

Université de Montréal

Épidémiologie et contrôle des infections à *Salmonella* spp. chez le porc

**Par
Ann Letellier**

**Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine**

**Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie**

avril 2000

©Ann Letellier, 2000



W

4

U58

2001

v. 009

C

C

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée :

Épidémiologie et contrôle des infections à *Salmonella* spp. chez le porc

présentée par

Ann Letellier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Serge Larivière, président du jury

Serge Messier, directeur de recherche

Sylvain Quessy, codirecteur de recherche

Sylvie D'Allaire, membre du jury

Danielle Malo, examinatrice externe

Robert Higgins, représentant du doyen

Thèse acceptée le 1 décembre 2000

SOMMAIRE

Salmonella, une bactérie responsable de gastro-entérites aiguës chez l'humain, est aussi retrouvée fréquemment chez l'espèce porcine, causant des pertes économiques importantes. Afin de mieux contrôler les infections reliées à cette bactérie chez l'humain, il est important de réduire la prévalence de l'infection dans la population animale. L'hypothèse de base de ces travaux était que suite à l'identification et la diminution des sources de contamination des animaux ainsi que par l'identification de traitements préventifs visant à réduire le nombre d'animaux porteurs, il serait possible de diminuer la prévalence de cet agent pathogène dans la population porcine. Afin de recueillir des données épidémiologiques de base telles la prévalence et la distribution des salmonelles dans la population porcine de la province de Québec, nous avons prélevé des échantillons de fèces de 1009 porcs sélectionnés aléatoirement dans 4 abattoirs de cette province. La recherche de *Salmonella* spp. a été effectuée par des techniques standards de culture bactérienne. Nous avons isolé la bactérie à partir de 5,4% des échantillons de matières fécales de porcs analysés. Si l'on ne considère que les élevages où au moins 5 échantillons avaient été prélevés (n=201), la bactérie a été isolée de 26,2% de ceux-ci alors qu'une prévalence supérieure à 50% a été observée chez seulement 2,8 % des élevages. Afin d'évaluer la distribution de la bactérie dans l'environnement immédiat des animaux, et tenter de réduire les sources de contamination des porcs, nous avons écouvillonné plusieurs sites différents, principalement à l'intérieur du bâtiment, dans cinq élevages identifiés préalablement comme positifs à *Salmonella* spp. dont 2 où des signes cliniques de salmonellose avaient été observés. Les prélèvements effectués dans les parcs étaient positifs (21-

100%) dans les 5 élevages. Les écouvillons prélevés à l'extérieur des parcs, notamment au niveau des portes, des planchers et des accessoires de fermes étaient aussi contaminés pour les élevages avec signes cliniques alors que peu de ces échantillons se sont révélés positifs dans les élevages sans signe clinique.

Nous avons aussi évalué l'efficacité à prévenir l'infection, en conditions expérimentales, de différents traitements tels l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques, l'acidification de l'eau et la vaccination. Nous avons de plus étudié la réponse immunitaire non spécifique des animaux suite aux différents traitements. Alors que plusieurs traitements ont provoqué une activation des cellules phagocytaires, les taux de phagocytose de *Salmonella* Typhimurium, observés en utilisant la cytofluorométrie avec du sang complet, n'ont pas été augmentés avec les différents traitements utilisés. Cependant, l'utilisation d'un vaccin atténué a permis de stimuler l'immunité locale, notamment la production d'IgA dirigés contre *S. Typhimurium*, et de réduire significativement la présence de ce micro-organisme au niveau de l'iléon.

Très peu de fermes porcines semblent être fortement contaminées, c'est-à-dire lorsque plus de 50% des animaux échantillonnés sont positifs à *Salmonella*. Ceci nous laisse croire qu'il serait possible de diminuer la contamination de la viande de porc par un suivi étroit lors de l'abattage des lots de porcs provenant de ce type d'élevages, tout en se concentrant sur le contrôle de *Salmonella* spp. sur ces fermes. Les données que nous avons obtenu suggèrent cependant que des mesures d'hygiène strictes, notamment de lavage et désinfection, devront être mises en place dans les élevages avec des signes

cliniques de salmonellose puisque la bactérie semble omniprésente dans l'environnement immédiat des animaux. Finalement, nos travaux suggèrent que dans les élevages positifs, il serait utile d'envisager l'utilisation d'un vaccin vivant atténué pour réduire la prévalence de l'infection à *Salmonella* spp.

Mots-clés : *Salmonella*, état de porteur, excrétion, porc, vaccination, réponse immunitaire

TABLE DES MATIÈRES

	Page
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
DÉDICACE.....	x
REMERCIEMENTS.....	xi
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
2.1 Revue générale des infections à <i>Salmonella</i> spp.....	7
2.1.1 Caractéristiques générales.....	7
2.1.2 Classification	8
2.1.3 Spécificité d'hôte	9
2.1.4 Symptômes chez le porc.....	10
2.1.5 Méthodes de détection des animaux porteurs.....	13
2.2 Épidémiologie.....	16
2.2.1 Survie dans l'environnement.....	17
2.2.2 Sources d'infections chez le porc	17
2.2.3 Transmission et excrétion.....	19
2.2.4 Prévalence chez le porc.....	22
2.3 Pathogénie et facteurs de virulence.....	26
2.3.1 L'infection chez le porc.....	26
2.3.2 Facteurs de virulence.....	28
2.3.3 Interactions des salmonelles avec les cellules épithéliales.....	34
2.3.4 Interactions des salmonelles avec les cellules phagocytaires.....	40
2.3.5 Résistance de l'hôte aux infections à <i>Salmonella</i>	43
2.4 Contrôle des infections à <i>Salmonella</i> spp.....	54
2.4.1 Facteurs de risque.....	54
2.4.2 Flores de compétition.....	55
2.4.3 Vaccination.....	60

Chapitre 3.	Prevalence of <i>Salmonella</i> spp. and <i>Yersinia enterocolitica</i> in Finishing Swine at Canadian Abattoirs.....	66
Chapitre 4.	Distribution of <i>Salmonella</i> in swine herds in Québec.....	85
Chapitre 5.	Assessment of various treatments to reduce carriage of <i>Salmonella</i> in swine.....	103
Chapitre 6.	Host response to various treatments to reduce <i>Salmonella</i> infections in swine.....	125
Chapitre 7.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	147
7.1.	Les données épidémiologiques concernant la prévalence de <i>Salmonella</i> spp. dans les élevages porcins.....	149
7.2.	L'identification des facteurs de risques et la prévention de la contamination à la ferme.....	150
7.3	Stratégies de réduction de l'état de porteur de salmonelles et réponse immunitaire chez le porc.....	155
Chapitre 8.	CONCLUSIONS.....	168
	BIBLIOGRAPHIE.....	172
	ANNEXE A : Contribution à l'avancement des connaissances.....	225

LISTE DES TABLEAUX

	Page
3.1 Distribution of <i>Salmonella</i> spp. serotypes according to the region.....	77
3.2 Frequency distribution of herd-level foodborne pathogens in finishing pigs for herds where 5 or more samples were taken.....	78
3.3 Distribution of serotypes among samples positive for <i>Yersinia enterocolitica</i> according to the region.....	79
4.1 Environmental sampling in swine herds positive for <i>Salmonella</i> spp.....	100
4.2 Prevalence and distribution of <i>Salmonella</i> spp. in an integrated swine unit.....	101
4.3 Serotypes and phage types of <i>Salmonella</i> isolated from an integrated swine unit at different production levels.....	102
5.1 Recovery of <i>S. Typhimurium</i> from tissues and feces after experimental infection of pigs receiving various treatments.....	122
5.2 Evaluation of bacterial flora in the colon of treated and control pigs.....	123
6.1 Recovery of IgA in small intestine (median OD) from pigs from different groups and percentage of animals colonized by <i>Salmonella</i> Typhimurium in MLN and ileum.....	145
6.2 Histopathological analysis of tissues from SC54™ vaccinated and control pigs.....	146

LISTE DES FIGURES

	Page
2.1 Cycle des salmonelles.....	19
2.2 Invasion de la muqueuse intestinale par les salmonelles	35
2.3 Interactions des salmonelles avec les cellules hôtes et implication des deux différents systèmes de sécrétion de type III.....	39
2.4 Cytokines, signaux et résistance aux infections à salmonelles-Rôle central des macrophages.....	46
5.1 Shedding of <i>S. Typhimurium</i> in feces following the experimental infection of pigs in each group.....	124
6.1 PMA-induced chemiluminescence response of whole blood phagocytes from pretreated and control pigs.....	143
6.2 Phagocytosis of <i>S. Typhimurium</i> or latex beads by whole blood phagocytes.....	144
7.1 Illustration de la problématique des infections à salmonelles chez l'espèce porcine.....	166
7.2 Analyse par PFGE des isolats de <i>S. Typhimurium</i> DT 108 dans les différents niveaux de la production.....	167

À mes deux trésors, Dominique et Gabrielle...

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet. Ces personnes, grâce à leur expérience, m'ont permis de réaliser ce travail. Cependant, j'aimerais remercier avec une attention particulière les personnes suivantes:

- ◆ Mon directeur, le Dr Serge Messier, pour ces précieux conseils, son appui et sa grande disponibilité.
- ◆ Mon codirecteur, le Dr Sylvain Quessy, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son appui, sa générosité, sa très grande disponibilité et pour toute la confiance et l'encouragement qu'il m'a témoigné.
- ◆ Les membres du Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire de St-Hyacinthe, de la section hygiène du milieu : Louise Lessard, Louise Beausoleil, Marie-Claude Bérard, Julie Légaré, Kathie Roseberry, Raymonde Massicotte, Sonia Chenier, Philippe Busque, Nancy Rhéault, Éric Nadeau, François Caya, Jocelyn Pilon, Julie Brassard, Èvelyne Guèvremont, Valérie Thibodeau, Hélène Bergeron ainsi que Nicole Trottier, pour leur collaboration lors de ce projet de recherche, tous les services rendus et surtout pour leur amitié.
- ◆ Mon époux et mes enfants, pour leur patience et leur compréhension.
- ◆ Mon père, pour m'avoir soutenu tout au long de ces années.
- ◆ Mes remerciements vont également à toute l'équipe de F. Ménard inc., l'Université de Montréal et l'Agence canadienne d'inspection des aliments pour leur soutien et appui financier.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

En santé publique, la problématique associée à la présence de *Salmonella* dans les produits de viandes est d'une grande importance du point de vue socio-économique. En effet, des pertes annuelles estimées à plus de \$4 milliards sont associées à ces infections chez l'humain en Amérique du Nord (Todd, 1989). Bien que dans la majorité des cas, la volaille ou ses sous produits aient été associés aux cas humains, la viande de porc constitue une source non négligeable de contamination par *Salmonella* chez l'homme. Certains auteurs ont estimé que les produits de porcs sont responsables d'environ 10% des cas de salmonellose retrouvés chez l'humain (Bryan, 1988).

De plus en plus les consommateurs sont sensibilisés à la notion de sécurité alimentaire et sont soucieux de consommer des viandes exemptes de pathogène alimentaire et sans danger. Il est donc nécessaire de diminuer et de maîtriser les taux de contamination des viandes pour conserver les marchés actuels. Dans ce contexte, il n'est pas étonnant que plusieurs pays aient adopté des mesures visant à réduire la présence de cette bactérie dans les produits finis de volaille, de bœuf et de porc. En ce qui concerne l'espèce porcine, certains pays, tel le Danemark, ont choisi une approche visant à gérer le problème à sa source, soit à la ferme, chez l'animal vivant. Ceci soulève toutefois, comme nous le verrons, la problématique du dépistage et de l'identification des élevages contaminés.

D'autres pays, comme les États Unis d'Amérique ont choisi une approche où l'effort le plus important se situe en abattage et en transformation, prenant pour acquis

une certaine contamination de l'intrant principal: l'animal vivant. L'approche adoptée fut celle de l'utilisation de modèles d'identification des sources de contamination et de gestion des points critiques appelés modèles HACCP. Il est cependant vite apparu que cette approche se révélait possible dans la mesure où l'animal vivant était relativement peu contaminé. Toutefois, l'apparition de signes cliniques associés à des sérovars de *Salmonella* traditionnellement peu virulents pour le porc laissait présager une augmentation de la prévalence dans ces élevages. Puisqu'en vertu des règlements en vigueur dans l'industrie, des taux maximaux de contamination sont admis, il s'est révélé que l'abattage de lots où plusieurs animaux sont contaminés était très problématique. Des pressions soutenues sur les associations d'éleveurs furent donc exercées pour qu'un meilleur contrôle de cette bactérie soit exercé à la ferme.

La réduction de la contamination des élevages de porcs posait toutefois plusieurs défis. En premier lieu, le fait que cette bactérie ne cause que rarement des signes cliniques en élevages est certe de nature à compliquer l'identification des élevages à risque. Conséquemment, nos connaissances sur l'épidémiologie de cette bactérie dans les élevages sont limitées. Par exemple, les données de bases sur la prévalence et la distribution dans les élevages sont pratiquement inexistantes. Ces données sont primordiales pour le choix des moyens de contrôles pouvant être appliqués. En effet, afin de pouvoir envisager une mesure telle l'abattage en fin de journée des lots à risque, un nombre relativement peu élevé d'élevages très contaminés est un pré-requis. Cette mesure est toutefois impensable si la majorité des élevages sont fortement contaminés.

Le deuxième défi de taille relève de la gestion des élevages contaminés. Afin de gérer les élevages contaminés, il apparaît tout aussi important de comprendre la distribution de la bactérie dans ces élevages afin de mieux connaître les sources de contamination ou de recontamination des animaux. De telles données peuvent apporter des indications relatives aux différents moyens de prévention de l'entrée des *Salmonella* spp. dans les élevages.

En troisième lieu, le choix des traitements préventifs pour les animaux dans les élevages contaminés afin de limiter la propagation de l'infection dans le troupeau se révélait tout aussi problématique. En effet, certaines ambiguïtés persistaient quant à l'efficacité de différentes stratégies de contrôle des infections à *Salmonella* chez le porc. En fait, peu d'études ont été menées chez cette espèce animale. Afin de préciser l'efficacité des stratégies de traitement à contrôler les infections à salmonelles chez le porc, un modèle d'infection devait être élaboré afin de mimer l'infection naturelle. De plus, relativement peu de données étaient disponibles concernant la pathogénie des infections à *Salmonella* chez le porc. Finalement, les données sur la réponse immunitaire de l'animal aux différents traitements étaient pratiquement inexistantes.

Étant donné ces considérations, l'hypothèse de cette étude était qu'en diminuant les sources de contamination pour les animaux, en stimulant leur système immunitaire par des composés immunomodulateurs ou en utilisant des flores de compétition, il était possible de diminuer la prévalence des salmonelles dans la population porcine.

Les objectifs de cette étude étaient les suivants:

1. Recueillir des données épidémiologiques telles que la prévalence de *Salmonella* chez le porc, sa distribution dans les élevages et les sources de contamination des animaux à la ferme afin d'élaborer de meilleures stratégies de contrôle des *Salmonella* chez le porc.
2. Évaluer l'efficacité et étudier la réponse immunitaire de l'hôte suite à l'utilisation de différents traitements visant à réduire l'état de porteur de *Salmonella* chez le porc.

CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Revue générale des infections à *Salmonella* spp.

2.1.1 Caractéristiques générales

Les *Salmonella* spp. sont des bactéries anaérobies facultatives, à Gram négatif et intracellulaires facultatives, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La majorité des salmonelles sont mobiles. Cependant, certaines souches non mobiles peuvent être retrouvées, tel le sérovar Pullorum (LeMinor, 1984). Les bactéries appartenant au genre *Salmonella* ont la capacité d'infecter plusieurs hôtes différents et de produire des manifestations cliniques avec des degrés de sévérité différents, variant de l'entérite à la fièvre typhoïde. La capacité des salmonelles de causer un tel spectre de maladies chez divers hôtes serait notamment attribuable à la diversité génétique de ce genre bactérien (Selander *et al.*, 1996).

Les infections causées par *Salmonella* spp. chez l'homme sont un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Dans les pays en voie de développement, la fièvre typhoïde, qui est causée par *Salmonella* Typhi est toujours présente. Au même titre que les autres salmonelloses, elle est souvent due à l'insuffisance des installations sanitaires et au faible niveau d'hygiène des populations. Dans les pays industrialisés, la fièvre typhoïde a virtuellement disparue. Le terme salmonellose est habituellement utilisé pour désigner les infections causées par les sérovats de salmonelles autre que Typhi et Paratyphi. La volaille, les œufs et les produits de viande sont les principaux aliments impliqués dans les infections à salmonelles chez l'homme. Chez l'homme, l'incidence de cette maladie est observée en nombre croissant et cette infection demeure la

principale maladie d'origine alimentaire à travers le monde (Todd, 1997; Bryan, 1998). Le développement de l'industrie agro-alimentaire, notamment la préparation d'aliments à base d'œufs et l'intensification des élevages, en particulier la production à grande échelle de volailles, sont des facteurs qui contribuent à cette augmentation des cas de salmonelloses humaines (Sansone, 1992). Dans les pays industrialisés, de 5 à 30% des cas de salmonelloses humaines sont attribués à la consommation de viande de porc contaminée par *Salmonella* spp. (Bryan, 1988; Bean et Griffin, 1992; Berends *et al.*, 1997).

