

Résumé

Recherches comparatives concernant la surveillance et le contrôle de certains types de *Salmonella* dans les fermes de poulets de chair et de poules pondeuses en Roumanie

Doctorant: NEGHIRLĂ Ioana Alexandra

Coordinateur scientifique: Professeur dr. PREDOI Gabriel

Mots-clés: *Salmonella*, sérovariantes, poules pondeuses, poulets de chair

La thèse de doctorat, comportant un nombre total de 224 pages, partagées en 12 chapitres, est structurée, conformément aux exigences en vigueur, en deux parties : « Étude bibliographique », comportant un nombre total de 54 pages et « Recherches personnelles », qui comporte un nombre de 170 pages. La thèse présente un total de 37 tableaux et 156 images, la plupart étant insérés dans la partie personnelle (28 tableaux et 138 photographies).

La 1ère Partie « Étude Bibliographique » inclut 6 chapitres, dans lesquels sont présentés les principaux aspects bibliographiques sur les salmonelloses, concernant l'étiologie, les sources et les voies d'infection, la pathogenèse des salmonelloses animales, la symptomatologie et le tableau lésionnel. Des données sur les techniques de diagnostic, en mettant l'accent sur les méthodes classiques et modernes de laboratoire, utilisées dans le cadre du contrôle officiel, sont fournies. Le dernier chapitre de la première partie présente brièvement des renseignements sur la dynamique épidémiologique chez l'homme et les animaux, en contexte international, de même que l'évolution au niveau national. Tous ces renseignements comportent à la base la consultation de 150 titres bibliographiques, desquels 2 articles de l'étudiante au doctorat, avec des données préliminaires obtenues dans le cadre des recherches effectuées.

Le 1er Chapitre, intitulé « **Données concernant les bactéries de la famille *enterobacteriaceae*** » présente des données à caractère historique, des aspects sur la morphologie des bactéries encadrées dans la famille enterobacteriaceae, et des données sur la morphologie, la culture et les propriétés biochimiques des bactéries encadrées dans le genre *Salmonella*.

Le 2ème Chapitre « Étiologie et taxonomie des salmonelles » présente une série de références concernant la taxonomie des bactéries du genre *Salmonella*. Pratiquement, l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO) en collaboration avec le Centre de Référence et Recherche concernant *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris) propose pour que le genre *Salmonella* soit divisé en deux espèces *S. enterica* et *S. bongori* (anciennes sous-espèces V). Les Salmonelloses sont produites par les membres genre *Salmonella* qui en conformité avec la dernière nomenclature inclut deux espèces, voire *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*. Après les années 2000, une 3ème présomptive espèce a été proposée, à savoir *Salmonella*

subterranea, sur la base d'isolation de l'environnement d'une seule et inhabituelle souche. *Salmonella enterica* est divisée en 6 sous-espèces qui se différencient par certaines caractéristiques biochimiques : la Sous-espèce I = Subspecies *enterica*: 1.531 sérovariantes ; la Sous-espèce II = Subspecies *salamae* 505 sérovariantes; la Sous-espèce IIIa = Subspecies *arizonae* 99 sérovariantes; la Sous-espèce IIIb = Subspecies *diarizonae* 336 sérovariantes; la Sous-espèce IV = Subspecies *houtenae* 73 sérovariantes; la Sous-espèce V = Subspecies *indica* 13 sérovariantes. *Salmonella bongori* inclut moins de 22 sérovariantes, avec la mention que celles-ci sont extrêmement rares. Les souches de *Salmonella* sont classifiées en sérovariantes sur la base de la grande diversité des antigènes (LPS) "O" et des antigènes protéiques flagellaires "H" en accord avec le croquis Kauffmann-White qui est constamment mis à jour.

De même, les aspects concernant la structure antigénique, le sérotypage, le phagotypage ou le biotypage sont mentionnés, de même que la pathogénicité des salmonelles.

