4	4/8	0/7	1/6
muscle	0/5	0/2	0/2	0/4	1/4	2/8	0/7	2/6
poumon	0/5	0/2	0/2	0/4	0/4	8/8	6/7	4/6
ganglions	2/5	0/2	0/2	4/4	2/4	8/8	6/7	3/6
ileum	1/5	0/2	0/2	3/4	2/4	8/8	6/7	4/6
caecum	0/5	0/2	0/2	3/4	2/4	8/8	6/7	4/6
estomac	0/5	0/2	0/2	1/4	0/4	3/8	1/7	2/6
<b>Sérologie</b>	0/5	0/2	1/2	0/4	1/4	0/8	0/8	6/8
<b>Fèces</b>	2/14	0/2	0/2	2/4	3/4	23/27	9/12	6/12

10<sup>4</sup> *Salmonella* entraîne rapidement une contamination de tous les organes étudiés. Dans les semaines qui suivent, la tendance est à la diminution de la proportion d'organes positifs. Cependant, trois semaines après l'inoculation, les amygdales, le caecum et l'ileum restent fréquemment positifs et il est toujours possible de retrouver des salmonelles dans le foie et les muscles d'animaux.

## 2.6. Les porcs contacts (tableau 5)

La présence d'animaux non inoculés dans le parc d'animaux inoculés entraîne très rapidement ces animaux vers le statut de leurs congénères. Dès la dose 10<sup>5</sup> salmonelles, les contacts donnent les résultats d'animaux inoculés tant en sérologie qu'en bactériologie, deux semaines après les inoculations. D'un point de vue quantitatif, l'inoculation naturelle obtenue après une semaine de contact de ces deux animaux avec des porcs inoculés par 10<sup>5</sup> salmonelles, se traduit par une excrétion importante dès la 2<sup>ème</sup> semaine et se maintient jusqu'à la semaine 6 pour l'un d'entre eux (tableau 2). Pour le second animal contact, dès la semaine 4, l'excrétion n'est plus retrouvée dans les échantillons de 25 g de fèces malgré une positivité du caecum confirmée à l'abattage semaine 7.

## 3. DISCUSSION-CONCLUSION

La transmission de salmonelles d'un animal à l'autre suit un trajet fécal-oral. Même si d'autres voies de contamination sont démontrées : intranasales (GRAY et al., 1995) et pulmonaires (FEDORKA-CRAY et al., 1995), elles restent obtenues dans un contexte chirurgical et avec des doses très importantes (5.10<sup>9</sup> UFC/porc) au regard de celles utilisées dans cette étude. Une contamination du caecum et des ganglions iléo-caecaux est observée 3 heures post-inoculation intra pulmonaire. Mais si ce type d'étude permet de mettre en évidence des voies alternatives à la contamination fécale-orale et de ne négliger ni les amygdales ni les poumons comme éventuels vecteurs de salmonelle, elles ont surtout le mérite de poser la problématique de la relation entre la dose et l'effet.

GRAY en 1996 recherche une relation dose-effet par inoculation par voie intra-nasale, il n'observe pas de contamination pour un inoculum de 10<sup>6</sup> salmonelles par animal. Ce sont donc des doses supérieures ou égales à 10<sup>7</sup> UFC qui ont été inoculées pour suivre la séroconversion des animaux et la contamination des organes suite à une infection par *Salmonella* (NIELSEN et al., 1995). Dans ce cas, les essais en animaleries sont proches d'une reproduction des effets de salmonelloses et sont conformes aux résultats que nous obtenons

pour des inoculations massives. L'objectif de notre étude est d'étudier l'effet de doses moindres et de reproduire en animalerie les conditions d'un portage asymptomatique.

Pour des doses moins importantes, deux aspects sont à relever après inoculation.

