

Diversité génétique de *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Derby chez le porc en France

Martine DENIS, Aurore FABLET, Sandra ROUXEL, Catherine HOUDAYER, Corinne ROBINAULT, Philippe FRAVALO

AFSSA, Unité HQPAP, F-22440 Ploufragan

m.denis@ploufragan.afssa.fr

Diversité génétique de *Salmonella* Typhimurium et *S. Derby* chez le porc en France

Dans le cadre de l'enquête communautaire « estimation de la prévalence de *Salmonella* spp. en production primaire porcine », 86 isolats de ST et 75 de SD ont été isolés à partir de ganglions lymphatiques iléo-caecaux de porcs et des résultats sérologiques pour ces mêmes porcs ont été obtenus à partir de jus de viande. Les objectifs de cette étude étaient 1) d'analyser la diversité génétique de ces deux sérotypes, 2) d'analyser la répartition géographique et saisonnière des génotypes, et 3) de voir s'il y a un lien entre la séroconversion du porc vis à vis des salmonelles et le génotype de la souche isolée chez ce même porc. Les isolats ont été typés par PFGE en utilisant l'enzyme *Xba1*.

31 et 17 profils *Xba1* ont été obtenus pour ST et SD. La diversité génétique est plus importante au sein de la population de ST ($D=0,886$) que pour celle de SD ($D = 0,646$). Un profil dominant B16 a été trouvé pour ST (30 % des isolats ST) et un profil dominant B5 a été retrouvé pour SD (58,5 % des isolats). 11 clusters ont été obtenus pour ST avec un cluster dominant T1 et 4 pour SD avec un cluster dominant D1. Les isolats de T1 et de D1 sont répartis sur 11 départements français, dont certains fortement éloignés géographiquement et ces isolats se retrouvent sur les 4 saisons. Le cluster T8 est retrouvé principalement en hiver. Dans les deux cas, faible et forte séroconversion, les isolats retrouvés chez ces porcs sont répartis dans l'ensemble des groupes génétiques.

En filière porc, à l'abattoir, la diversité génétique est plus importante chez ST que chez SD. La répartition géographique des génotypes et clusters pourrait indiquer que la filière porcine aurait des salmonelles qui lui sont adaptées. Des génotypes hivernaux ont été identifiés, un effet saison sur l'apparition des génotypes dans l'année peut donc être observé. Différents génotypes sont retrouvés chez les porcs ayant soit une faible séroconversion, soit une forte séroconversion. Ceci indiquerait que l'intensité de la réponse sérologique des porcs vis à vis de *Salmonella* n'est pas liée au génotype de la salmonelle retrouvée chez ce même porc.

Genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium et *S. Derby* in the pig in France

Within the framework of the European baseline study "estimate of the prevalence of *Salmonella* spp. in porcine primary production", 86 isolates of ST and 75 of SD were isolated from lymphatic ganglia of pigs, and serological results for these same pigs were obtained from meat juice. The aims of this study were 1) to analyse the genetic diversity from these two serotypes, 2) to analyse the geographical and annual distribution of the genotypes, and 3) to see whether there is a link between the seroconversion of the pig with respect to *Salmonella* and the genotype of the strain isolated from the same pig. The isolates were typed by PFGE using *Xba1* enzyme.

31 and 17 *Xba1* profiles were obtained for ST and SD. Genetic diversity is more important within the ST ($D=0.886$) than within the SD ($D=0.646$) population. A dominating profile B16 was found for ST (30% of the ST isolates) and a dominating profile B5 was found for SD (58.5% of the SD isolates). 11 clusters were obtained for ST with a dominating cluster T1, and 4 for SD with a dominating cluster D1. The isolates of T1 and D1 are distributed on 11 French departments, from which some are strongly distant geographically, and these isolates are found over the four seasons. The cluster T8 is found mainly in winter. In two cases, weak and strong seroconversion, the isolates found in these pigs are distributed in the whole genetic groups.

In pig production at slaughter-house, genetic diversity is more important for ST than SD. The geographical distribution of the genotypes and clusters could indicate that some salmonellas are adapted to pig. Winter genotypes were identified, a season effect on the genotypes in the year can thus be observed. Various genotypes are found in the pigs having either a weak or a strong seroconversion. This would indicate that the intensity of the serological response of the pig with respect to *Salmonella* is not related to the genotype of the *Salmonella* carried by this pig.