2.1.2 Classification

Il existe plusieurs schémas de classification pour le genre *Salmonella* mais aucun n'est complètement accepté par la communauté scientifique. La technique d'hybridation ADN-ADN entre les salmonelles indique qu'il n'y a pas suffisamment de variation génétique pour permettre une différenciation des espèces dans le genre *Salmonella* (Hook, 1990). Selon la plus récente proposition taxonomique (Wayne, 1991), le genre *Salmonella* regroupe plus de 2500 sérovars qui diffèrent par leur structure antigénique, leur spécificité d'hôte et leurs réactions biochimiques. Selon la classification officielle, les différentes salmonelles sont regroupées en 2 espèces soient *S. bongori* et *S. choleraesuis*; cependant, le système de classification utilisé par le Center of Disease Control (CDC) est l'utilisation de l'espèce *S. enterica* au lieu de *S. choleraesuis* (Brenner et McWhorter-Murlin, 1998). Cette espèce regroupe la majorité des sérovars, qui sont divisés en six sous-espèces selon des caractères phénotypiques et génétiques. *Salmonella bongori* regroupe environ 20 sérovars retrouvés chez les

reptiles (Brenner et McWhorter-Murlin, 1998). Les différents sérovars sont antigéniquement distincts et définis par leurs antigènes somatiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (Vi). La façon officielle de désigner les salmonelles est par exemple: *Salmonella choleraesuis* sous-espèce *choleraesuis* sérovar Typhimurium mais elle est en pratique le plus souvent désignée comme étant *Salmonella* Typhimurium (Euzéby, 1999).

Le schéma de Kauffman-White permet de subdiviser les salmonelles en sérovars, selon leurs différences antigéniques. L'antigène O est celui qui correspond à une séquence particulière de polysaccharides du LPS, numérotée par des chiffres arabes. Certaines salmonelles ont en commun une portion antigénique donnée, ce qui permet de les réunir en différents groupes antigéniques O. Il y a deux types d'antigènes flagellaires (H) désignés 1 et 2. La phase 2 est qualifiée de non spécifique, puisque de nombreux sérovars différents partagent les mêmes facteurs antigéniques. La phase 1 est qualifiée de spécifique car les sérovars qu'elle comporte présentent des fractions antigéniques différentes. En plus de ces antigènes, on retrouve aussi l'antigène Vi qui est l'antigène capsulaire de la bactérie, retrouvé chez quelques sérovars de salmonelles, notamment *S. Typhi*. Ce polysaccharide acide est aussi désigné l'antigène K (Guthrie, 1992).

2.1.3 Spécificité d'hôte

En général, les *Salmonella* spp. sont divisées en différents groupes, selon leur préférence d'hôte. À l'exception des sérovars hautement adaptés aux humains tels *S.*

Typhi et *S. Paratyphi* (A, B et C), des sérovars adaptés à l'espèce aviaire tels *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*, et les sérovars *S. Dublin* et *S. Abortusovis*, adaptés respectivement aux bovins et aux ovins, tous les sérovars peuvent être retrouvés chez l'espèce porcine (LeMinor, 1984). Les sérovars *S. Choleraesuis* et *S. Typhisuis* sont cependant spécifiquement adaptés à l'espèce porcine (Barnes et Bergeland, 1968; Baskerville et Dow, 1973). Les facteurs influençant la spécificité d'hôte des différents sérovars de salmonelles sont encore très peu décrits, cependant, il demeure connu que la survie intracellulaire du micro-organisme dans les macrophages est un facteur déterminant (Kingsley et Bäumler, 2000).

La plupart des sérovars appartiennent au groupe de salmonelles n'ayant pas de spécificité d'hôte. *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont les sérovars les plus connus de ce groupe et les plus fréquemment associés aux entéocolites humaines (Falkow et Mekalanos, 1990; Todd, 1997). Étant donné la diversité des recherches effectuées sur différents sérovars de *Salmonella*, les volets subséquents de la revue de littérature seront principalement dirigés vers certains sérovars retrouvés chez le porc, notamment *S. Typhimurium* et *S. Choleraesuis* et porteront plus spécifiquement sur les aspects qui guideront le lecteur à la compréhension du projet de recherche.

2.1.4 Symptômes chez le porc

La présence de salmonelles chez le porc peut causer, selon le sérovar impliqué et la susceptibilité de l'animal, une salmonellose septicémique, une salmonellose entérique ou un état de porteur asymptomatique. Les signes cliniques associés à la salmonellose

porcine causée par *S. Typhimurium* et ceux associés à la salmonellose causée par *S. Choleraesuis* sont distincts. *S. Choleraesuis*, variant *kunzendorf*, cause une salmonellose septicémique, caractérisée par de la fièvre, de la diarrhée et une septicémie (Wilcock et Schwartz, 1992) et peut occasionner une entérocolite, une pneumonie, une méningite et une encéphalite (Baskerville et Dow, 1973 ; Wilcock et Olander, 1977). Les signes cliniques apparaissent de 24 à 36 heures après l'infection et les porcs affectés présentent une perte d'appétit, un état léthargique et fébrile, l'augmentation de la température corporelle pouvant aller jusqu'à 42°C. Cependant, la diarrhée n'apparaît généralement pas avant le 4 ou 5^{ème} jour suivant l'infection. Des signes respiratoires tels, la toux et de la dyspnée peuvent aussi se manifester. Les signes pathologiques associés à la salmonellose septicémique sont principalement une colite, une cyanose des extrémités et de l'abdomen de l'animal, une hypertrophie des noeuds lymphatiques mésentériques (Roof *et al.*, 1992), une splénomégalie, une hépatomégalie, une pneumonie interstitielle et une muqueuse intestinale hyperémique. De plus, des sites de nécrose sont aussi notés au niveau du foie. Dans la plupart des épisodes, la mortalité chez les animaux atteints est très élevée. La morbidité est variable mais généralement inférieure à 10% (Reed *et al.*, 1986; Wilcock et Schwartz, 1992).

Les autres sérovars, notamment *S. Typhimurium* sont des agents de salmonellose entérique, aiguë ou chronique et apparaissent chez les porcs, de la période du sevrage jusqu'à environ 4 à 5 mois d'âge. Les symptômes typiques sont la fièvre et la diarrhée tandis que la caractéristique pathologique est l'ulcération du côlon (Roof *et al.*, 1992; Schwartz, 1999). Contrairement à la salmonellose septicémique, le signe clinique initial associé à l'infection est la diarrhée aqueuse jaunâtre. Les porcs infectés présentent de

l'anorexie, un état fébrile et léthargique. La mortalité est souvent très faible. Cependant, la morbidité est très élevée plusieurs jours après l'infection. La lésion macroscopique principale à la nécropsie est la colite nécrotique diffuse ou focale avec une augmentation marquée du volume des noeuds lymphatiques mésentériques. Les parois internes des muqueuses intestinales sont hyperémiques et rugueuses. Les contenus du côlon et du caecum sont colorés par la bile avec du matériel noirâtre ou de texture granuleuse (Wilcock et Schwartz, 1992).

L'état de porteur est défini comme étant l'absence de manifestations pathologiques chez des animaux capables de transmettre l'infection aux individus susceptibles (Thrusfield, 1986). Les animaux porteurs contribuent, de façon continue ou intermittente, à disséminer les salmonelles dans l'environnement via leurs matières fécales.

Une infection asymptomatique peut, selon le cas, évoluer vers un état de porteur actif, passif ou latent (Wray et Sojka, 1977). L'état de porteur actif caractérise les animaux qui excrètent *Salmonella* spp. de façon massive. Ce type d'excrétion du micro-organisme peut être permanent ou intermittent et se produit chez des animaux malades, chez des animaux convalescents et chez des animaux porteurs sains. L'état de porteur actif est souvent associé avec la présence d'un haut titre d'anticorps sériques dirigés contre les antigènes O et H de *Salmonella* (Gray et Fedorka-Cray, 1996).

Les porteurs passifs sont décrits comme étant des animaux qui ingèrent des *Salmonella* spp, et chez lesquels les micro-organismes passent dans la lumière

intestinale pour se retrouver dans les fèces sans ou avec une très faible invasion des nœuds lymphatiques mésentériques. Ces animaux cessent d'excréter *Salmonella* spp. peu de temps après avoir été retirés de l'environnement contaminé (Wray et Sojka, 1977).

L'état de porteurs latents ou silencieux caractérise les animaux ayant une infection profonde des tissus par *Salmonella* spp., au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques en général, mais sans excrétion de la bactérie dans ces fèces (Wray et Sojka, 1977). L'excrétion peut être réactivée par certaines situations de stress et l'animal devient un porteur actif.

Certains facteurs de stress peuvent entraîner l'activation ou la réactivation des signes cliniques et l'excrétion chez les animaux porteurs de salmonelles. Ces facteurs incluent notamment le transport des animaux, le surpeuplement, l'administration de corticostéroïdes, la mise-bas et les infections concomitantes (Bush *et al.*, 1999; Schwartz, 1999).

2.1.5 Méthodes de détection des animaux porteurs

La méthode de diagnostic la plus courante est la recherche et l'identification du micro-organisme. Les techniques de recherche de salmonelles sont très variées et diffèrent selon le sérovar recherché et la nature de l'échantillon suspect à analyser. Une technique de recherche des salmonelles qui inclue une étape de pré-enrichissement, suivi d'un enrichissement sélectif (bouillon tétrathionate, bouillon sélénite ou

Rappaport-Vassiliadis) et d'un ensemencement sur gélose sélective est recommandé pour les échantillons contenant peu de salmonelles, tels les aliments et l'eau (Skovgaard *et al.*, 1985; Vassiliadis *et al.*, 1987). Ces méthodes sont aussi utilisées pour la recherche de salmonelles à partir de tissus ou de fèces d'animaux porteurs asymptomatiques, chez lesquels les micro-organismes sont retrouvés en faible quantité. Chez les animaux qui présentent des signes cliniques, les tissus et les fèces peuvent être ensemencés directement sur géloses sélectives (gélose vert brillant) et différentielles (gélose MacConkey), étant donné la forte concentration de salmonelles chez ces individus (Grasmick, 1992).

Cependant, Smith (1952) a indiqué que les milieux d'enrichissement sélectifs utilisés dans les techniques conventionnelles sont toxiques pour le sérovar *S. Choleraesuis* ainsi que les sérovares avec une spécificité d'hôte (LeMinor, 1984). L'utilisation du bouillon GN-Hajna est recommandée pour l'isolement des sérovares spécifiques d'espèce, notamment *S. Choleraesuis* (Ewing, 1986). Le seuil de détection par la technique d'enrichissement conventionnelle est de 10^2 micro-organismes par gramme de fèces (Cohen *et al.*, 1994).

L'isolement de salmonelles n'est cependant pas suffisant pour le diagnostic de la salmonellose, étant donné que les infections asymptomatiques et la contamination de l'environnement sont fréquentes. L'identification des salmonelles jumelée à la présence de signes cliniques et de lésions typiques des salmonelloses, demeurent à ce jour la base du diagnostic (Schwartz, 1999).

D'autres outils plus sophistiqués, tels les analyses PCR (amplification en chaîne par la polymérase) ont été développés. Cependant, elles ne sont pas utilisées de routine, étant donné leur coût d'utilisation beaucoup plus élevé que les méthodes conventionnelles. Le seuil de détection par la technique PCR varie de 2 à 100 salmonelles selon les amorces et les techniques utilisées (Chen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Vantarakis *et al.*, 2000).

Les techniques ELISA peuvent aussi être utilisées pour la détection du micro-organisme ou de la réponse humorale à cet agent pathogène. Les techniques utilisées pour détecter les salmonelles dans les aliments sont des ELISA de type « capture de l'antigène ». La culture conventionnelle nécessite de 3 à 7 jours d'analyse pour l'identification des salmonelles alors que la technique ELISA nécessite tout au plus une journée d'analyse. Cependant, le type d'échantillon à analyser influence directement la performance du test. La détection des salmonelles par la technique ELISA dans les matières fécales est donc moins efficace que la détection de ce micro-organisme dans les aliments. Le seuil de détection de cette épreuve est de 10^4 à 10^5 micro-organismes par millilitre. Une étape de pré-enrichissement est souhaitable (Dziezak, 1987).

La seconde utilisation des épreuves ELISA est la détection des animaux qui ont été ou qui sont infectés par les salmonelles. La détection des anticorps dirigés contre les antigènes O des salmonelles est utilisée chez le porc, notamment dans un programme de surveillance national au Danemark (Nielsen *et al.*, 1995 ; Mousing *et al.*, 1997). Cette épreuve est utilisée pour définir un statut d'élevage afin de déterminer des niveaux de contamination à *Salmonella* spp. dans les troupeaux au Danemark. Cependant, ce

test de dépistage indirect n'est pas recommandé pour définir le statut individuel des animaux (Gray et Fedorka-Cray, 1996). Avec les connaissances actuelles, la détection de l'état de porteur à l'échelle individuelle est problématique même s'il est nécessairement un élément clé dans le contrôle des infections à salmonelle.

2.2 Épidémiologie

Les salmonelles sont ubiquistes dans la nature et retrouvées chez presque tous les vertébrés et dans diverses niches environnementales. Le réservoir de salmonelles est le tractus intestinal des animaux. Les salmonelles parviennent à se disséminer dans l'environnement, étant donné la diversité des hôtes possibles et grâce à une survie prolongée dans l'environnement. De plus, l'excrétion des salmonelles via les matières fécales est effectuée par les animaux porteurs et la transmission de la bactérie peut s'effectuer par plusieurs vecteurs tant mécaniques que biologiques (Carlson et Blaha, 1999). Les infections à *Salmonella* spp. chez le porc soulèvent deux problématiques principales: la contamination des carcasses et des produits de viande de porc par les salmonelles et la salmonellose en elle-même chez le porc (Wilcock et Schwartz, 1992). La consommation de viande contaminée par les salmonelles comporte un risque d'infection alimentaire chez l'homme qui se doit d'être considéré. En fait, le porc peut être infecté par une variété de sérovars de salmonelles sans démontrer de signe clinique, cependant il représente une source de contamination des produits de viande de porc et conséquemment représente une source potentielle d'infection pour l'homme (Schwartz, 1999).

2.2.1 Survie dans l'environnement

Le temps de survie des salmonelles dépend des conditions qui lui sont offertes pour survivre et se multiplier. Ce micro-organisme peut survivre et se multiplier à des températures variants de 7°C à 45°C, avec une température optimale de 37°C, soit la température corporelle de nombreuses espèces animales (OMS, 1988). Les salmonelles supportent une gamme de pH allant de 4.5 à 9. Cependant, à des valeurs de pH inférieures à 5, leur survie peut être affectée (Henry *et al.*, 1983). Les salmonelles sont sensibles à la chaleur, soit à une température de 80°C (Rubin et Weinskin, 1977). Elles résistent cependant au froid et survivent assez bien dans le milieu extérieur, dans les sols, les matières fécales et dans l'eau (Will *et al.*, 1973) pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines ou mois, dépendamment des conditions présentes (OMS, 1988). Les salmonelles résistent à la dessication et se développent assez bien en conditions humides (valeurs d'activité de l'eau (A_w) de 0,945 à 0,999). Pour des produits déshydratés ($A_w=0,200$), leur survie peut cependant être de longue durée. Les salmonelles ont donc la capacité de survivre dans différentes conditions environnementales (Schwartz, 1999).

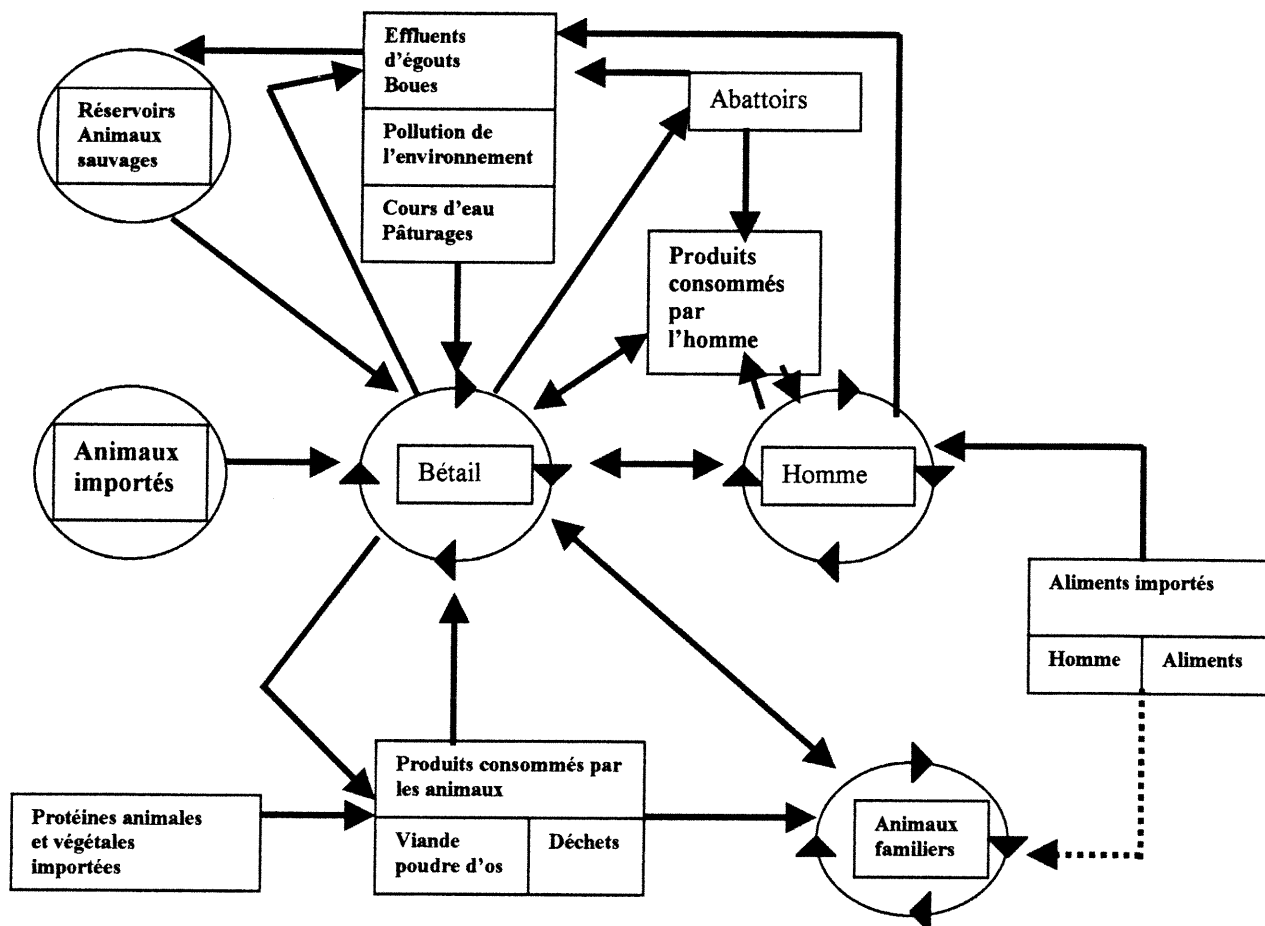
2.2.2 Sources de contamination chez le porc

Les sources potentielles de contamination à salmonelles chez le porc sont multiples, étant donné la complexité du cycle des salmonelles (figure 2.1). *S. Choleraesuis* est souvent isolé de porcs malades. Cependant, il est pratiquement

inexistant dans les aliments pour bétail et chez les autres espèces animales (Wilcock et Schwartz, 1992). Les porcs infectés et excréteurs ainsi que l'environnement contaminé par ceux-ci sont les sources majeures de nouvelles infections à *S. Choleraesuis* (Schwartz, 1999; Anderson *et al.*, 2000).