Le premier relève des effets à moyen terme. Les animaux restent excréteurs jusqu'à 10 semaines pour une dose supérieure à 10<sup>4</sup> UFC/porc. La séroconversion est intervenue pour le groupe et se maintient également. Ces deux outils, bactériologie et sérologie, montrent des résultats différents lorsque l'inoculation atteint la dose seuil de 10<sup>4</sup> *Salmonella*. Dès la quatrième semaine, le groupe est détecté positif par sérologie alors que l'excrétion devient franchement intermittente à partir de cette même quatrième semaine. Pour ce qui concerne une relation dose effet, à moyen terme, l'inoculation par salmonelle peut se révéler comme une réaction en tout ou rien par la sérologie alors que la dose 10<sup>4</sup> UFC donne des résultats moins tranchés quant à la positivité des animaux par l'excrétion. Les résultats issus de la bactériologie à l'abattage en fin d'essai (7 semaines PI) sont à rapprocher de ceux obtenus au niveau de l'excrétion. La contamination caecale qui apparaît bien comme le meilleur marqueur de positivité pour un animal en bactériologie n'est pas constamment positive 7 semaines après inoculation. En bactériologie une loi dose effet apparaît sur les effets à moyen terme de l'inoculation, ceci par le biais de l'excrétion intermittente et de l'épuration des salmonelles de l'organisme (GRAY et al., 1996). La trace sérologique se maintient ce qui confirme les résultats obtenus avec des inoculations importantes (NIELSEN et al., 1995, SRINAND et al., 95). Il semble qu'une inoculation par au moins 10<sup>4</sup> salmonelles soit nécessaire en animalerie pour une implantation à long terme. Alors, à l'abattage, les organes les plus fréquemment contaminés sont les amygdales et les contenus iléaux et caecaux. Les organes comme le foie et la rate n'ont été retrouvés positifs que pour des inoculations massives, ce qui rejoint les données de WOOD (1991). Les muscles et les poumons n'ayant pas été largement échantillonnés pour ces analyses, il apparaît difficile de faire un parallèle avec une prévision de contamination des organes par des porcs conventionnels porteurs asymptomatiques dans la mesure où les dernières étapes avant l'abattage sont considérées comme facteur aggravant du niveau de contamination (HURD et al., 2002).

Le deuxième point concerne les effets à court terme. Une relation dose effet apparaît jusqu'à 2 semaines après une inoculation par des doses comprises entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>5</sup> *Salmonella*/porc. Un des animaux inoculés par 10<sup>2</sup> sal-

**Tableau 5** - Animaux au contact d'animaux inoculés (statut du groupe inoculé)

Dose	J+2		S1		S2		S5	
	Bactériologie	Sérologie	Bactériologie	Sérologie	Bactériologie	Sérologie	Bactériologie	Sérologie
10 <sup>8</sup>	np	np	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1 (2/2)	0/1 (2/2)
10 <sup>8</sup>	2/2 (4/4)	0/2	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)
10 <sup>5</sup>	0/2 (4/4)	0/2	2/2 (4/4)	1/2 (4/4)	2/2 (4/4)	2/2 (4/4)	1/2 (4/4)	2/2 (4/4)
10 <sup>2</sup>	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)	0/2 (0/4)

Dose : Inoculum exprimé en UFC *Salmonella* /porc

monelles excrète après 48 heures. Par contre l'intensité de l'excrétion n'est pas liée à la dose ingérée pour ces inoculations faibles. L'inoculation par de faibles doses peut entraîner une multiplication des salmonelles, par gramme de matière fécale, on peut trouver jusqu'à 100 fois la dose inoculée. Dans l'exemple cité cependant, la multiplication ne s'accompagne ni de séroconversion, ni de colonisation du tractus intestinal. A notre connaissance aucune étude ne s'est focalisée sur la définition expérimentale de la dose infectante ni de l'effet de répétition de doses infra-contaminantes. Un effet additif s'observe sur l'excrétion, la contamination des organes (ganglions ileum-caecaux notamment).

En extrapolant, une contamination à long terme nécessite dans le cadre d'un contact unique avec salmonelle, une dose importante, alors que la répétition de contacts avec des doses faibles peut entraîner une contamination effective, au moins sur le court terme.