Le 3ème Chapitre « Sources, voies d'infection et pathogénèse des salmonelloses animales » traite les principaux réservoirs, le circuit des salmonelles en nature et la pathogénèse. Toutes les sérovariantes de *Salmonella* peuvent être pathogènes, mais la principale condition est que la dose infectante de salmonelles viables soit significativement grande (10⁷-10⁹ germes), le pouvoir invasif (la virulence) de la souche salmonellique ingérée étant une autre condition pour le déclenchement de l'infection.

Le 4ème Chapitre « Aspects cliniques et morpho-pathologiques des salmonelloses » présente, brièvement, les aspects concernant la symptomatologie et le tableau anatomo-pathologique des salmonelloses chez les volailles, les mammifères et l'homme.

Le 5ème Chapitre « Investigations de laboratoire » traite les principales investigations spécifiques de laboratoire utilisées dans le diagnostic des salmonelloses, en faisant référence en spécial aux méthodes utilisées dans le cadre du contrôle officiel de la maladie : les investigations sérologiques, l'isolation et l'identification des salmonelles, le sérotypage, l'identification du génome par des techniques de biologie moléculaire. Le diagnostic de laboratoire reste la démarche majeure pour identifier la présence de l'agent zoonotique *Salmonella*.

Le 6ème Chapitre « Dynamique épidémiologique » mentionne l'évolution des infections salmonelliques (salmonelloses) chez l'homme et les animaux, au niveau international et national.

L'incidence réelle des salmonelloses chez l'homme est difficilement à évaluer, parce que de nombreux pays ne détiennent pas un système de surveillance épidémiologique, et même si le dernier existe, les cas sporadiques ne sont pas d'habitude signalés. Dans les pays où la déclaration est obligatoire, on a observé que le nombre des cas a augmenté considérablement au cours des dernières années, mais cette observation est aussi partiellement réelle, à cause d'une amélioration dans la déclaration des cas. En 2016, les 28 États membres UE ont rapporté 96.039 cas de salmonellose chez l'homme par 28 de SM, desquels 94.530 cas ont été confirmés, en résultant un taux de notification de l'UE de 20,4 cas à 100.000. Pendant la période 2014 – 2016, les sérotypes impliqués dans les cas détectés chez l'homme et qui comportent l'origine alimentaire (oeufs et produits à base d'oeufs, viande de poulet et produits de viande de poulet), ont été rapportés dans la

base de données EFSA. Au niveau de l'UE, les États membres sont obligés à implémenter de programmes de surveillance pour *Salmonella*, en conformité avec la législation communautaire (le Règlement (CE) no. 2160/2003) les sérotypes cible pour la surveillance étant Enteritidis și S. Typhimurium, y compris la variante monophasique.

La prévalence *Salmonella* varie d'un pays à l'autre, selon le type de production de l'effectif de volailles, mais aussi des méthodes de détection utilisées en laboratoire. Ainsi, on a observé que les oeufs et la viande de poulet représente la source la plus importante pour l'infection humaine, S. Enteritidis et S. Typhimurium étant les sérotypes les plus fréquemment rencontrés.

La 2nde Partie “Recherches personnelles”, inclut 6 grands chapitres, chacun avec plusieurs sous-chapitres, respectivement le but de la thèse, un chapitre dédié au matériel et aux méthodes utilisées pendant les recherches, puis sont présentés les aspects généraux et spécifiques concernant les programmes nationaux de contrôle des salmonelloses zoonotiques, les résultats interprétés des investigations, les mesures sanitaires – vétérinaires appliquées dans le cas de l'identification d'un résultat positif pour *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis, chez les effectifs de poulets de chair et de poules pondeuses, la prévalence des sérovariantes de *Salmonella* En Roumanie, pendant la période 2013 – 2016, et aussi la partie finale des conclusions et quelques recommandations.

Le but de la thèse est celui de réaliser l'investigation de la prévalence des sérotypes de *Salmonella* circulants aux différentes espèces d'animaux de Roumanie afin de déterminer la prévalence des sérovariants de *Salmonella* qui circulent aux différentes espèces d'animaux de Roumanie et de réaliser une distribution spatiale d'isolation de *Salmonella* au niveau de département, entre les années 2013 et 2016.