Les sources de contamination par les autres sérovars sont moins connues étant donné la distribution des salmonelles chez différents hôtes et la variété de vecteurs possibles. De façon générale, les différentes sources de contamination des porcs sont les aliments contaminés, les porteurs chroniques introduits dans les élevages, les rongeurs infectés ou le contact avec le personnel et/ou le matériel de ferme contaminés. Les oiseaux, les insectes et les animaux familiers peuvent aussi jouer un rôle important comme source de contamination dans les élevages (Allred *et al.*, 1967; Williams *et al.*, 1969; Nap et Murphy, 1971; Duhamel *et al.*, 1992; Wilcock et Schwartz, 1992). Les différents sérovars qui se retrouvent dans l'environnement sont ingérés par les porcs, ceux-ci devenant ainsi des sources d'infection. Les aliments d'origine animale sont souvent associés à une source potentielle de contamination des élevages (Harris *et al.*, 1997; Bush *et al.*, 1999).

Figure 2.1. Cycle des salmonelles (adapté du rapport technique OMS; 1988)



2.2.3 Transmission et excrétion

Habituellement, la transmission des salmonelles chez le porc s'effectue initialement par une transmission horizontale, ce qui suggère un rôle important des animaux porteurs asymptomatiques (Gray et Fedorka-Cray, 1996). La transmission fécale-orale est la plus fréquente, s'effectuant donc soit d'un porc à l'autre par l'environnement contaminé ou de la truie aux porcelets (Schwartz, 1991). Cependant,

d'autres types de transmission sont possibles, notamment la transmission impliquant le tractus respiratoire supérieur. Fedorka-Cray *et al.*, (1995) ont démontré que la voie d'inoculation intranasale lors d'infections expérimentales à *S. Typhimurium*, chez des porcs ayant subi une ligature de l'oesophage, permettait une dissémination rapide du micro-organisme au niveau du tube digestif. Ceci suggère que les amygdales et les poumons peuvent être des sites importants d'invasion et de dissémination des salmonelles. D'autres auteurs suggèrent que la transmission peut aussi se faire par voie nasale via les sécrétions orales qui peuvent contenir des salmonelles (Linton *et al.*, 1970; Schwartz, 1999). Les sécrétions sous forme d'aérosols ainsi que la poussière contaminée favoriseraient une transmission par voie aérienne, sur de courtes distances. Plusieurs chercheurs ont étudié la transmission des salmonelles par les aérosols chez la souris, le bovin et le mouton et concluent que les aérosols jouent un rôle important dans la transmission des salmonelles chez ces espèces animales (Tannock et Smith, 1971; Wathes *et al.*, 1988; Hardman *et al.*, 1991). Certains auteurs indiquent que ce type de transmission par voie aérienne semble aussi probable chez le porc (Heard et Linton, 1966; Fedorka-Cray *et al.*, 1994).

Les matières fécales qui proviennent d'animaux infectés peuvent contaminer directement l'environnement, notamment les cours d'eau et les sols (OMS, 1988), les autres animaux et les installations à la ferme ainsi qu'à l'abattoir (Morgan *et al.*, 1987; Berends *et al.*, 1997). Les bactéries peuvent également se propager au cours du transport des animaux infectés et durant le maintien des animaux en enclos avant l'abattage (Isaacson *et al.*, 1999).

Plusieurs études ont été menées chez le porc, afin de déterminer la dose minimale de *Salmonella* Typhimurium requise afin de reproduire la maladie et d'établir un état de porteur. Cependant, la maladie avec signes cliniques sévères est expérimentalement difficile à reproduire. L'excrétion des salmonelles dans les matières fécales, suite à une infection expérimentale chez le porc avec *S. Typhimurium*, a été étudiée. Il a été possible de retrouver la bactérie dans les fèces de l'animal quotidiennement pour les dix premiers jours et de façon intermittente pour les mois suivant l'infection expérimentale. Quatre à sept mois suivant l'infection, des nécropsies ont été effectuées et plus de 90% des porcs étaient porteurs de *S. Typhimurium* dans les nœuds lymphatiques mésentériques, les amygdales, le caecum ou les fèces (Wilcock et Olander, 1978; Woods *et al.*, 1989). Suite à une infection expérimentale avec des doses de 10^8 à 10^{11} UFC, le niveau d'excrétion dans les matières fécales peut atteindre 10^6 UFC (unité formant colonie) /g de fèces pour *S. Choleraesuis* (Smith et Jones, 1967) et 10^7 UFC/g de fèces pour *S. Typhimurium* (Gutzmann *et al.*, 1976). D'autres études avec des doses moins importantes ont été menées et Fedorka-Cray (1994) a démontré que des porcs infectés avec une dose de 10^4 UFC de *S. Typhimurium* développaient un état de porteur pour une courte durée. Gray *et al.* (1995) ont indiqué que l'infection expérimentale des porcs soumis à une dose de 10^3 UFC de *S. Choleraesuis* n'entraîne pas de signe clinique ni d'excrétion apparente de salmonelles. Par contre, une dose de 10^6 UFC de ce micro-organisme entraîne une infection persistante et une excrétion sporadique de *S. Choleraesuis* dans les matières fécales pour une période de 9 à 12 semaines.

Une étude de transmission naturelle de *S. Typhimurium* chez le porc a indiqué que des porteurs asymptomatiques apparaissent lorsque des porcs naïfs sont exposés à une population de porcs excréant une dose inférieure ou égale à 10^3 UFC de *S. Typhimurium*/ g de fèces (Fedorka-Cray *et al.*, 1994). Par contre, Gray *et al.* (1995) ont démontré qu'une exposition naturelle de porcs exempts de salmonelles à des porcs excréant 10^3 UFC de *S. Choleraesuis* / g de fèces peut résulter en un épisode clinique sévère. Il est donc probable que les porcs infectés excréant *Salmonella* sont des sources de nouvelles infections (Wilcock et Schwartz, 1992).

L'influence des antibiotiques sur la fréquence et la durée de l'excrétion des salmonelles chez le porc est peu connu. Lors de salmonelloses entériques humaines, l'usage d'antibiotiques tend à prolonger l'état de porteur (Dixon, 1965; Aserkoff et Bennett, 1969). Chez les porcs démontrant une entérocologie, les antibiotiques ne réduisent pas la durée ni le taux d'excrétion fécale des salmonelles mais semble produire l'effet contraire soit les augmenter (Wilcock et Olander, 1978; Jacks *et al.*, 1988). À l'opposé, l'antibiothérapie au début d'une infection septicémique à *S. Choleraesuis* peut réduire de façon significative la durée et le taux d'excrétion fécale (Jacks *et al.*, 1981).

2.2.4 Prévalence chez le porc.

La plupart des épisodes de salmonellose surviennent dans les élevages intensifs en début d'engraissement. En général, *S. Typhimurium* cause les signes cliniques chez les porcs de 6 à 12 semaines d'âge mais rarement chez les animaux adultes, bien que

l'infection soit présente. Toutefois, chez les animaux adultes, l'infection asymptomatique reste souvent présente. Chez les porcelets, la présence d'anticorps maternels confère une protection contre la salmonellose en période pré-sevrage (Wilcock, 1978). *S. Choleraesuis* peut causer la maladie chez des animaux de tous les âges.

La salmonellose porcine est retrouvée mondialement mais sa prévalence varie beaucoup d'une région à l'autre (Gray et Fedorka-Cray, 1996). On note des variations de prévalence entre les différents sérovars, certaines variations de prévalence pouvant être associées à la virulence de souches endémiques dans une région, à la variation génétique des souches et/ou aux méthodes de détection utilisées. Toutefois, une incertitude existe encore à propos de cette variation. Dans certains pays européens, des programmes nationaux de contrôle des salmonelles sont en place depuis plusieurs années déjà, ce qui a permis de réduire considérablement la prévalence des salmonelles chez le porc. Au Danemark, une étude de séroprévalence par Bagessen *et al.* (1997) indique qu'approximativement 5% des élevages sont contaminés par les salmonelles, avec une prévalence de 1,3 % dans les viandes de porc. De plus, relativement peu d'élevages présentent des signes cliniques de salmonelloses (Mousing *et al.*, 1997). La prévalence des salmonelles en Suède, telle que déterminée à l'aide de cultures bactériennes des fèces, est très faible avec un pourcentage de 0,8% chez les porcs à l'abattage. Ceci permet à ce pays de produire de la viande de porc quasi exempte de salmonelles (0.01%) (Wierup, 1994). Aux Etats-Unis, une étude nationale du NAHMS (« National Animal Health Monitoring Service ») indique une prévalence de salmonelles de 6,2% dans les matières fécales de porcs alors que 38,2% des élevages

sont contaminés par les salmonelles (Ferris et Frerichs, 1996). Au Canada, le faible nombre d'études qui ont été effectuées jusqu'à maintenant ne permettent pas de connaître la prévalence réelle chez les animaux vivants. Lammerding *et al.* (1988) ont cependant observé que 17,5% des carcasses de porc dans les abattoirs au Canada, étaient contaminées par *Salmonella* spp. Au Danemark, Berends *et al.* (1997) ont démontré que les animaux vivants, porteurs de *Salmonella* sont de 3 à 4 fois plus susceptibles de générer des carcasses de porcs contaminées par ce micro-organisme que les animaux vivants exempts de *Salmonella*. L'infection se produit dans la première semaine suivant l'introduction des animaux dans l'élevage et atteint de 80 à 100% de prévalence à l'intérieur de 2 à 3 semaines. Environ 5 à 30% des porcs continuent d'excréter les salmonelles à la fin de la période d'engraissement (Mousing *et al.*, 1997). Il a aussi été noté que 70% de la contamination des carcasses provient des porteurs eux-même et que le 30% de contamination résiduelle est attribuée à la contamination croisée produite par les animaux porteurs dans l'élevage. La contamination fécale des carcasses est donc fréquente au moment de l'abattage et une contamination croisée peut se poursuivre tout au long des opérations, contaminant ainsi les produits de viande offerts aux consommateurs (Roberts *et al.*, 1975; Berends *et al.*, 1997).

Ferris et Frerichs (1990) ont rapporté que *S. Choleraesuis* est le second sérovar le plus souvent rencontré aux États-Unis depuis 1979. Depuis une quinzaine d'années, les cas de salmonellose associés à *S. Choleraesuis* ont augmenté aux États-Unis. Cependant des études récentes semblent indiquer une diminution des cas de salmonellose septicémiques dus à *S. Choleraesuis* (Schwartz, 1997) alors qu'une augmentation des cas de salmonellose entérique porcine avec signes cliniques associées

à *S. Typhimurium* est présentement observée (Ferris et Thomas, 1994; Sanford et Tilker, 1994; Desrosiers, 1999). En Amérique du Nord, plusieurs autres sérovars de *Salmonella* spp. sont retrouvés chez le porc, principalement *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka* et *S. Agona* (Roof *et al.*, 1992; Ferris et Thomas, 1994; Funk *et al.*, 1999).

La viande de porc est une source de contamination pour l'homme. Le porc infecté par les salmonelles qui quitte la ferme est considéré comme la principale source de contamination des carcasses à l'abattoir. Dans les produits de viande de porc, différentes études de prévalence ont été menées dans différents pays et indiquent que les salmonelles sont présentes entre 0-48% au niveau des carcasses (Riley, 1970; Tacal et Lawrence, 1980; Carr *et al.*, 1996) et entre 0-30% dans les produits de porcs (Roberts *et al.*, 1975; Fukushima *et al.*, 1987; Anon., 1994). Cette variation marquée est probablement due à la réelle variation du taux de contamination mais aussi due aux différentes méthodes de détection utilisées. Une contamination des produits de viande est généralement associée aux mauvaises pratiques d'hygiène des employés sur la chaîne d'abattage et de transformation. Cette contamination est notamment associée au transfert mécanique de la contamination aux carcasses et produits de viande par l'équipement et les ustensiles contaminés utilisés à l'abattoir (Berends *et al.*, 1997; Rheault et Quessy, 1999).

2.3 Pathogénie et facteurs de virulence

Les caractéristiques cliniques et pathologiques des infections à salmonelles sont extrêmement variables. La sévérité de la maladie est notamment influencée par le sérotype, la virulence, la résistance acquise et naturelle ou la susceptibilité de l'hôte, la voie d'infection ainsi que la dose infectante (Groisman *et al.*, 1990). De façon générale, les facteurs de virulence chez les salmonelles sont impliqués dans les diverses étapes de l'infection telles l'adhésion et l'invasion ainsi que dans la survie à l'intérieur des cellules de l'hôte (Finlay et Brumell, 2000).

Malgré certaines différences dans les signes cliniques, plusieurs similarités peuvent être relevées entre *S. Choleraesuis* et *S. Typhimurium* au niveau de leur pathogénie. À ce jour, il est connu qu'environ 4% du chromosome de *S. Typhimurium*, soit environ 200 gènes, codent pour des facteurs de virulence (Bowe *et al.*, 1998). Les gènes de virulence sont retrouvés sur un plasmide ou sur le chromosome comme unités de un ou de quelques gènes (petits îlots) ou en larges ensembles d'une série de gènes et d'opéron (îlots de pathogénicité) (Groisman et Ochman, 1997; Salama et Falkow, 1999; Marcus *et al.*, 2000).

2.3.1 L'infection chez le porc

Les études des infections à salmonelles chez l'espèce porcine sont en nombre limité. Cependant, certains aspects de la pathogénie sont à ce jour connus. Pour reproduire expérimentalement la salmonellose porcine, de larges doses de salmonelles

sont nécessaires (dose supérieure à 10^7 UFC). Toutefois, une faible dose provenant de la contamination d'aliments permet une répllication intraluminale du micro-organisme, ce qui éventuellement entraîne l'infection et/ou la maladie chez l'animal (Schwartz, 1999). L'établissement de la maladie est souvent facilitée par des facteurs particuliers de l'hôte, notamment un problème de péristaltisme, la composition de la flore intestinale de l'animal, la susceptibilité de l'hôte ou l'élévation du pH gastrique (Clarke et Gyles, 1993; Lalmanach et Lanthier, 1999).

Après leur absorption par la voie orale, les salmonelles passent par l'estomac où la population bactérienne est grandement réduite. Ils colonisent ensuite l'intestin (Reed *et al.*, 1986; Hale, 1988). Le développement de l'infection s'y déroule en différentes étapes : la croissance et prolifération des salmonelles dans l'intestin, l'invasion de l'épithélium de la muqueuse et de la *lamina propria*, la stimulation de la sécrétion des fluides et, finalement, la dissémination des salmonelles de l'intestin vers les nœuds lymphatiques mésentériques et les autres organes (Reed *et al.*, 1986).

Certaines études *in vivo* ont généré des données intéressantes sur la pathogénie des infections à salmonelles chez le porc. Dans un modèle d'anses ligaturées chez le porc, il a été démontré que la multiplication intraluminale varie selon les sérotypes. Plus particulièrement, *S. Typhimurium* se multiplie en plus grand nombre dans la région intraluminale que *S. Choleraesuis*, ce dernier étant plus invasif (Giannella *et al.*, 1973; Reed *et al.*, 1986). La dissémination des salmonelles dans les nœuds lymphatiques mésentériques est très rapide, soit 2 heures post-inoculation dans le modèle d'anses ligaturées chez le porc et d'environ 24h post-inoculation par voie orale (Reed *et al.*,

1986). Une étude de marquage immunoenzymatique a permis de démontrer que *S. Typhimurium* a une faible tendance à envahir la muqueuse intestinale et ne démontre pas de site spécifique de localisation intestinale, ni de préférence pour les plaques de Peyer. Cependant, *S. Choleraesuis* avait une préférence marquée pour le côlon et la surface luminale des cellules M des plaques de Peyer de l'iléon, par lesquelles il envahit la muqueuse intestinale (Pospischil *et al.*, 1990). Les tissus dans lesquels *S. Choleraesuis* est plus susceptible de se retrouver sont la jonction iléocécale et les nœuds lymphatiques iléocécaux, le contenu du caecum, les amygdales, les poumons et le côlon, et ceci indépendamment de la route d'inoculation (Gray *et al.*, 1995). Watson *et al.*, (2000) ont étudié *in vitro*, l'interaction entre les macrophages porcins et les différents sérovars de salmonelles, sans toutefois établir de corrélation avec la virulence des souches chez le porc.