Tableau 2 - Nombre d'isolats de *Salmonella* Derby dans les clusters ou selon le profil génétique *Xba*1, en fonction des départements français considérés

Département	nombre d'isolats de <i>Salmonella</i> Derby													Total
	cluster				profil <i>Xba</i> 1									
	D1	D2	D3	D4	B34	B36	B38	B40	B41	B42	B61	B66	B85	
29	5		1	1			1				1		1	10
22	12	1		2										15
56	8	3	1			1								13
35	6			1			1	1	1					10
53	6			1										7
79	4			2	1									7
50	2			1								1		4
72	1	1	1											3
3	1		1											2
49	1			1										2
64			1											1
25	1													1
43														0
44														0
53														0
62														0
63														0
76														0
Total	44	5	3	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75

que pour celle de *S. Derby* ($D = 0,646$; IC95 % [0,602-0,693]). Un profil dominant B16 a été trouvé pour *S. Typhimurium*, il concerne 30 % des isolats (26/86) et un profil dominant B5 a été retrouvé pour *S. Derby*, il concerne 58,5 % des isolats (44/75).

L'analyse de la similarité génétique à 90 % a permis de construire pour *S. Typhimurium* 11 clusters (T1 à T11) qui regroupent 91,8 % des isolats (79/86) ; le cluster T1 est le plus important (24 % des isolats) et contient le profil dominant B16. Le cluster suivant est le T8 avec 10 isolats.

L'analyse de la similarité à 90 % a permis de construire pour *S. Derby* 4 clusters (D1 à D4) qui regroupent 88,0 % des isolats (66/75) ; le cluster D1 est le plus important (63 % des isolats) et contient le profil dominant B5. Le cluster suivant est le D4 avec 8 isolats. Les profils uniques dans les deux populations sont au nombre de 7 pour *S. Typhimurium* (8,2 % des isolats) et de 9 pour *S. Derby* (12,0 % des isolats).

2.2. Distribution géographique des profils génétiques

71 % des *S. Typhimurium* et 64 % des *S. Derby* se trouvent en Bretagne (Tableaux 1 et 2) ; région représentant 58 % de la production porcine française.

Les 34 isolats de T1 sont répartis sur 11 départements français (Tableau 1). Ces isolats T1 sont localisés principalement dans le Grand Ouest mais sont également retrouvés dans le Nord (département 62), le Centre (département 63) et le Sud-Ouest (département 64).

Les 44 isolats de D1 sont répartis également sur 11 départements français (Tableau 2). Ces isolats D1 sont localisés principalement dans le Grand Ouest, mais sont également retrouvés dans l'Est (département 25) et le Centre (département 03).

Tous les clusters T1 à T11 et D1 à D4 sont retrouvés en Bretagne, sauf T10. C'est également cette région qui a le plus d'isolats à profil unique, 6 isolats sur 7 pour *S. Typhimurium* et 7 isolats sur 9 pour *S. Derby*.

2.3. Distribution saisonnière des profils génétiques

Les isolats des clusters majoritaires T1 et D1 se retrouvent sur les 4 saisons. Le cluster T8 quant à lui se distingue car il est retrouvé principalement en hiver ; 9 isolats sur les 10 de ce cluster sont retrouvés en janvier, février et mars et l'autre en septembre. Pour les autres clusters, le faible nombre d'isolats qu'ils contiennent ne permet pas de juger d'une saisonnalité éventuelle dans leur apparition.

2.4. Lien entre profils génétiques et séroconversion

31,8 % des *S. Typhimurium* et 26,2 % *S. Derby* sont retrouvés chez des porcs dont la séroconversion est négative ou inférieure à 10 % DO. Par ailleurs, 23,2 % des *S. Typhimurium* et 15,0 % *S. Derby* sont retrouvés chez des porcs présentant une séroconversion élevée supérieure à 40 % DO. Dans les deux cas, faible et forte séroconversion, les isolats sont retrouvés dans l'ensemble des groupes génétiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour les deux sérotypes de salmonelles les plus représentées en filière porcine, il apparaît que la population de *S. Typhimurium* a une plus grande diversité génétique que celle de *S. Derby*. Cette situation a été déjà observée pour ces deux sérotypes (Kérouanton et al., 2007) à partir de salmonelles issues de différentes sources en France. Dans les études de Kérouanton et al. (2007) et de Martinez-Urtaza et al. (2004) l'indice de Simpson pour *S. Typhimurium* était de 0,85 et de 0,82 respectivement, soit du même ordre que celui obtenu ici (0,886).

Dans notre étude, le sérotype Derby est plus fortement clonal que le sérotype Typhimurium. En effet, 63 % des isolats *S. Derby* se retrouvent dans le même groupe génétique, groupe contenant le profil majoritaire B5 qui correspond à 58,5 % des isolats *S. Derby*.