Les lésions morfo-pathologiques ont été évaluées, en réalisant de corrélations avec celles histopathologiques et en suivant le mode dans lequel le tropisme cellulaire de présence de l'injure bactérienne influence le tableau morphologique global. Un diagramme flux a été réalisé concernant le diagnostic de la maladie, avec des méthodes bactériologiques classiques, et aussi avec les instruments modernes de la détection de génome bactérien, dans les conditions quand les exigences actuelles du contrôle officiel imposent l'accréditation en conformité avec les standards internationaux en vigueur. Les aspects ultra-structuraux de la structure du fléau de S. Enteritidis ont été étudiés comparativement aux proto-structures flagellaires à aspect hélicoïdal de S. Typhimurium, aspect important à mettre en évidence, spécialement dans le cas des études effectuées pour obtenir les vaccins des souches mobiles.

Le 7ème Chapitre « Matériel et méthodes » présente les types de preuves / matrices d'essai prises en travail, et aussi les méthodes d'investigation anatomo-clinique et de laboratoire pour ces preuves prélevées. Les investigations ont été réalisées dans le cadre du Laboratoire National de Référence pour Salmonelloses Animales coordonné par le Service de Bactériologie, le Service de Morfo-pathologie, le Service de Biologie Moléculaire de l'Institut de Diagnostic et Santé Animale de Bucarest, en conformité avec le caractère capable pour les méthodes de diagnostic dans le cadre du contrôle officiel.

Des investigations bactériologiques ont été effectuées pour un nombre total de 1229 preuves, desquelles 967 des poules pondeuses et 262 poulets de chair, ainsi : 409 cadavres issus des poules pondeuses (339) et poulet de chair (70 cas), 756 échantillons de fécales issus des deux catégories (564 des poules pondeuses et 192 des poulets de chair) et 64 échantillons composés (caecums + oviductes) des poules pondeuses.

Les examens nécropsiques qui ont permis la mise en évidence des lésions morphopathologiques ont été effectués sur un nombre de 824 cadavres (627 des poules pondeuses et 197 poulets de chair). Une série de méthodes de coloration spécifiques à l'histopathologie (HE, HEA, Martius Scarlet Blue, Brown et Brenn) a été effectuée sur les sections de tissus / organes, soumises à la technique de microtomie et d'inclusion en paraffine issus des 409 échantillons (339 cadavres de poules pondeuses et 70 poulets de chair). De même, ont été utilisés des tests de biologie moléculaire sur un nombre de 44 cas isolés de poules pondeuses diagnostiquées avec *Salmonella*, mais aussi des investigations électronmicroscopiques sur un nombre de 13 cas isolés de poules pondeuses avec *Salmonella*.

Le 8ème Chapitre « Aspects généraux et spécifiques concernant les programmes nationaux de contrôle des salmonelloses zoonotiques » met en page des renseignements concernant la législation européenne et nationale applicable dans ce domaine, les Programmes Nationaux de Contrôle des Salmonelloses zoonotiques pour des différentes catégories de volailles approuvées par UE pour Roumanie par les Décisions Grant, et aussi la modalité pour leur financement, les aspects concernant le mode de prélèvement, emballage, étiquetage et transport des échantillons au laboratoire, de même que les objectifs principaux des programmes nationaux de contrôle des salmonelloses zoonotiques aux effectifs de poulets de chair et de poules pondeuses.

Le 9ème Chapitre « Résultats et discussions obtenus suite à l'application des méthodes de laboratoire pour mettre en évidence les agents zoonotiques du genre *Salmonella* » présente d'une manière détaillée les résultats des investigations effectuées sur les échantillons pris en étude.