2.3.2 Facteurs de virulence

Les îlots de pathogénicité (SPI)

Les îlots de pathogénicité (SPI) de *Salmonella* spp. sont définis comme de larges ensembles de gènes sur le chromosome des salmonelles qui sont requis pour la virulence bactérienne (Marcus *et al.*, 2000). Ces SPI ont été acquis via un transfert horizontal par phages ou par plasmides, d'origine inconnue, et sont hautement conservés à travers les différents sérovars de salmonelles. Au total, 5 îlots de pathogénicité (SPI) ont été identifiés. SPI-1 est requis pour la pénétration des cellules de l'épithélium intestinal, soit l'étape de l'invasion. Les SPI-2, 3 et 4 sont requis pour la

croissance et la survie bactérienne à l'intérieur de l'hôte, plus particulièrement lors de la phase systémique de l'infection. Récemment, les facteurs de virulence codés par le SPI-5 ont été identifiés. Ceux-ci semblent être impliqués dans l'inflammation et la sécrétion d'ions, ce qui correspond à la phase entérique de la maladie (Ochman et Groisman, 1996 ; Lucas et Lee ; 2000 ; Marcus *et al.*, 2000).

Lipopolysaccharides

Le LPS, aussi nommé endotoxine, est une composante importante de la membrane externe des salmonelles ainsi que des autres bactéries à Gram négatif (Nikaido et Vaara, 1985). Il est considéré comme un déterminant majeur de la virulence. De façon générale, le LPS intact confère une résistance à la phagocytose, à la bactéricidie par les macrophages et à l'action du complément (Saxen *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1992). Certains LPS de souches de *Salmonella* ont une longue chaîne, ce qui prévient la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) et permet d'éviter la lyse cellulaire. La résistance au sérum est liée à l'expression d'une protéine de la membrane externe, Rck, qui prévient la dernière étape de la formation du MAC. Les souches rugueuses (R), caractérisées par des molécules de LPS incomplètes, sont moins virulentes que les souches lisses (S) qui possèdent un LPS complet. Ce phénomène serait attribuable à la susceptibilité de ces souches à la bactéricidie à l'intérieur des cellules phagocytaires (Clarke et Gyles, 1993).

Les changements systémiques observés dans certaines formes de la salmonellose tels le déclenchement d'une cascade de médiateurs (cytokines, lipides vasoactifs, amines vasoactives, complément, système de coagulation) peuvent être aussi attribués aux LPS (Clarke et Gyles, 1993). En effet, lorsque libérés dans le système sanguin, les LPS provoquent, en favorisant la production de TNF (Tumor necrosis factor), des symptômes de fièvre, d'anorexie, une diminution de la pression sanguine, une réduction de la perfusion des tissus, une neutropénie, un état de choc et parfois la mort (Clarke et Gyles, 1993).

Récemment, certains gènes activés par PhoP ont été associés à des modifications de la structure de la membrane externe, notamment des changements au niveau de la portion lipide A du LPS. Ces modifications peuvent en partie être responsables de l'augmentation de la résistance aux peptides cationiques antimicrobiens et de la diminution de la production des cytokines de l'hôte, contribuant ainsi à la survie intracellulaire (Ernst *et al.*, 1999). En effet, il a été démontré que la modification du lipide A réduit l'expression des molécules d'adhésion E-sélectine chez les cellules endothéliales humaines et réduit la production de TNF- α par les monocytes humains (Guo *et al.*, 1997). Les peptides antimicrobiens sont des composantes importantes du système immunitaire de l'hôte. Ils altèrent les membranes externes des bactéries à Gram négatif via des interactions électrostatiques (Nicolas et Mor, 1995). Les pathogènes se protègent donc de cette attaque en modifiant leur surface cellulaire pour prévenir cette interaction électrostatique. Des études récentes ont démontré le rôle de PhoP dans la régulation des modifications structurales du lipide A, la composante du

LPS qui stimule la libération de cytokines. Ces travaux ont démontré que la croissance bactérienne en présence de faible concentration de magnésium provoque l'addition d'un aminoarabinose, d'un 2-hydroxymyristate et d'un palmitate au lipide A du LPS (Guo *et al.*, 1997). Ces changements dans la structure du lipide A sont médiés par PhoP/PhoQ et ont des conséquences fonctionnelles significatives: l'ajout d'un aminoarabinose sur le LPS entraîne une augmentation de la résistance à la polymyxine.

Mobilité

L'invasion par les salmonelles peut aussi être influencée par la mobilité du micro-organisme. Celle-ci permet à la bactérie de se déplacer activement vers les cellules de l'hôte. La mobilité, assurée par la présence de flagelles, semble être un facteur important dans l'invasion par certaines salmonelles, mais pas pour tous les sérovars de salmonelles. En fait, la présence de flagelles augmente les chances que le micro-organisme puisse entrer en contact avec les cellules épithéliales. Des études ont démontré que des souches ayant des flagelles polaires avaient plus de chances d'entrer en contact et d'envahir les cellules épithéliales que les souches ayant des flagelles péritriches (Jones *et al.*, 1992). De plus, d'autres études ont démontré que des mutants non mobiles de *S. Typhimurium* étaient incapables de pénétrer à l'intérieur des cultures cellulaires (Betts et Finlay, 1992).

Sidérophores et "heat-shock-proteins"

Le fer est essentiel à la multiplication bactérienne étant donné sa fonction de co-facteur d'enzymes impliqué dans des voies de biosynthèses importantes, telle la biosynthèse de l'ADN (ridonucléoside réductase). L'hôte limite la disponibilité de cet élément dans le sang en utilisant par exemple, la transferrine, une protéine de liaison du fer pour lequel elle possède une forte affinité. D'autre part, certaines bactéries produisent des chélateurs de fer appelés sidérophores, qui possèdent également une forte affinité pour le fer. Ces sidérophores (entérocholine et aéro bactéine) synthétisés par les bactéries sont excrétés dans les liquides biologiques de l'hôte et lient le fer. Le fer est ensuite rendu disponible pour la bactérie grâce à des récepteurs protéiques spécifiques aux sidérophores situés sur la membrane externe des bactéries. Ces récepteurs sont produits en réponse à une faible concentration de fer (Clarke et Gyles, 1993). Un sidérophore a été identifié chez *S. Typhimurium*: l'entérobactine (Benjamin *et al.*, 1985). Cependant, cette protéine ne semble pas nécessaire à la virulence.

Les "heat-shock-proteins" (HSP) sont des protéines produites en conditions de stress et qui sont synthétisées par tous les types de cellules. Elles agissent comme chaperonine moléculaire dans les processus physiologiques (Seat-Wan Tang *et al.*, 1997). Plusieurs HSP microbiennes semblent être impliquées dans la pathogénie et agissent comme antigènes immunodominants chez plusieurs micro-organismes pathogènes. Elles sont capables d'activer le système immunitaire de l'hôte, notamment par la production d'anticorps. *S. Typhimurium* synthétise une trentaine de protéines lors d'un stress environnemental, par exemple à l'intérieur des macrophages. Deux

d'entre elles sont des HSP, soient GroEL et DnaK. Les mutants qui ne peuvent produire ces HSP sont moins virulents chez la souris et ne survivent pas bien dans les macrophages (Falkow et Mekalanos; 1990). Des études ont démontré que des mutants avirulents, sensibles à l'action des macrophages, produisent des HSP mais ne synthétisent pas certaines protéines normalement produites à l'intérieur des macrophages. Ces observations indiquent que ces protéines sont importantes dans la survie intracellulaire (Buchmeier et Heffron, 1990).

Plasmide de virulence

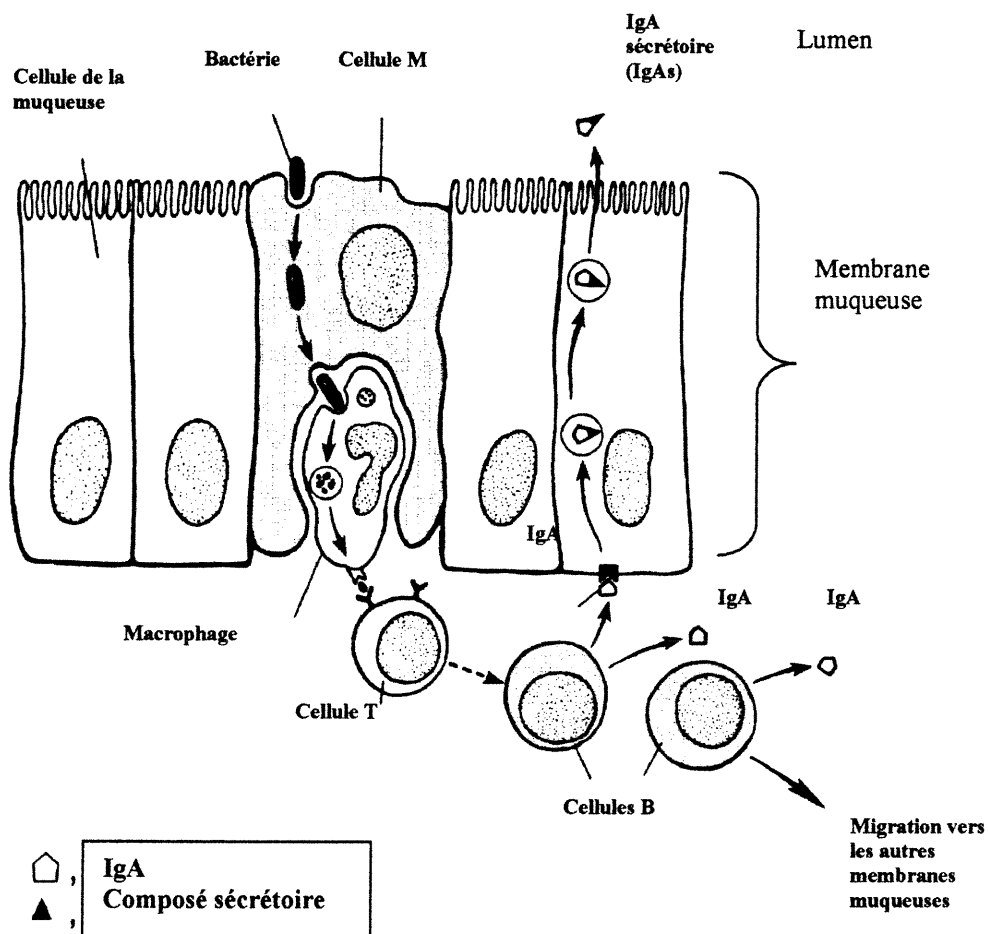
Plusieurs souches de *Salmonella* spp. portent de larges plasmides de 50-100kb (Roof *et al.*, 1992; Jones et Falkow, 1996) qui ont été associés à la virulence (Gulig, 1990). Des études antérieures indiquent que les plasmides portent des gènes liés à l'invasion (Jones *et al.*, 1982). Cependant il a été démontré que le plasmide n'était pas requis pour l'entrée dans les cellules mais bien pour la persistance des salmonelles dans le système réticulo-endothélial (Gulig et Curtiss, 1987). La perte de ce plasmide réduit la virulence chez la souris de façon substantielle. La bactérie continue d'envahir les plaques de Peyer mais n'est pas retrouvée en grand nombre dans le foie et la rate. La région hautement conservée de ces plasmides contient 5 gènes qui sont désignés *spvRABCD*. Comme pour les autres gènes de virulence, l'expression des gènes du plasmide de virulence est régulée par les conditions environnementales. Toutefois, le rôle précis du plasmide de virulence demeure encore obscur (Guilloteau *et al.*, 1996).

2.3.3 Interactions des salmonelles avec les cellules épithéliales

Les mécanismes par lesquels les salmonelles pénètrent l'épithélium intestinal et survivent à l'intérieur des cellules de l'hôte sont généralement étudiés chez la souris (Finlay et Brumell, 2000). Les modèles *in vitro* d'infection à *S. Typhimurium* ont permis d'approfondir les connaissances sur la génétique, la biologie cellulaire et l'analyse biochimique des différentes étapes de l'infection. En utilisant des cultures cellulaires, des données sur les interactions entre les salmonelles et les cellules épithéliales ou les macrophages ont aussi été générées. Cependant, il demeure évident que ces modèles ne reflètent pas entièrement la situation *in vivo*. Toutefois, les études *in vitro* portant sur l'étape d'invasion des cellules par les salmonelles ont généré des données similaires à celles décrites dans les modèles *in vivo* chez différentes espèces animales (Jones *et al.*, 1994). Chez la plupart des hôtes, *S. Typhimurium* envahit les entérocytes (Reed *et al.*, 1986; Watson *et al.*, 1995) et les cellules M (Clark *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994; Pascopella *et al.*, 1995). Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées retrouvées dans les plaques de Peyer, particulièrement au niveau de l'iléon. Ces cellules M jouent un rôle important qui consiste à capter les bactéries par endocytose, à partir de la lumière intestinale, pour ensuite les expulser par exocytose dans le chorion où elles seront captées par des macrophages et présentées au tissu lymphoïde pour stimuler une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire. L'invasion s'effectue très rapidement, soit environ 15 minutes après l'inoculation (Jones *et al.*, 1996) (figure 2.2).

Figure 2.2. Invasion de la muqueuse intestinale par les salmonelles.

(Adapté de Salyers *et al.*, 1994)



L'attachement aux cellules M semble être médié par des adhésines de type fimbriaire tels le fimbriae LP (long polar) et le fimbriae de type 1. Ceux-ci permettent l'attachement des bactéries aux cellules hôtes (Bäumler *et al.*, 1997). Des mutations dans les opérons *lpf* (long polar fimbriae) et *flm* (fimbriae de type 1) réduisent l'entrée de *S. Typhimurium* dans les cellules en culture (Ernst *et al.*, 1990; Bäumler *et al.*,

1996). Ces facteurs semblent augmenter l'invasion; toutefois, ils ne sont pas requis. Le récepteur cellulaire de ces adhésines au niveau des cellules de l'hôte demeure toutefois encore inconnu (Lockman et Curtiss, 1992; Bäumlér *et al.*, 1996).

Suite à l'adhésion aux cellules M et aux entérocytes, l'invasion implique la dégradation des microvillosités cellulaires et des modifications dans le cytosquelette des cellules de l'hôte afin de permettre la pénétration des salmonelles dans les cellules. Ce phénomène est appelé « ruffling » à cause d'une apparence d'ondulations membranaires observée chez la cellule hôte déformée. Ce réarrangement des filaments d'actine de la surface cellulaire mène à l'internalisation des salmonelles dans de larges vacuoles qui ressemblent à des macropinosomes (Finlay et Brumell, 2000).

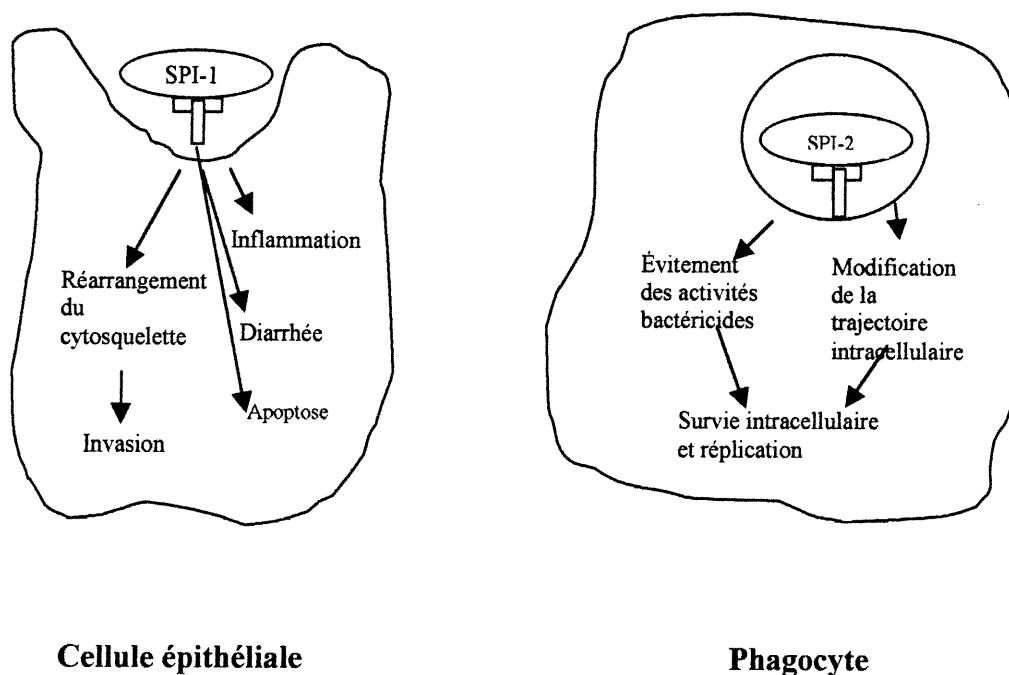
Ce réarrangement du cytosquelette observé en culture cellulaire est relié à une augmentation des niveaux de calcium libre intracellulaire (Pace *et al.*, 1993). Les ions calcium activent certaines protéines de liaison de l'actine qui sont impliquées dans la redistribution des filaments d'actine (Stossel, 1993; Clark *et al.*, 1994). Des études antérieures ont relaté que *Salmonella* spp. pouvait déclencher ces ondulations membranaires par l'activation du récepteur cellulaire EGF (epidermal growth factor). Cette constatation était basée sur le fait que ce récepteur EGF des cellules Henle-407 était phosphorylé suite à l'infection des cellules par les salmonelles (Galan *et al.*, 1992). Comme les salmonelles, le EGF est connu pour stimuler des ondulations membranaires cellulaires typiques. Malgré certaines similarités entre les réponses cellulaires au EGF et l'invasion par salmonelle, certaines observations indiquent que ce récepteur cellulaire EGF n'a pas un rôle primaire dans l'internalisation des salmonelles dans les cellules.