Dans nos conditions d'abattage, les stress liés au mélange, au transport et à l'attente n'interviennent pas. Le tableau relevant la contamination des organes suivant une contamination par  $10^4$  *Salmonella* est alors une estimation à minima de ce qui peut être observé en conditions conventionnelles. Cette dose de  $10^4$  UFC correspond à la quantité de *Salmonella* Typhimurium excrétée par gramme de matière fécale par un animal ayant ingéré  $10^2$  bactéries. Moins d'une semaine après l'inoculation, ces animaux sont potentiellement contaminants pour l'atelier d'abattage : les caecum, ileum et estomacs sont fréquemment positifs, or ce sont ces organes qui sont le plus souvent perforés à l'éviscération. Une inoculation récente par une dose de  $10^4$  UFC/porc entraîne la présence de muscles et de foies contaminés. L'absence de données quantitatives et d'obser-

vations de l'effet de la maturation sur le devenir de cette contamination ne permettent cependant pas de se positionner en terme de risque pour la consommation d'une telle carcasse. En transposant ces résultats en élevage, cette étude participe à la démonstration de la nécessité d'une pression de contamination basse tout au long de la production sans pour autant avoir un objectif d'éradication qui paraît impossible à atteindre en conditions conventionnelles.

Le modèle dont nous disposons permet de nous positionner dans une problématique de portage asymptomatique telle que celle rencontrée en élevage de porc. Ce modèle fonctionne à court et moyen terme pour une évaluation quantitative et qualitative de la contamination. Le protocole de qualification des échantillons utilisé jusqu'à présent pour des raisons de contraintes techniques liées au nombre d'analyses à traiter simultanément pourra avantageusement être remplacé par la technique de mini-MSRV (Nombre le Plus Probable) (FRAVALO et al., 2002). A ce titre nous disposons des moyens permettant d'étudier en conditions privilégiées l'influence de facteurs de risques identifiés dans le cadre de l'enquête française et également suite à des études à l'étranger. Dans un cadre plus prospectif, cet outil permettra de montrer si les phénomènes de multiplication intestinale et de colonisation par les salmonelles peuvent être associés à des équilibres de flore digestives particuliers et quels sont les moyens d'intervenir sur ces équilibres par le biais d'éléments pro ou de pré-biotiques.

## REMERCIEMENTS

Ce modèle n'aurait pu être établi sans le concours technique des personnels du SPPAE de la VIPAC et de l'HQPAP.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DELPECH V., MC ANULTY J., MORGAN K., 1998. Aust. N. Z. J. Public Health, 22(2), 243-246.
- FEDORKA-CRAY P.J., KELLEY L.C., STABEL T.J., GRAY J.T., LAUFER J.A., 1995. Infect. Immun., 63(7), 2658-2664.
- FRAVALO P., HASCOËT Y., LE FELLIC M., QUEGUINER S., SALVAT G., 2002. Proceedings du 2<sup>ème</sup> Colloque International de Bactériologie Vétérinaire, 5-6 septembre 2002 Ploufragan, France, p 5-6.
- GRAY J.T., FEDORKA-CRAY P.J., STABEL T.J., ACKERMANN M.R., 1995. Vet. Microbiol., 47(1-2), 43-59.
- HAEGHBAERT S., LE QUERREC F., GALLAY A., BOUVET P., GOMEZ M., VAILLANT V., 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000 BEH 23/2002.
- HURD H.S., MCKEAN J.D., GRIFFITH R.W., WESLEY I.V., ROSTAGNO M.H., 2002. Appl. Environ. Microbiol., 68(5), 2376-238.
- NIELSEN B., BAGGESEN D., BAGER F., HAUGEGAARD J., LIND P., 1995. Vet. Microbiol., 47(3-4), 205-218.
- PRADIER C., KEITA-PERSE O., BERNARD E., GISBERT C., VEZOLLES M.J., ARMENGAUD A., CARLES D., GRIMONT F., DESENCLOS J.C., DELLAMONICA P., 2000. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 19(6), 464-467.
- PROUX K., 2000. Journées Rech. Porcine en France, 32, 45-50.
- SRINAND S., ROBINSON R.A., COLLINS J.E., NAGARAJA K.V., 1995. Am. J. Vet. Res., 56(9), 1163-1168.
- WEGENER H.C., BAGGESEN D.L., 1996. Int. J. Food Microbiol., 32(1-2), 125-131.
- WOOD R.L., ROSE R., COE N.E., FERRIS K.E., 1991. Am. J. Vet. Res., 52(6), 813-819.