Un diagramme flux a été appliqué pour isoler et identifier *Salmonella*, suite auquel les caractères culturels, biochimiques et morpho-tinctoriaux spécifiques pour plusieurs souches de genre *Salmonella* diagnostiqués ont été observés, à la fois dans le cas des poules pondeuses et aussi dans le cas des poulets de chair. L'identification sérologique a consisté dans l'établissement de la structure antigénique somatique à l'aide des sérums anti-*Salmonella* mono- et polyvalents et la classification en sérovariantes des souches de *Salmonella* a été réalisée conformément au standard ISO/TR 6579-3:2014 « Microbiologie des produits alimentaires – Méthodologie horizontale pour détecter, compter et sérotyper *Salmonella* – 3ème Partie Guide pour sérotypage *Salmonella* spp » et en accord avec le croquis Kauffmann-White – Le Minor sur la base de l'identification des antigènes lipo-polysaccharidiques « O », des antigènes protéiques flagellaires « H » et des antigènes de couverture « Vi ». La détection du génome spécifique aux différentes sérovariantes de *Salmonella* a été réalisée en utilisant 2 tests : le test multiplex PCR et le test de séquençage, sur un nombre de 44 isolés des poules pondeuses diagnostiquées avec *Salmonella*,

souches qu'initialement ont été identifiées phénotypique sur la base des caractères culturels, morpho-tinctoriaux, biochimiques et typiques sérologique par des techniques spécifiques de bactériologie. De l'analyse des résultats obtenus suite à l'électronmicroscopie, il résulte que dans la structure du fléau de *S. Enteritidis*, les réseaux de protoflagelline présentent un aspect prolongé, parallèle et filamenteux, comparativement aux proto-structures flagellaires à aspect hélicoïdal de *S. Typhimurium*. L'image réelle du résultat de la présence de l'injure bactérienne dans les tissus et les organes a été mise en évidence par les techniques histopathologiques classiques, dans tous les cas examinés étant observée une incidence et fréquence augmentée des inflammations prolifératives de type lymphoïde et/ou macrophagique, ayant une expression topo-histologique en foyers et/ou diffuse, plus fréquemment identifiée dans les cas où les infections avec *S. Gallinarum* et *S. Enteritidis* ont évolués comparativement aux infections produites par *S. Pullorum*, auxquelles la lésion constamment identifiée la constitue la myocardite lympho-histocytaire, la forme diffuse.

Le 10ème Chapitre « mesures sanitaires – vétérinaires appliquées dans le cas d'identification d'un résultat positif pour *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis, chez les effectifs de poulets de chair et de poules pondeuses » précise les aspects extrêmement importants concernant la déclaration d'un effectif positif avec *Salmonella* et aussi les mesures restrictives concernant l'effectif (les effectifs) visé(s), séparément sur les deux catégories importantes prises en étude : poules pondeuses et poulets de chair.

Le 11ème Chapitre « Prévalence des sérovariantes de *Salmonella* en Roumanie, pendant la période 2013 – 2016 » présente l'investigation de la prévalence des sérotypes de *Salmonella* qui circulent dans les différentes espèces d'animaux de Roumanie, et aussi la réalisation d'une distribution spatiale des isolés de *Salmonella* au niveau départemental, entre 2013 et 2016. Les données générées par la collecte des renseignements concernant les 5067 échantillons de la période analysée ont été introduites dans un Logiciel Excel 2007. La fréquence de chaque sérotype de *Salmonella* isolé été ainsi déterminée des différents matrices et départements. Dans le cadre des activités officielles concernant les programmes de surveillance des sérotypes de *Salmonella*, respectivement la réalisation des programmes de surveillance et de contrôle des salmonelloses chez les animaux, on a analysé un nombre de 1357 échantillons, et en 2016, un nombre de 1188 échantillons. Pendant la période 2013 – 2016, l'étude a été réalisée sur les échantillons issus des 20 espèces d'animaux domestiques et sauvages, situés sur l'entier territoire du pays, des fermes, ménages de la population ou jardin zoologiques.

Le 12ème Chapitre « Conclusions et Recommandations » établit 34 conclusions bien argumentées extraites pendant les recherches effectuées et 2 recommandations.