En effet, ces micro-organismes envahissent tout de même les cellules qui n'expriment pas de récepteur EGF (Francis *et al.*, 1993; McNeil *et al.*, 1995).

Certains autres facteurs bactériens sont requis pour permettre l'invasion des cellules par les salmonelles. Certaines protéines des salmonelles qui perturbent la transduction du signal des cellules hôtes sont des actrices principales de l'invasion bactérienne. Ces protéines sont transférées directement à l'intérieur des cellules hôtes via des systèmes d'exportation nommés systèmes de sécrétion de type III (SSTT). Plusieurs micro-organismes pathogènes, à Gram négatif, possèdent ces systèmes de sécrétion de type III hautement homologues. La fonction principale des SSTT est de coordonner la sécrétion et la translocation de séries de protéines effectrices dans les cellules eucaryotes cibles. *Salmonella* spp., possède deux SSTT bien distincts, qui sécrètent des protéines effectrices associées à la virulence et qui contribuent à des étapes différentes du processus infectieux (Marcus *et al.*, 2000). Le premier système de sécrétion de type III (SSTT-1) est associé à l'invasion des cellules et est spécialisé dans les événements de la phase entérique de la maladie, permettant au pathogène de pénétrer la barrière épithéliale *in vitro* et *in vivo* (Galan et Curtiss, 1989). Le second système de sécrétion de type III (SSTT-2) est impliqué dans les étapes de la survie intracellulaire des salmonelles (figure 2.3). Ces systèmes de sécrétion sécrètent des protéines effectrices associées à la virulence. Celles-ci sont subdivisées en deux groupes soient les protéines translocatrices et les protéines effectrices transloquées. Les protéines translocatrices sont essentielles pour la translocation des protéines effectrices sécrétées à travers la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (Marcus. *et al.*, 2000)

Le premier système de sécrétion, est encodé à l'intérieur de l'îlot de pathogénicité 1 des salmonelles (SPI-1) et délivre une variété d'environ 30 protéines. Celles-ci incluent des protéines de régulation, des composantes structurales du SSTT, des protéines sécrétées et leurs chapronines (Wallis et Galyov, 2000). Plusieurs protéines effectrices telles les protéines Sip (*Salmonella* invasion proteins) et Sop (*Salmonella* outer proteins) permettent l'internalisation du pathogène en induisant le réarrangement des filaments d'actine (Galyov *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1999). En plus de son rôle au niveau de l'invasion des cellules, le système de sécrétion de type III sur SPI-1 est impliqué dans certains autres aspects de la pathogénie des salmonelles, notamment dans l'induction de la réponse inflammatoire de l'hôte, caractérisée par la production de cytokines pro-inflammatoires, la sécrétion d'ions caractérisée par la diarrhée et finalement par l'apoptose (figure 2.3). Ces protéines effectrices interagissent directement avec le système de signalisation des cellules hôtes, indépendamment des interactions adhésines-récepteurs à la surface des cellules (Collazo et Galan, 1997; Brumell *et al.*, 1999).

Figure 2.3 Interactions des salmonelles avec les cellules hôtes et implication des deux différents systèmes de sécrétion de type III. SPI-1 est impliqué dans les étapes de l'invasion alors que SPI-2 est impliqué dans la survie intracellulaire des salmonelles (adapté de Hensel, 2000)



Une fois à l'intérieur des cellules épithéliales, les salmonelles se répliquent à l'intérieur d'une vacuole et bouleversent le processus classique de l'endocytose qui consiste en une libération du matériel endocyté aux endosomes précoces qui se transforment en endosomes matures (Méresse *et al.*, 1999). Ces derniers ont des récepteurs mannose 6-phosphate (M6PR), des glycoprotéines de la membrane des lysosomes (Lgp) et d'autres protéines intégrales de la membrane, qui permettent la fusion avec les lysosomes secondaires (Mellman, 1996). À l'opposé, les salmonelles demeurent dans la vacuole (SCV, *Salmonella*-containing-vacuole) qui interagit de façon transitoire avec les endosomes précoces. Cependant, ces SCV n'interagiront pas par la

suite avec le système endosomal et ne se fusionneront pas avec les lysosomes, mais semblent entrer en contact avec un compartiment non entièrement caractérisé appelé Rab7 qui contribue à libérer les Lgp (glycoprotéines de type lysosomal) à la SCV (Méresse *et al.*, 1999). Quelques heures après l'internalisation des salmonelles, des structures filamenteuses inhabituellement riches en ce type de glycoprotéines sont formées et constituent un prolongement de la membrane de la vacuole (Garcia del Portillo *et al.*, 1993; Mills et Finlay, 1994). L'apparition de ces filaments induits par les salmonelles (Sif, *Salmonella*-induced filaments) dans les cellules de l'hôte correspond à l'étape de réplication bactérienne (Garcia del Portillo *et al.*, 1993). Il semble que la réplication des salmonelles soit nécessaire pour la formation de ces filaments. Toutefois, le rôle de ces structures filamenteuses dans la pathogénie des infections à salmonelles demeure encore inconnu (Finlay et Brumell, 2000).

2.3.4. Interactions des salmonelles avec les cellules phagocytaires

Le processus par lequel *Salmonella* progresse à l'intérieur des cellules a été observé autant dans les cellules épithéliales (Garcia-del Portillo et Finlay, 1995) que dans les macrophages en culture (Mills et Finlay, 1998). Toutefois, ce mécanisme demeure encore méconnu. Des variations entre les différentes études effectuées à ce jour par diverses équipes de recherches peuvent être attribuables à l'utilisation de lignées cellulaires de macrophages différentes, de leur niveau d'activation respectif, de la souche utilisée ainsi que de son stade de croissance. Un concept unanime a émergé de ces études, indiquant qu'on observe une circulation intracellulaire particulière des SCV et que la capacité des salmonelles à induire ce phénomène est essentiel à la

pathogénie, probablement pour leur permettre de survivre et de se multiplier (Kingsley et Bäumlér, 2000).

Suite au passage des salmonelles à travers les entérocytes et les cellules M vers la *lamina propria*, les salmonelles rencontrent les macrophages, les lymphocytes et les leucocytes polymorphonucléaires (PMN), ces derniers étant récemment infiltrés au site d'entrée des salmonelles (Wallis *et al.*, 1986). Selon le sérovar impliqué et l'hôte infecté, les salmonelles peuvent établir une infection locale dans la *lamina propria* qui mène à la diarrhée et la fièvre (Miller *et al.*, 1995). Toutefois, les sérovats spécifiques d'espèce voyagent via le système lymphatique et le système sanguin afin de se disséminer de façon systémique entre autres vers le foie et la rate. Cette dissémination peut s'effectuer via les macrophages infectés dans lesquels les salmonelles survivent et se multiplient (Gulig, 1996).

Les salmonelles sont capables de pénétrer à l'intérieur des macrophages de différentes façons, notamment par la phagocytose classique et par macropinocytose. *S. Typhimurium* se retrouve donc à l'intérieur d'un compartiment membranaire (SCV). Les bactéries sont capables de survivre et de se répliquer à l'intérieur de cette vacuole et ensuite de tuer cette cellule hôte infectée et se retrouver dans le milieu extracellulaire (Fields *et al.*, 1986). Plusieurs facteurs ont été identifiés chez *S. Typhimurium* et sont requis pour la survie et la répllication dans les cellules de l'hôte et pour causer la maladie (Groisman et Ochman, 1997; Salama et Falkow, 1999). Ces facteurs sont, entre autres, la biosynthèse des nutriments à l'intérieur de la SCV (Hoiseith et Stocker, 1981),

la résistance aux réactifs intermédiaires oxygénés et azotés (Fang *et al.*, 1999; Lundberg *et al.*, 1999) et la réparation de l'ADN endommagé (Buchmeier *et al.*, 1993).

Le second système de sécrétion de type III, encodé sur l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2), est particulièrement impliqué dans la survie intracellulaire des salmonelles (Ochman et Groisman, 1996). La propriété des salmonelles à induire la macropinocytose requiert un système de sécrétion protéique de type III, contact-dépendant, qui transfère les protéines bactériennes sécrétées à l'intérieur de la cellule hôte (Hardt *et al.*, 1998). Les observations sur l'expression des gènes SPI-2 et la sécrétion par un SSTT suggèrent que le système PhoP/PhoQ agit comme un système global pour la régulation des gènes de virulence des salmonelles (Miller, 1989). SPI-2 appartient donc à un groupe de gènes requis pour la survie intracellulaire des salmonelles qui sont activés par PhoP/PhoQ suite à leur entrée dans les macrophages. PhoP et PhoQ font partie des systèmes de régulation à deux composantes qui permettent aux bactéries de détecter et de répondre aux conditions environnementales en altérant l'expression de certains gènes (Miller *et al.*, 1989). Plus spécifiquement, PhoQ est une protéine membranaire avec une activité histidine kinase qui répond au signal environnemental en transférant un phosphate à la région N-terminale de PhoP. Lorsque PhoP est phosphorylé, il se lie à des promoteurs spécifiques pour induire ou réprimer l'expression de plus de 40 gènes. Des études sur la régulation des gènes activés par PhoP, chez *S. Typhimurium*, ont démontré que l'activité de kinase de PhoQ pouvait être réprimée par une augmentation de la concentration des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} (Garcia *et al.*, 1996). La liaison de ces cations à PhoQ pourrait causer des changements de conformation de la protéine, permettant de réduire l'activité de kinase

et la répression de l'expression des gènes activés par PhoP. Les produits des gènes activés par PhoP jouent un rôle important dans certains aspects de la pathogénie des infections à salmonelles, notamment dans la survie bactérienne, dans l'induction de la formation de la vacuole SVC, dans l'augmentation de la résistance aux peptides cationiques antibactériens de l'hôte ainsi que dans la résistance à une baisse de pH (Ernst *et al.*, 1999).

En résumé, les conditions expérimentales requises pour affecter ou favoriser l'expression des gènes des systèmes de sécrétion de type III, au niveau de SPI-1 et SPI-2 sont très différentes. En fait, l'expression des gènes au niveau de SPI-1 est augmentée par des conditions limitantes en oxygène, lorsque l'osmolarité est élevée et à la fin de la phase de croissance exponentielle (Bajaj *et al.*, 1996). Ces indices environnementaux reflètent les conditions rencontrées par *S. Typhimurium* dans le lumen intestinal. À l'opposé, l'expression des gènes du SSTT au niveau de SPI-2 est induite suite à une carence nutritionnelle, laquelle reflète la situation à l'intérieur du phagosome de la cellule hôte (Marcus *et al.*, 2000).

2.3.5 Résistance de l'hôte aux infections à *Salmonella*

En plus des différents facteurs de virulence que possède chaque souche de salmonelle, la résistance de l'hôte doit aussi être considérée dans le développement de l'infection et/ou de la maladie clinique. Le système immunitaire fonctionne à travers une série d'interactions humorales et cellulaires en réponse à l'envahissement par un agent étranger (Sell, 1987). Différents mécanismes de résistance sont impliqués.

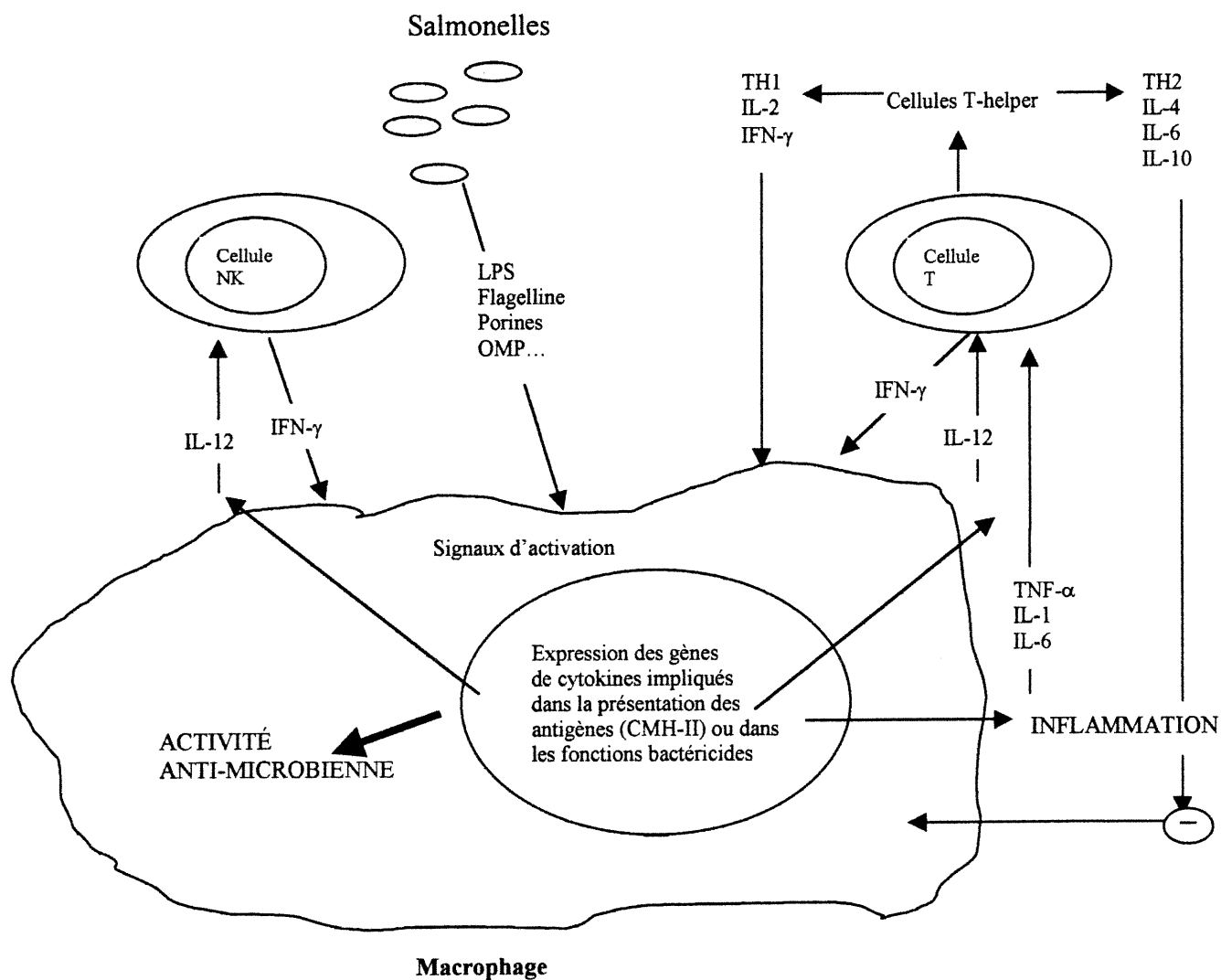
Les mécanismes de défense naturels regroupent le système du complément, les phagocytes et les barrières chimiques, physiques et microbiennes des différentes surfaces du corps (Mold, 1999). Les cellules phagocytaires sont impliquées dans l'ingestion et la dégradation des débris étrangers et dans la protection non spécifique de l'hôte. En fait, les phagocytes sont en première ligne lors de la défense de l'hôte contre les salmonelles. Cette réponse requiert la migration dirigée des phagocytes au site d'infection, l'attachement, l'ingestion des micro-organismes, la stimulation de la flambee respiratoire, la fusion phagosome-lysosome, la dégradation des micro-organismes et à la présentation des antigènes au système immunitaire. Malgré le fait que ces cellules parviennent à détruire un grand nombre de bactéries envahissantes, les salmonelles résistent à la bactéricidie par les phagocytes (Roof, 1989).

La réponse immunitaire aux infections à salmonelles comporte différentes phases. Dans un premier temps, l'élimination rapide de la majeure partie des bactéries ingérées est visée. Par la suite, le système immunitaire doit limiter la croissance exponentielle des bactéries restantes dans le système réticulo-endothéliale (SRE), principalement les cellules mononuclées et les leucocytes polymorphonucléaires (PMN). Cette maîtrise de la croissance exponentielle dans le SRE se caractérise par une phase dans laquelle les macrophages et les cellules NK (natural killer) sont les cellules effectrices, ayant l'IFN- γ et le TNF- α comme médiateurs. Finalement, les micro-organismes retrouvés au niveau des tissus sont éliminés suite à la participation du système immunitaire

spécifique, des cellules T-dépendantes et par les mécanismes liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Lalmanach et Lanthier, 1999) (figure 2.4).

Les fonctions du système immunitaire sont influencées par des molécules spécifiques: les cytokines. Plusieurs cytokines possèdent la capacité de provoquer la migration des cellules immunitaires, leur prolifération, leur activation et le déclenchement des activités antimicrobiennes (Liles et VanVoorhis, 1995). Une variété de produits bactériens de *Salmonella* spp. sont des inducteurs potentiels de l'expression des cytokines par les cellules immunitaires (Wilson et al., 1998).

Figure 2.4 Cytokines, signaux et résistance aux infections à salmonelles-Rôle central des macrophages (Adapté de Lalmanach et Lanthier, 1999).