Tableau 3 - Nombre d'isolats de *Salmonella* Typhimurium dans les clusters ou selon le profil génétique *Xba1* en fonction du %DO obtenu en séroconversion

% DO	nombre d'isolats de <i>Salmonella</i> Typhimurium																		
	Cluster											Profil <i>Xba1</i>							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	B50	B51	B52	B53	B54	B55	B64	Total
0 à 10 % DO	15	1	6	3	1		1	4	2	1	3								37
10 à 40 % DO	6	1	1		2	1	1	5	2			1	1			1			22
> à 40 % DO	13	1	1	2	1	1	1	1	1	1				1	1		1	1	27
Total	34	3	8	5	4	2	3	10	5	2	3	1	1	1	1	1	1	1	86

Tableau 4 - Nombre d'isolats de *Salmonella* Derby dans les clusters ou selon le profil génétique *Xba1* en fonction du %DO obtenu en séroconversion

% DO	nombre d'isolats <i>Salmonella</i> Derby													
	cluster				profil <i>Xba1</i>									
	D1	D2	D3	D4	B34	B36	B38	B40	B41	B42	B61	B66	B85	Total
0 à 10 % DO	22	2	2	5	1			1		1		1		35
10 à 40 % DO	14	2				1	1		1					19
> à 40 % DO	10	1	3	4							1		1	20
pas de séro	1													1
Total	47	5	5	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75

La répartition géographique des groupes génétiques montre que des régions fortement éloignées peuvent avoir des isolats génétiquement identiques ou très proches. Ce résultat pourrait indiquer qu'il y a soit diffusion de ces génotypes par les mouvements de porcs sur la France, soit que la filière porcine aurait des salmonelles qui lui sont adaptées.

Sur les 161 isolats considérés, un seul groupe génétique (T8) avec 10 isolats contiendrait des génotypes hivernaux. Ce résultat montrerait qu'il est possible d'observer un effet saison pour certains génotypes de salmonelle, mais qu'en général il n'y a pas vraiment d'effet saison marqué sur l'apparition des génotypes dans l'année. Le lien entre les saisons et les génotypes de salmonelle n'est pas décrit dans d'autres études, à notre connaissance.

Différents génotypes sont retrouvés chez les porcs ayant soit une faible séroconversion, soit une forte séroconversion. Ceci indiquerait que l'intensité de la réponse sérologique des porcs vis à vis de *Salmonella* n'est pas liée au génotype de la salmonelle retrouvée chez ce même porc. Cette approche n'a pas été abordée par d'autres études.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été menée sur les données obtenues grâce au financement du Ministère de l'agriculture et de la pêche (DGAL) et de la Communauté européenne lors de l'enquête de prévalence de *Salmonella* spp. en production primaire porcine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beloeil P-A, Fravallo P, Fablet C, Jolly J.P., Eveno E., Hascouet Y., Chauvin C., Salvat G., Madec F., 2004. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. Preventive Veterinary Medicine, 63, 103-120.
- EFSA, 2008. Report of the Task Force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. The EFSA journal, 135, 1-109.
- Fablet C., Fravallo P., Jolly J.P., Eveno E., Madec F., Beloeil P.A., 2003. Recherche des facteurs de risques de l'excrétion de *Salmonella enterica* par les porcs en croissance. Enquête épidémiologique analytique en élevage naisseur-engraisseur. Epidémiologie et santé animale, 43, 61-73.
- Grundmann H.S., Hori S., Tanner G., 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. Journal of Clinical Microbiology, 39, 4190-4192.
- Hunter P., 1990. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. Journal of Clinical Microbiology, 28, 1903-1905.
- Hunter S.B., Vauterin P., Lambert-Fair M.A., Van Duynne M.S., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E., 2005. Establishment of an universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols. Converting the national databases to the new size standard. Journal of Clinical Microbiology, 43, 1045-1050.
- Kerouanton A., Marault M., Lailler R., Weill F.X., Feuer C., Espie E., Brisabois A., 2007. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. Foodborne Pathogens and Disease, 4, 293-303.
- Martinez-Urtaza J.E., Lieban E., Garcia-Migura L., Perez-Piñero P., Saco M., 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). Applied Environmental Microbiology, 70, 4030-4034.
- Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogene Disease, 3, 59-67.
- Robinault C., Houdayer C., Rouxel S., Labbé A., Tircot A., Denis M., Fravallo P., 2008. Estimation de la prévalence de l'infection par *Salmonella* spp des porcs charcutiers français à l'abattoir. Journées de Recherche Porcine, 40, 49-50.
- Struelens M.J., Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clinical Microbiology and Infection, 2, 2-11.
- Weill F.X., 2008. *Salmonella*, épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. Revue Française des Laboratoires, 400, 37-47.
- Wonderling L., Pearce R., Morgan Wallace F., Call J.E., Feder I., Tamplin M., Luchansky J.B., 2003 Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* isolates obtained from the carcasses and feces of swine at slaughter. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4177-4182.