En résumé, lorsque les phagocytes mononucléaires rencontrent les bactéries ou les produits bactériens tels les LPS, ils ont un rôle central dans la résistance aux infections à salmonelles. Ils sont ensuite activés, ce qui leur permet de réagir au processus infectieux. Ceci s'applique plus spécifiquement à ceux portant l'allèle de résistance du gène *Nrampl* (Natural resistance associated macrophage protein 1). Cette réaction,

débutant par la phagocytose, peut être médiée par l'expression de certains gènes, tels les gènes d'expression des cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α , ou IL-12), des gènes impliqués dans la présentation des antigènes (CMH de classe II) et/ou dans les fonctions bactéricides (flambée respiratoire). L'expression de certains gènes se traduit par une activité anti-microbienne accrue des macrophages avec la collaboration de l'IFN- γ produit par les cellules NK et/ou les cellules Th1 (T-helper type 1). L'activation des macrophages peut cependant être contrôlée négativement par l'IL-10 produit par les cellules Th2 (T-helper type 2). L'IL-10, étant antagoniste de l'effet de l'IFN- γ sur les macrophages et donc inhibiteur de la réponse bactéricide de l'hôte, cette cytokine pourrait être impliquée dans la susceptibilité de l'hôte aux infections à salmonelles (Pie *et al.*, 1996).

La flambée respiratoire à l'intérieur des macrophages génère donc des réactifs d'oxygène et d'azote (oxyde nitrique) tels les chloramines, les radicaux hydroxyles et peroxyde d'hydrogène, lesquels sont convertis en acide hypochloré, un composé fortement oxydant (Hassett et Cohen, 1989). Plus précisément, les radicaux superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$) et les radicaux oxyde nitrique ($\text{NO}\bullet$) peuvent réagir pour former le peroxy-nitrite (OONO^-), ce composé ayant une puissante activité anti-microbienne. La fonction du superoxyde dismutase que possède les salmonelles est non seulement de dégrader les radicaux superoxyde mais aussi de prévenir la formation du peroxy-nitrite, conférant ainsi une protection de la cellule bactérienne face à la bactéricidie (De Groote *et al.*, 1997).

La seconde composante du système immunitaire est l'immunité humorale spécifique, qui correspond à la production d'anticorps par les lymphocytes B. Les anticorps contribuent à la protection de l'hôte de différentes façons, soient par une agglutination des agents infectieux qui contribue à augmenter la phagocytose, à neutraliser les toxines, à bloquer l'attachement bactérien, à opsoniser les bactéries et à favoriser l'initiation d'une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Sell, 1987).

Les antigènes protéiques sont T-dépendants, la formation et la maturation des anticorps est sous la dépendance des cellules B et T. Les épitopes immunogènes sont présentés aux lymphocytes par les cellules présentatrices d'antigènes en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (Sell, 1987). Les cellules Th activées expriment alors une molécule gp39 qui reconnaît spécifiquement le CD40 sur les cellules B. Cette interaction libère alors des signaux d'activation aux cellules B. De plus, les lymphocytes Th sécrètent des cytokines qui permettent d'amplifier la réponse humorale, pour induire la prolifération des cellules B, la sécrétion d'anticorps et la formation des différents isotypes d'immunoglobulines. Les cellules B stimulées poursuivent ensuite leur maturation dans les centres germinaux des follicules lymphoïdes et se développent en cellules sécrétrices d'anticorps ou en cellules mémoires. Les anticorps produits contre les antigènes protéiques sont de forte affinité. Les antigènes T-indépendant induisent une réponse immunitaire sans la participation des cellules Th antigène-spécifique. La plupart de ces antigènes sont des polysaccharides (LPS), des glycolipides et des acides nucléiques qui se lient efficacement aux immunoglobulines sur les cellules B afin d'induire une production

d'anticorps optimale. Les anticorps ainsi générés sont de faible affinité, appartiennent en majorité à la classe des IgM et les cellules B activées ne se différencient pas en cellules mémoires.

Les anticorps dirigés contre *Salmonella* spp. sont présents dans le sérum à la suite d'une exposition à cet agent pathogène. Les cellules entières tuées et plusieurs antigènes de *Salmonella* spp., notamment les LPS (Jimenz-Lucho et Leive, 1990) et les protéines (Saxen *et al.*, 1986; Udhayakumar et Muthkharuppan, 1987; Foulaki *et al.*, 1989) induisent la production d'anticorps. Il a aussi été démontré que le LPS est un agent immunomodulateur qui augmente la réponse immunitaire des antigènes T-dépendant (Ness *et al.*, 1976).

L'importance de l'immunité humorale dans la protection des infections à *Salmonella* spp. a été soulignée par Eisenstein et Sultzer (1983). Les expériences de protection menées chez la souris ont démontré une meilleure survie suite à l'infection expérimentale, une augmentation de la durée de la survie et une protection passive contre des souches homologues. De plus, des évidences suggèrent que des anticorps spécifiques dans le colostrum de vaches vaccinées avec *Salmonella* peuvent interagir avec les micro-organismes dans le lumen de l'intestin des veaux et permettent d'influencer le développement de l'infection (Royal, 1968). Le taux d'anticorps spécifiques dans le sérum ne semble pas cependant être en corrélation avec la protection de bovins infectés expérimentalement suite à une vaccination avec un mutant vivant atténué ou des préparations dénaturées par la chaleur de *Salmonella* spp. (Habasha, 1981; Lindberg et Robertsson, 1983). De plus, les animaux infectés ou immunisés avec

Salmonella ne développent pas tous un titre d'anticorps contre cet agent pathogène, même s'ils démontrent une augmentation de leur survie à une infection expérimentale subséquente. Des anticorps dirigés contre les antigènes O des *Salmonella* non typhoïdes ont semblé conférer une protection contre une infection subséquente (Robbins *et al.*, 1992). Une protection croisée a aussi été démontrée pour *S. Typhimurium* et *S. Dublin*. Elle peut être attribuée à des composés antigéniques O communs et à certains antigènes protéiques de type porines (Habasha, 1981; Lindberg et Robertsson, 1983).

La production d'IgA sécrétoires à la surface des muqueuses sont d'une importance capitale afin d'éliminer les agents pathogènes tels les salmonelles, particulièrement dans les premières étapes de l'infection. Tout au long de la vie, les muqueuses sont continuellement exposées à des antigènes. La plupart des maladies infectieuses se développent au niveau des surfaces muqueuses, et pour la plupart des micro-organismes, elles sont limitées à ces sites. Pour combattre cette menace constante, les vertébrés ont développé un système immunitaire mucosal complexe qui permet de limiter les infections sans interférer avec les fonctions du tissu mucosal (Klein, 1989).

La réponse en anticorps au niveau des muqueuses face aux antigènes de *Salmonella* a été démontré chez le porc suite à l'infection expérimentale (Gray *et al.*, 1995) et à la vaccination (Stabel *et al.*, 1993). Cependant, aucune étude n'a pu démontrer une corrélation entre la résistance aux infections à *Salmonella* chez le porc et la présence d'anticorps au niveau des muqueuses, et ce, malgré l'importance de l'immunité mucosale (Gray *et al.*, 1996).

L'importance relative de l'immunité humorale par rapport à la réponse immunitaire à médiation cellulaire suite aux infections à *Salmonella* spp. demeure cependant encore controversée. Ce débat persiste et réside dans le fait que cet agent pathogène a la capacité de survivre autant dans l'environnement intracellulaire qu'extracellulaire. Les données disponibles suggèrent donc que les deux types d'immunité sont nécessaires et importants pour la résistance aux infections à *Salmonella* spp. À l'heure actuelle, il existe un manque d'information en ce qui a trait à la réponse immunitaire du porc suite à une infection à *Salmonella* spp.

Susceptibilité de l'hôte aux infections à *Salmonella* spp.

La susceptibilité aux infections causées par les bactéries à Gram négatif est largement déterminée par la réponse immunitaire innée envers le LPS. Depuis quelques années, plusieurs équipes de chercheurs étudient les facteurs génétiques de l'hôte responsables de la résistance naturelle aux maladies infectieuses et la susceptibilité de l'hôte aux agents pathogènes intracellulaires (Bellamy, 1999).

Plusieurs gènes, chez la souris, affectant la résistance à une infection à *Salmonella* spp. ont été étudiés. Parmi ces gènes, on retrouve les gènes *Ity*, pour la réponse immunitaire à *S. Typhimurium*, le gène *xid*, pour l'immunodéficiance liée au chromosome X et codant une protéine kinase intracellulaire (BTK, Burton's tyrosine kinase), ayant un rôle dans l'apoptose, et le gène *Lps*, pour la réponse au LPS bactérien. Le produit du gène *Lps* est le Toll-like receptor-4 (TLR-4), qui a une action régulatrice

sur la réponse immunitaire au LPS (Malo *et al.*, 1994; Poltorak *et al.*, 1998 ; Quresni *et al.*, 1999). Ces récepteurs protéiques Toll sont jumelés à un système de signalisation intracellulaire, qui permet l'activation de gènes impliqués dans le système de défense inné de l'hôte (Means *et al.*, 2000).

La survie des animaux lors de la première phase de l'infection, avant le développement de l'immunité spécifique acquise, dépend de leur résistance naturelle. Celle-ci contrôle la croissance exponentielle précoce des salmonelles dans les macrophages du système réticulo-endothélial. Cette résistance naturelle ou innée est sous le contrôle du gène *Nramp1* du locus *Ity/Lsh/Bcg* situé sur le chromosome 1. Ces derniers sont impliqués dans la résistance aux pathogènes intracellulaires *Mycobacterium bovis*, *Leishmania donovani* et *Salmonella Typhimurium* respectivement (Blackwell, 1989). Une mutation dans un allèle de ce gène détermine la susceptibilité à l'infection avec des pathogènes intracellulaires. *In vitro*, l'expression du gène *Nramp1* peut être induite par l'IFN- γ et le LPS chez des macrophages de souris en culture ainsi qu'*in vivo* suite à une injection intrapéritonéale chez la souris (Govoni *et al.*, 1997). Ce gène *Nramp1* a aussi été décrit chez diverses espèces animales telles le mouton, le bovin, la volaille et le porc (Feng *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Busmann *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998). Toutefois, même si la structure du produit du gène *Nramp1* a été bien caractérisée comme étant une protéine membranaire étroitement liée à la famille des transporteurs de cations, sa fonction précise demeure encore inconnue (Lalmanach et Lanthier, 1999). Ce gène influence la réplication intracellulaire de ces parasites dans les macrophages (Vidal *et al.*, 1995). Le gène *Nramp1* code notamment

pour une protéine membranaire, exprimée exclusivement dans les macrophages, monocytes et leucocytes polymorphonucléaires. La protéine est localisée dans le compartiment endosome-lysosome des macrophages et est rapidement acheminée vers la membrane du phagosome contenant la particule étrangère lors de la phagocytose (Govoni et Gross, 1998). Cette protéine semble jouer un rôle de transporteur de fer (Searle *et al.*, 1998) et semble affecter la réplication des parasites intracellulaires en altérant l'environnement intravacuolaire du phagosome contenant le microbe (Gruenheid *et al.*, 1997).

En plus de ce gène de résistance, des gènes liés à la production de cytokines, ainsi que des gènes d'expression des récepteurs de cytokines sont aussi impliqués dans la résistance de l'hôte à l'infection par les salmonelles (DeJong *et al.*, 1998). La réponse précoce en cytokine peut probablement favoriser la différenciation des cellules T subséquentes soit en type 1 (Th1) ou type 2 (Th2). Essentiellement, la réponse en cytokine des Th1, caractérisée par la production d'IL-2 et d'IFN- γ , est nécessaire pour éliminer l'infection par les pathogènes intracellulaires. Des études récentes ont démontré le rôle important de l'IL-12 dans la résistance aux infections à salmonelles. En fait, il a été démontré que suite à une inoculation orale, les salmonelles induisent la production de IL-12 au niveau de la muqueuse ainsi que dans les nœuds lymphatiques mésentériques (Bost et Clements, 1995; Kincy-Cain *et al.*, 1996). Cette cytokine est reconnue pour stimuler la libération de l'IFN- γ , résultant ainsi en une activation des macrophages et une résistance accrue à l'infection par les salmonelles (Ramarathinam *et al.*, 1991).

2.4 Contrôle des infections à *Salmonella* spp.

Malgré d'appréciables efforts pour améliorer le processus d'abattage et limiter la contamination des viandes par des bactéries pathogènes pour l'homme, un nombre significatif de carcasses de porcs sont contaminées par des salmonelles. Il est donc nécessaire de développer des moyens de contrôle de ce micro-organisme chez l'animal vivant afin de réduire le taux de porteurs sains dans la population porcine et ainsi réduire les risques de contamination des viandes lors de l'abattage.

2.4.1 Facteurs de risque

Berends *et al.*, (1997), dans une étude portant sur les facteurs de risque et mesures de contrôle pendant l'abattage des porcs et la transformation de la viande, considèrent l'animal vivant comme le principal facteur de risque associé à la contamination par *Salmonella* spp. Cette étude démontre qu'en fin d'engraissement, dans les élevages contaminés, la probabilité que des animaux exempts de salmonelles deviennent infectés est de 85%. Dans le cas où les animaux d'un seul enclos sont contaminés, la probabilité que la transmission inter-parc se fasse est de 90% et la propagation de l'infection par le personnel est évaluée à 60%. Outre ces considérations, les principaux autres facteurs de risque identifiés sont le manque d'hygiène à la ferme et, lors du transport, la nourriture contaminée, l'utilisation d'agents antimicrobiens et le stress relié au transport et au jeûne.

Certains autres facteurs de risque ont été identifiés par Tielen *et al.* (1997). Le statut hygiénique des élevages étant un facteur important. La pratique d'élevage en tout plein-tout vide en petite section est une façon de créer un standard hygiénique élevé dans la ferme par le nettoyage et la désinfection de chaque section après la sortie des animaux. *S. Choleraesuis*, peut survivre plusieurs mois dans les matières fécales, ce qui souligne l'importance à apporter à la décontamination de l'environnement afin de réduire la prévalence des salmonelles, particulièrement à la ferme (Gray *et al.*, 1995). Les fermes de grande dimension et la forte densité d'animaux sont deux éléments qui favorisent la propagation et la persistance des salmonelles dans ce type de ferme.

2.4.2 Flores de compétitions

Les fondements de l'utilisation des probiotiques date des années 1900 avec les études de Metchnikoff qui ont alors démontré les effets bénéfiques de l'utilisation des lactobacilles du yogourt pour l'humain (Metchnikoff, 1908). Ce terme probiotique signifie donc « en faveur de la vie » en opposition au terme antibiotique signifiant « contre la vie ».

Ce terme a été proposé par Parker en 1974 pour désigner les micro-organismes et substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. En 1989, les probiotiques ont été redéfini comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'équilibre intestinal (Fuller, 1989).

Actuellement, les probiotiques sont connus comme étant des bactéries lactiques sélectionnées, souvent composés de souches de *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus faecium* ou de souches de *Bacillus* spp. Ils sont utilisés dans les aliments en forte dose et pendant de longues périodes afin de prévenir les désordres digestifs et augmenter les performances zootechniques (Vanbelle *et al.*, 1990). D'autres auteurs définissent les probiotiques comme étant des bactéries intestinales naturelles qui, après inoculation par voie orale chez un individu, sont capables de s'établir, de coloniser le tube digestif et de stabiliser la flore normale du tube digestif pour prévenir la colonisation par des organismes pathogènes (Fuller et Gibson, 1997).

Les connaissances de la microflore du tractus digestif sont reliées aux différentes études sur l'écologie microbienne effectuées à ce jour. Grâce à l'utilisation d'animaux de laboratoire axéniques (sans germes), gnotoxéniques (axéniques ayant été inoculés par une flore contrôlée) et holoxéniques (colonisés par une flore normale complexe et inconnue), des progrès considérables ont été apportés dans la compréhension de l'établissement de la microflore. En effet, il ressort de ces études que les micro-organismes colonisent le tractus digestif des animaux nouveau-nés selon une dynamique particulière d'une espèce animale à l'autre appelé séquence d'établissement (Tannock, 1988). Lors de la colonisation, les micro-organismes s'établissent sous la forme de populations en équilibre, créant ainsi des habitats ou niches le long du tractus digestif. La séquence d'établissement se termine lorsqu'un état d'équilibre s'instaure. Les différences relatives à cet état d'équilibre, selon l'espèce animale, portent essentiellement sur les espèces microbiennes et sur les sites du tractus où nichent les

diverses populations de micro-organismes. Cependant, quelle que soit l'espèce animale, la flore finale constitue alors une population stable et complexe constituée d'environ 10^{12} micro-organismes/g de matières fécales, représentant environ 500 types bactériens différents (Savage, 1977).

À la naissance, quelque soit l'espèce animale, le tube digestif est stérile. La lumière intestinale sera colonisée par la flore environnante et ainsi que par la flore de sa mère. La colonisation est rapide et est complétée en 5 à 6 jours. La colonisation débute généralement par des colibacilles suivi des streptocoques, des bactéries anaérobies et finalement, des lactobacilles. Cette microflore est subdivisée en 3 différents groupes : le groupe principal dominant, la flore accompagnatrice sous-dominante et la flore résiduelle (Vanbelle *et al.*, 1990). Le groupe principal dominant, qui est constitué de plus de 90% de bactéries strictement anaérobies, est principalement composé de bactéries des genres *Bifidus*, *Lactobacillus* et *Bacteroides*. La flore accompagnatrice, environ 1% de la flore totale, est composée d'anaérobies facultatives qui sont représentées par les *Escherichia coli* et les *Enterococcus*. La flore résiduelle (<0,001%) est principalement composée de *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, de levures appartenant à l'espèce *Candida* ainsi que de bactéries avec un pouvoir pathogène potentiel. Il faut cependant souligner qu'une partie de la biomasse de la flore intestinale demeure inconnue (Gedek, 1989). Un équilibre s'établit entre les différentes espèces microbiennes mais il peut varier selon le lieu anatomique (duodénum, iléon, côlon, caecum). On observe une variation de la flore microbienne selon l'âge des animaux. Ceci peut dépendre de nombreux facteurs tels les sécrétions digestives, l'acidité gastrique, les sécrétions biliaires, le péristaltisme intestinal, l'intégrité de la

muqueuse intestinale et de la mucine qui la recouvre. La flore intestinale peut être en outre modifiée par l'alimentation, l'antibiothérapie et par le niveau de stress de l'animal (Savage, 1987; Gedek, 1989).

La période idéale pour l'utilisation des probiotiques chez les mammifères est la période néonatale, plus spécialement lors des 4 premiers jours de la vie. Pendant cette période, le jeune animal est protégé par le colostrum. Puisque le tube digestif est stérile à la naissance, l'administration des probiotiques en nombre important peut jouer un rôle protecteur vis-à-vis des agents pathogènes qui peuvent coloniser le tube digestif (Fuller, 1989). Il en est de même pour la période du sevrage. Puisque l'alimentation est modifiée pendant cette période, la flore sera affectée. Il est donc recommandé de débiter l'administration des probiotiques avant le changement alimentaire, en utilisant des doses importantes pendant 8 à 15 jours, pour favoriser la présence de probiotiques en quantité suffisante dans la lumière intestinale pendant la période du sevrage. L'utilisation de probiotiques comme additif alimentaire est une autre façon de favoriser l'équilibre de la flore intestinale et ce, pendant toute la période de croissance ou même la vie entière de l'animal.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le mode d'action des probiotiques. Toutefois, ce domaine de recherche est encore controversé, et fait l'objet de plusieurs spéculations. Certains mécanismes d'action ont été largement étudiés (Fuller, 1989). Certains proposent que les probiotiques s'opposent à la prolifération des bactéries pathogènes en compétitionnant pour les éléments nutritifs, en produisant des acides organiques (lactiques), des substances antibiotiques (bactériocines), du H₂O₂, ou

en empêchant l'adhésion des bactéries pathogènes. D'autres soutiennent que les probiotiques produisent des métabolites capables de neutraliser les toxines bactériennes "in situ" ou d'inhiber la production de métabolites toxiques. Certains enzymes sont produits et améliorent l'utilisation digestive des aliments ou détoxifient les métabolites nuisibles à la flore. De plus, ils stimulent le système immunitaire de l'hôte (Freter *et al.*, 1983). En fait, Perdigon *et al.* (1995) ont observé que chez des souris holoxéniques ayant ingéré du lait fermenté avec une souche de *L. acidophilus* et une souche de *L. casei*, on observe une augmentation de l'activité phagocytaire et lymphocytaire. De plus, De Simone *et al.* (1992) ont observé une légère augmentation de l'interféron gamma chez des volontaires humains ingérant du yogourt frais. Il est donc possible que des constituants de la membrane externe des cellules microbiennes puissent jouer un rôle important comme immunomodulateurs.

Chez l'espèce porcine, des études d'exclusion compétitive à l'aide de cultures de la flore cécale de porcs adultes ont généré des données intéressantes. Fedorka-Cray *et al.*, (1997) ont noté une réduction considérable de la présence de *Salmonella* Typhimurium dans les tissus des porcelets supplémentés avec ces cultures bactériennes, suagérant que l'utilisation peut être justifiée pour favoriser le contrôle des salmonelles chez le porc.

Une façon indirecte de favoriser une flore de compétition est l'utilisation de prébiotiques. Par définition, ces composés sont des ingrédients alimentaires difficilement digestibles, comprenant entre autres les oligosaccharides, et qui stimulent sélectivement la croissance et/ou l'activité de certaines bactéries présentes dans l'intestin, notamment les bifidobactéries et les lactobacilles. Plusieurs études sur le

mode d'action des prébiotiques ont été effectuées à ce jour. Certaines rapportent l'utilisation de fructooligosaccharides (FOS) chez la volaille (Waldroup *et al.*, 1993; Oyarzabal et Conner, 1996; Chambers *et al.*, 1997), le porc (Howard *et al.*, 1995) et l'humain (Buddington *et al.*, 1996). Des études chez la volaille ont démontré que le FOS, additionné aux aliments, contribue à réduire la colonisation de l'intestin par les salmonelles en modifiant la microflore intestinale (Bailey *et al.*, 1991; Oyarzabal et Conner, 1996).

2.4.3 Vaccination

Lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, il y a certains mécanismes par lesquels la réponse humorale ou spécifique peut contribuer à prévenir la maladie. Ces étapes de l'infection sont notamment l'adhérence aux cellules de l'hôte, l'entrée et la croissance intracellulaire (Baretta *et al.*, 2000). L'interférence avec l'adhérence et l'entrée des pathogènes intracellulaires semble être la méthode la plus efficace dans la prévention de la maladie (Polyak *et al.*, 1997). La prévention de l'adhérence peut être obtenue par l'induction d'une forte réponse immunitaire humorale. L'opsonisation avec des anticorps spécifiques dirigés contre *Salmonella* peut réduire sa capacité d'adhérer aux cellules de l'hôte (Fluckiger *et al.*, 1998). La capacité d'induire une réponse humorale, particulièrement la production d'IgA sécrétés à la surface de la muqueuse intestinale, peut prévenir efficacement l'établissement des infections. Suite à l'entrée du pathogène dans les cellules de l'hôte, une réponse à médiation cellulaire est nécessaire afin de protéger l'hôte des envahisseurs (Barletta *et al.*, 2000).

Lorsque les salmonelles résident dans une vacuole à l'intérieur des cellules présentatrices d'antigènes, les peptides immunodominants sont alors présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) (Verjans *et al.*, 1995). La réponse en Th 1 est requise pour l'élimination des pathogènes intracellulaires suite à leur entrée dans les cellules hôtes. La présence d'IL-12 permet la réponse en Th 1 et l'IL-4 permet la réponse en Th 2 (Emoto *et al.*, 1997). Il est donc évident que la présence ou l'induction de différentes cytokines lors de la vaccination contre un agent pathogène intracellulaire est déterminante afin de favoriser l'effet protecteur du vaccin (Verma *et al.*, 1995).

L'infection par les salmonelles induit une mémoire immunitaire qui génère une protection significative contre l'infection, suite à une nouvelle exposition à cet agent pathogène (Jones et Falkow, 1996). Il est notamment connu que l'immunité acquise agit de concert avec l'immunité non-spécifique afin de contrôler les infections à salmonelles. La présence d'IgA sécrétoires au niveau de la muqueuse intestinale permet d'y limiter la prolifération bactérienne et les dommages, prévenant ainsi les symptômes de l'entérite (Michetti *et al.*, 1994). De plus, les IgA sécrétoires peuvent aussi limiter l'invasion bactérienne des entérocytes et des cellules M de la muqueuse. Par conséquent, les IgA sécrétoires seuls peuvent prévenir l'infection par certains agents pathogènes entériques invasifs. Une étude de Michetti *et al.*, (1992) relate la susceptibilité des souris infectées par voie intrapéritonéales avec *S. Typhimurium*, alors qu'elles étaient protégées lors d'une infection par voie orale, suggérant que les IgA dirigés contre certains épitopes de *S. Typhimurium* ont un rôle déterminant dans la protection.

La vaccination contre les salmonelles est une stratégie intéressante pour contrôler et prévenir la salmonellose chez les animaux puisque la détection des porteurs est particulièrement difficile, étant donné l'excrétion intermittante de la bactérie dans les matières fécales (Kramer *et al.*, 1992). Les souches vaccinales de salmonelles vivantes atténuées sont plus efficaces que les souches tuées ou que les vaccins sous-unitaires pour induire une réponse immunitaire protectrice. En général, les vaccins vivants ont une efficacité supérieure par leur capacité de stimuler une réponse immunitaire cellulaire (Lindberg et Robertson, 1983) et une réponse humorale et sécrétoire (Matsui et Arai, 1992). Ils ont aussi une persistance accrue chez l'hôte (Kantele *et al.*, 1991) et permet d'exprimer différents antigènes *in vivo* (Slauch *et al.*, 1994). Les mécanismes de protection à long terme, dépendent de différents facteurs, notamment, de la nature des antigènes immunodominants, du degré de virulence des souches de salmonelles et de la résistance naturelle ou susceptibilité de l'hôte. Il a aussi été démontré qu'une immunité humorale et cellulaire est obtenue suite à une immunisation par les vaccins vivants (Mastroeni *et al.*, 1993), ce qui confère une protection optimale chez les hôtes susceptibles. Par contre, les vaccins tués génèrent une protection seulement chez les hôtes ayant une résistance naturelle, probablement parce qu'ils ne peuvent induire de réponse immunitaire cellulaire mais seulement une réponse humorale (Eisenstein et Sultzer, 1983).

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour rendre certaines souches de salmonelles avirulentes (Chatfield *et al.*, 1989; Cardenas et Clements, 1992). Il est possible d'utiliser des mutants température-sensibles (Curtiss III *et al.*, 1987), des mutants

auxotrophes, par exemple $\Delta aroA$, Δasd , Δcys ou Δthy (Galan *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 1984), des mutants déficients en purine ou dans la biosynthèse de l'acide diaminopimélique (mutants Δpur et Δdap) (Clarke et Gyles, 1987; McFarland et Stocker, 1987; O'Callaghan *et al.*, 1988), des souches portant des déficiences dans l'utilisation ou la synthèse des hydrates de carbone (mutants *galE*) (Germanier et Furer, 1971 ; Hone *et al.*, 1987) et finalement, des mutants défectifs dans l'expression de plusieurs gènes (Δcya Δcrp ou $\Delta phoP$) (Curtiss III *et al.*, 1991). Ces différentes approches ont généré des souches vaccinales avec des degrés variés de virulence et d'immunogénicité (Clarke et Gyles, 1987 ; Curtiss III *et al.*, 1991). Par exemple, les mutants de *S. Typhimurium* $\Delta aroA$ et *galE* ne possèdent pas l'activité UDP-glucose épimérase, cet enzyme qui convertit le UDP-glucose en UDP-galactose, un composé essentiel à la synthèse du LPS de *Salmonella* spp. Ils sont avirulents et immunogènes chez la souris (Hohmann *et al.*, 1979; Hoiseth et Stocker, 1981; Hone *et al.*, 1987). Cependant, la mutation *galE* chez *S. Choleraesuis* ne réduit pas la virulence de cette souche chez le porc, étant donné que le galactose est absent de l'unité répétitive oligosaccharidique de l'antigène O de ce sérovar (Nnalue et Stocker, 1986).

La démonstration de l'importance de l'antigène O dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice a mené à une nouvelle approche permettant de générer des mutants avec leur LPS complet. Cette approche implique la production de souches auxotrophes ayant une déficience dans la voie de synthèse de molécules aromatiques. Ces souches ont besoin de suppléments nutritionnels non requis par les souches parentales, qui se reflète par un besoin en composés aromatiques para-aminobenzoate et

2,3-dihydroxybenzoate, nécessaires pour la réplication de l'ADN (Robertson *et al.*, 1983). Un vaccin de *S. Typhimurium* (aromatique-dépendant) utilisé chez la souris et les veaux a été efficace par les voies intramusculaires et orales pour réduire la maladie et s'est révélé sécuritaire (Smith *et al.*, 1984; Hook, 1990).

À l'opposé, les mutants de *S. Typhimurium* Δasd , Δthy et Δpur sont avirulents chez la souris mais non immunogènes lors d'infection expérimentales suite à la vaccination (Curtiss III *et al.*, 1987; Nnalue et Stocker, 1987). Lorsque l'effet de ces mutations ont été analysées chez la souris, tous les mutants ont démontré une réduction de virulence. Cependant, seuls les mutants $\Delta aroA$ se sont avérés avirulents pour ainsi permettre leur utilisation comme vaccin vivant (Jones *et al.*, 1991).

Certaines études ont démontré que les mutants Δcya Δcrp de *S. Choleraesuis* sont avirulents et immunogènes chez la souris (Kelly *et al.*, 1992) et chez le porc (Stabel *et al.*, 1993). La plupart des études de vaccination avec les différents mutants ont été réalisées chez la souris. Cependant, une étude récente de Kennedy *et al.*, (1999) a comparé l'efficacité chez le porc, de différents mutants Δcya Δcrp de *S. Choleraesuis* au vaccin avirulent commercial SC54, une souche de *S. Choleraesuis*, purgée de son plasmide de virulence de 50 kb et jugé sécuritaire et efficace chez le porc (Kramer *et al.*, 1992; Roof et Doitchinoff, 1995). La mutation non spécifique a été obtenue par passages répétés dans des neutrophiles porcins. En résumé, les différents mutants Δcya Δcrp générés et le vaccin SC54 ont démontré la même protection et un caractère sécuritaire similaire. Toutefois, le nombre de porcs excréteurs de la souche de défi

virulente de *S. Choleraesuis* et la durée de l'excrétion se sont avérés inférieurs pour les mutants $\Delta cya \Delta crp$ que pour la souche vaccinale commerciale (Kennedy *et al.*, 1999).

L'administration par voie orale de mutants vivants atténués permet d'utiliser la route naturelle d'infection, ce qui facilite l'étape cruciale de présentation des antigènes aux lymphocytes dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif. Ces événements induisent notamment une production d'IgA sécrétoires à la surface des muqueuses (Clarke et Gyles, 1993 ; Barletta *et al.*, 2000). Il apparaît donc que le pouvoir pathogène des salmonelles dépend de leur adaptation plus ou moins spécifique à un hôte particulier, de leurs facteurs de virulence, de la dose infectante et de la voie d'administration. De plus, des facteurs alimentaires ont aussi une incidence sur la flore intestinale normale et sur le statut immunitaire de l'hôte (Kaye, 1996).

CHAPITRE 3

**Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Finishing Swine
at Canadian Abattoirs.**

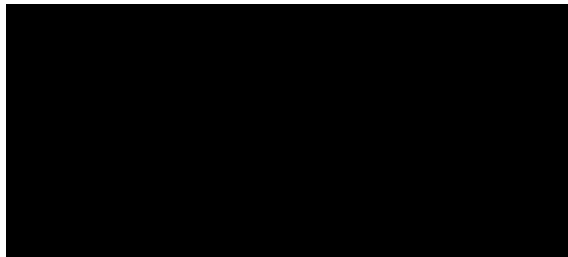
**Manuscrit publié dans Journal of Food Protection
1999, 62:22-25**

**Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Finishing Swine
at Canadian Abattoirs**

Ann Letellier^(1,2), S. Messier⁽¹⁾ and S. Quessy*⁽²⁾

⁽¹⁾ Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec

⁽²⁾ Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire, St-Hyacinthe, Québec



Key words: Foodborne pathogens, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, finishing swine, prevalence

ABSTRACT

The prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine was evaluated using samples of cecal material. Samples were taken at six different slaughterhouses from 1420 healthy, 5-month-old pigs, raised by 223 producers in Québec (1009 samples), Ontario (283) and Manitoba, Canada (128). Two different broth media (Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate brilliant green) were used for the selective enrichment of *Salmonella* spp. The recovery of *Y. enterocolitica* was done by a cold enrichment technique, followed by plating on a selective media (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar). Prevalence (with a 95% confidence interval) of *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica*, were respectively 5.2% (4.0 to 6.4%), and 20.9% (18.8 to 23.0%). Overall, 24.6% of the animals tested were positive for one or both of these pathogens. Since only a few herds (2.8%) appeared to be highly contaminated by *Salmonella* spp., efforts should be undertaken in priority to control this pathogen in those herds.

INTRODUCTION

Meat and meat products play a major role in the transmission of zoonotic diseases (4, 18). Husbandry conditions during transport to slaughter may favor the growth or shedding of a particular pathogen, so that when the animals arrive at the slaughterhouse, the pathogen can be an important component in the feces of pigs (22). During the evisceration process fecal bacteria may accidentally contaminate the meat and eventually cause diseases in humans (4). Healthy pigs were found to be carriers of

pathogenic strains of *Y. enterocolitica* and *Salmonella* spp. and are a source of infection for humans (8, 18).

Bean and Griffin (3) reported that from 1973 through 1987 pork was identified as the food vehicle in 25 outbreaks of human salmonellosis in the United States. Lammerding *et al.* (12) recovered *Salmonella* from 17.5% of pork carcasses at slaughter and *S. Brandenburg*, *S. Derby*, *S. Infantis* and *Salmonella* Typhimurium were the most frequently isolated serotypes. Carrier animals are an important component in the epidemiology of *Salmonella*. These animals shed *Salmonella* and may contaminate the environment, instruments and eventually meat in abattoirs. Carrier animals are thought to be important in disease dissemination (22).

Y. enterocolitica is another important cause of human gastrointestinal infections and has been isolated from a wide variety of foods (13). Epidemiological and molecular genetic evidence have shown that pork products are frequently identified as the source of strains responsible of human infection (5). The predominant serotypes implicated in human illness in Europe are O:3 (9) and O:9 (19), while the most common serotypes causing gastroenteritis in humans in the United States are O:8 and O:5,27 (10). Studies in Ontario (19), Québec (14) and Saskatchewan, Canada (11), have shown that the O:3 serotype was the one most often recovered from Canadian swine herds. These studies found that 11.9% to 19% of swine carcasses in Canada were contaminated by *Y. enterocolitica*.

Given the failure of postharvest measures to control these pathogens, efforts are now being made to control microbial pathogens at the farm level. Nevertheless, evaluating farm-level control options requires knowledge of basic data such as prevalence and distribution of pathogens in animals and production units. This study was conducted to evaluate the prevalence of *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica* as foodborne pathogens in finishing pigs at slaughterhouse in parts of Canada and to evaluate the prevalence distribution of these pathogens among different herds.

MATERIALS AND METHODS

Collection of samples. All samples were obtained from finishing pigs slaughtered between June 1995 and April 1996 in four abattoirs in Québec, one in Ontario, and one in Manitoba, Canada. A total of 1,420 samples were randomly selected from healthy, 5-month-old pigs coming from 223 herds. Immediately after evisceration and inspection, a small incision was made in the mid third of the cecum, using a disinfected scalpel and two 1-g samples of cecal content were collected from each animal. The identification number of the animal was noted in order to identify the herd of origin. All samples from Québec and Ontario were incubated within 12 hours and 24 hours for samples from Manitoba.

Isolation and identification of *Salmonella* spp. One gram of cecal contents was immediately added to a tube containing 9 mL of nutrient broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) and incubated for 18 to 24 h at 37°C. Following this pre-enrichment

step, a 1-mL aliquot of nutrient broth was inoculated into 9 mL of two different broth media for selective enrichment, Tetrathionate brilliant green (BBL Microbiology systems, Cockeysville, Md.) and Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, Hampshire, England), and incubated for 48 h at 37°C. Then, one loopful (10 µL) of each selective enrichment media was inoculated onto a brilliant green sulfa agar (Difco) containing 20 µg/mL of novobiocin (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.) and incubated for 24 h at 37°C. Lactose-negative colonies were submitted to biochemical testing on Christensen's urea and triple sugar iron media (Difco). Colonies suspected of being *Salmonella* spp. were further tested by agglutination against polyvalent O-antisera (Poly A1-Vi, Difco) and *Salmonella* isolates were serotyped at the Health Canada Laboratory in Guelph, under the supervision of Dr C. Poppe.

Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica*. Recovery of *Y. enterocolitica* was done by a cold enrichment technique. One gram of cecal contents from each animal was put in 9 mL of phosphate buffered saline and kept at 4°C for 6 weeks. At 3 and 6 weeks, samples were inoculated on *Yersinia* agar base (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar, Oxoid) containing the selective supplement SR 109 (Oxoid) (17). Cefsulodin-irgasan-novobiocin plates were incubated at 28°C for 24 to 48 h in an aerobic atmosphere. Typical colonies were inoculated on triple sugar iron and Christensen's urea media (Difco) and incubated at 28°C for 24 to 48 h for presumptive identification. Additionnal tests such as oxydase, citrate, rhamnose, sucrose, Voges-Proskauer and API 20E system (Biomerieux, Ville St-Laurent, Qc) were done in order to complete the identification. Serotyping of strains was done by slide agglutination

using specific antisera against O:3,O:5,O:8 and O:9 antigens (Accurate Chemical & Scientific Corporation, New York, NY). A Congo Red magnesium oxalate agar medium was used to detect expression of virulence-associated calcium dependency and Congo Red absorption in *Y. enterocolitica* as described by Riley and Toma (16).

RESULTS

The prevalence of *Salmonella* spp. in finishing pigs was evaluated at $5.2 \pm 1.2\%$ with a 95% confidence interval. A total of 12 serotypes were identified (Table 3.1). The most frequently isolated serotypes were *S. Brandenburg* (40.9%), *S. Infantis* (16.4%), *S. Derby* (9.8%), *S. Typhimurium* (8.2%), *S. Schwartzengrund* (4.9%) and *S. Urbana* (4.9%). Three serotypes were isolated only in Ontario: *S. Krefeld*, *S. Mbandaka* and *S. Urbana*. The frequency distribution of herd-level *Salmonella* infection in finishing pigs was calculated using herds where at least five samples were collected (Table 3.2). A herd positive for *Salmonella* spp. was defined as a herd where at least one positive sample was found. *Salmonella* spp. was present in 26.2% of herds where at least five samples were collected. The frequency distribution of *Salmonella* spp. among herds showed that the highest prevalence was in the 10 to 20% interval (for 13.1% of the producers). Two different selective enrichment media were tested for the isolation of *Salmonella* spp., namely Rappaport-Vassiliadis and Tetrathionate brilliant green broth, and both media showed similar efficiency (data not shown).

The prevalence of *Y. enterocolitica* (Table 3.1) was evaluated at $20.9 \pm 2.1\%$. *Y. enterocolitica* was recovered from 67.3% of the herds where five or more samples were collected, and the highest prevalence was also in the 10 to 20% interval (for 22.4% of the selected producer population) (Table 3.2). Four different serotypes were identified, and the most frequently found serotypes were O:3 (85.5%) and O:5 (9.1%) (Table 3.3). The presence of the plasmid associated with the virulence of *Y. enterocolitica* by detecting calcium dependency and Congo red absorption was evaluated in all isolates. It was found that 76.7% were positive for the presence of the virulence plasmid.

For both pathogens, seasonal incidence was evaluated, and a higher prevalence in summer (5.2 to 9.0%) for *Salmonella* spp. was observed compared with 2.1 to 5.0% in winter ($p=0.002$). Seasonal variation was also observed for *Y. enterocolitica*. In contrast, the prevalence in summer was significantly lower (14.8 to 20.3%) than in winter (18.6 to 25.1%, $p=0.04$).

DISCUSSION

This study indicated that a significant proportion of healthy pigs (24.6%) were carriers of either or both *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica*. The prevalence of *Salmonella* spp. in finishing swine reported in this study was found to be comparable to the prevalence reported in other studies (6, 7, 23). The serotypes most often found in Canada are generally among those most prevalent in the United States and Europe (6, 7), but differences were noted particularly concerning the prevalence of the different serotypes in the population. For instance, *S. Enteritidis* was not found in this study while *S. Infantis* is a serotype regularly isolated in Canada. *Salmonella* Typhimurium was the fourth serotype in importance isolated in pigs in this study. We observed that three serotypes (*S. Urbana*, *S. Krefeld* and *S. Mbandaka*) were only found in Ontario, indicating a possible variation in serotypes according to the region. No *Salmonella* was isolated in Manitoba but the low number of samples taken in this province cannot allow us to conclude about the prevalence of *Salmonella* spp. in Manitoba. The *Salmonella* spp. prevalence distribution among the different producers was mainly under 20%, indicating that contamination for this pathogen is limited to specific swine productions. Only a few producers had animals with a carriage rate higher than 50% (2.8%). The incidence of *Salmonella* spp. in pigs and the percentage of highly contaminated herds are rather low in comparison with other types of animals production and would support efforts to control this pathogen in production units, particularly in highly contaminated herds. Extensive environmental and animal sampling is now being done in these herds in order to gather epidemiological data concerning sources of infection by *Salmonella* spp. Other studies in United States (2, 4) and Canada (12, 14) observed higher

prevalence of *Salmonella* spp. in swine. These studies were done using carcasses, and it is thus difficult to relate the percentage observed in cecal contents samples to contamination of meat, since only a small proportion of carcasses are contaminated during the slaughtering process. The percentage observed in carcasses may result in cross contamination after the evisceration step.

The technique with Tetrathionate brilliant green and brilliant green sulfa media for the isolation of *Salmonella* spp. was used in this study. Although a similar technique gave good results in the recovery of *Salmonella* in environmental samples (15), it is accepted that no bacteriological sampling can provide a full recovery of positive animals. Given this, it is therefore possible that the real percentage of swine carrying *Salmonella* spp. could be higher than the one observed in our study.

The presence of *Y. enterocolitica* in 20.9% of pig cecal contents is in accordance with other reports that identify swine as an important reservoir for this microorganism (14, 20, 21). The most frequently isolated serotype was O:3 (85.5%) and it is also the most frequently isolated serotype from humans in Canada (13, 21). The serotype O:3 has consistently been recovered from the cecal contents of healthy pigs in different parts of the world (19). This serotype is common in pork and risk of cross-contamination of other products, for example, ready-to-eat meat was shown to be a source of human infection (1). Strains belonging to serotype O:3 biotype 4 are responsible for yersiniosis in Europe, Japan, South Africa and Canada (10). The O:5 serotype was isolated from Ontario and Manitoba with a higher percentage (16.5% and 14.3% respectively) than from Québec (4.7%). Only a few strains isolated were O:9 (3.3%) and O:8 (0.4%). The

Y. enterocolitica distribution among producers was also mainly under 20% but among these, 12.2% of the herds showed a carriage rate higher than 50%. Since very little is known about the epidemiology of this bacterium on farms, more studies on these highly contaminated herds are needed to propose efficient control measures for this pathogen.

This study confirmed that pigs are a significant reservoir of foodborne pathogens such as *Salmonella* and *Y. enterocolitica*. Mass production and rapid distribution of food pose a particular risk for widespread foodborne outbreak infection with those pathogens. New on-farm initiatives in food safety, such as the application of hazard analysis critical control point systems, will help reduce the risk of foodborne transmission of pathogens. Identification of the sources of contamination and a better control of those pathogens at the farm level will be needed to reduce incidence of carcass contamination at slaughterhouses.

TABLE 3.1: Distribution of *Salmonella* spp. serotypes according to the region (n=61)

Serotypes	Québec (n=1009)	Ontario (n=283)	Manitoba (n=128)	Total (%)
<i>S. Brandenburg</i>	24	1	0	40.9
<i>S. Infantis</i>	10	0	0	16.4
<i>S. Derby</i>	6	0	0	9.8
<i>S. Typhimurium</i>	4	1	0	8.2
<i>S. Schwartzengrund</i>	3	0	0	4.9
<i>S. Urbana</i>	0	3	0	4.9
<i>S. Agona</i>	2	0	0	3.3
<i>S. California</i>	2	0	0	3.3
<i>S. Senftenberg</i>	2	0	0	3.3
<i>S. Heidelberg</i>	1	0	0	1.6
<i>S. Krefeld</i>	0	1	0	1.6
<i>S. Mbandaka</i>	0	1	0	1.6
Number of isolates	54 (88.5%)	7 (11.5%)	0	100%

TABLE 3.2: Frequency distribution of herd-level foodborne pathogens in finishing pigs for herds where 5 or more samples were taken.

Intervals of prevalence of <i>Salmonella</i> spp. and <i>Y. enterocolitica</i> (%) ^a										
0	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
<i>Salmonella</i> spp.										
73.8	6.5	13.1	0.9	1.9	0.9	0.9	0.0	1.9	0.0	0.0
<i>Y. enterocolitica</i>										
32.7	15.0	22.4	7.5	6.5	3.7	4.7	2.8	2.8	1.9	0.0

^a Each interval represents a proportion of infected pigs greater than lower bound indicated, and less than or equal to upper bound. Percentage in each interval represents proportion of producers recognized positive.

TABLE 3.3: Distribution of serotypes among samples positive for *Y. enterocolitica* according to the region (n=275)

Number (%)				
Serotypes	Québec	Ontario	Manitoba	Total
O:3	156 (91.8%)	67 (73.6)	12 (85.7)	235 (85.5)
O:5	8 (4.7)	15 (16.5)	2 (14.3)	25 (9.1)
O:8	1 (0.6)	0	0	1 (0.4)
O:9	5 (2.9)	4 (4.4)	0	9 (3.3)
NT ^a	0	5 (5.5)	0	5 (1.8)
Total	170 (61.8)	91 (33.1)	14 (5.1)	275 (100)

^aNT: nontypable

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Kathie Roseberry, Raymonde Massicotte, Louise Lessard, Kathryn Machika, Valérie Thibodeau, François Caya and Jannick Beaurivage for their technical assistance in this research. We also acknowledge the support of Agriculture and Agrifood Canada, in particular Drs R. Favreau, E. Bourdon, J.-M. Pelletier and S. Fournaise for their collaboration to this project.

This research was supported in part by the Canadian Pork Council.

REFERENCES

1. Anderson J.K., R. Sorensen and M. Glensbjerg. 1991. Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 13:231-237.
2. Anonymous. 1996. Nationwide Pork Microbiological Baseline Data Collection Program : marquet hogs. US Department of Agriculture, Food Safety and Inspection service, Science and Technologie, Microbiology Division, Washington, D.C.
3. Bean, N.H. and P.M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicules, and trends. *J. Food Prot.* 53:804-817.
4. Beran, G.W. 1995. Human health hazards from meat and meat products. p. 72-79. In Allen D. Leman Swine Conference.
5. Caugant D.A., S. Aleksic, H.H. Mollaret, R.K. Selander, and G. Kapperud. 1989. Clonal diversity and relationships among strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2678-2683.
6. Christensen, J. and D.L. Baggensen. 1996. The occurrence of serotypes of *Salmonella enterica* and phages types of *S. typhimurium* in Danish swine herds. In Proceedings of the 14th I.P.V.S. Congress, Bologna, Italy, 7-10 July 1996.

7. Fedorka-Cray, P.J., and E. Bugh. 1996. Results of 1995 NAHMS Swine survey in grower/finisher swine. In Proceeding of the 100th USAHA meeting, Little Rock, 1995-1996 *Salmonella* Committee Abstracts.
8. Gray, J.T. and P.J. Fedorka-Cray. 1996. Salmonellosis in swine: A review of significant areas affecting the carrier state. pp. 80-103. In Proceeding of the First International Symposium on Ecology of *Salmonella* in Pork Production. Ames Iowa.
9. Hariharan, H., J.S. Giles, S.B. Heaney, S.M. Leclerc, and R.D. Schurman. 1995. Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs. *Can. J. Vet. Res.* 59:161-166.
10. Kotula, A.W., and A.K. Sharar. 1993. Presence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:5,27 in slaughter pigs. *J. Food Prot.* 56:215-218.
11. Kwaga, J., J.O. Iversen, and J.R. Saunders. 1990. Comparaison of two enrichment protocols for the detection of *Yersinia* in slaughtered pigs and pork products. *J. Food Prot.* 53: 1047-1049.
12. Lammerding, A.M., M.M. Garcia, E.D. Mann, Y. Robinson, W.J. Dorward, R.B. Truscott, and F. Tittiger. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal, and poultry in Canada. *J. Food Prot.* 51:47-52.

13. Lee, W.H., C. Vanderzant, and N. Stern. 1981. The occurrence of *Yersinia enterocolitica* in foods. Pp. 161-171. E.J. Bottone ed. In *Yersinia enterocolitica*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
14. Mafu, A.A., R. Higgins, M. Nadeau and G. Cousineau. 1989. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *J. Food Prot.* 52:642-645.
15. Poppe, C., R. J. Irwin, S. Messier, G. G. Finley and J. Oggel. 1991. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 107:201-211.
16. Riley, G., and S. Toma. 1989. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using congo-red-magnesium oxalate agar medium. *J. Clin. Microbiol.* 27:213-214.
17. Schiemann, D.A. 1979. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* 25:1298-1304
18. Schiemann, D.A. 1980. Isolation of toxigenic *Yersinia enterocolitica* from retail pork products. *J. Food Prot.* 43:360-365
19. Schiemann, D.A., and C.A. Fleming. 1981. *Yersinia enterocolitica* isolated from throats of swine in eastern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* 27:1326-133.

20. Swaminathan, B., M.C. Harmon and I.J. Mehlman. 1982. *Yersinia enterocolitica* . J. Appl. Bacteriol. 52:151-183
21. Toma, S. and V.R. Deidrick. 1975. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine. J. Clin. Microbiol. 2:478-481.
22. Wilcock, B.P., and K.J. Schwartz. 1992. Salmonellosis. Pp.570-583. In Ed. A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. Taylor. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
23. Yoshida, T., I. Takahashi and T. Sawada. 1995. Incidence and serotypes of *Salmonella* in apparently healthy swine at slaughterhouses in Japan: 1975-1989. Nippon Saikingaru Zasshi. 50: 537-545.

CHAPITRE 4

Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec.

**Manuscrit publié dans *Veterinary Microbiology*
1999, 67 :299-306**

Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec

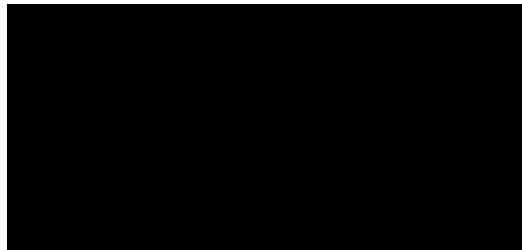
Ann Letellier^(1,2), S. Messier⁽¹⁾, J. Paré⁽³⁾, J. Ménard⁽⁴⁾ and S. Quessy*⁽²⁾

⁽¹⁾ Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

⁽²⁾ Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire, St-Hyacinthe, Québec, Canada

⁽³⁾ Veterinary epidemiologist, 485, Ave de Dieppe, St-Hyacinthe, Québec, Canada

⁽⁴⁾ Swine practitioner, 40, Route 235, Ange-Gardien, Québec, Canada



ABSTRACT

Five porcine finishing units, previously identified as contaminated by *Salmonella*, were sampled to identify possible sources of contamination and to study the distribution of *Salmonella* within the herds. A total of 208 environmental samples were taken and 87 samples (42%) were found contaminated by *Salmonella* spp. *Salmonella* was recovered from several types of samples. Among these, fecal material from pens, building environment such as doors, floors, ventilation units, dust and farm accessories were most often found positive. Some of the flies and rodents were also positive. Two of the finishing units were part of an integrated production system and the prevalence and distribution of *Salmonella* spp. at different production steps of the integrated facilities were studied. Forty-one farms were sampled and a total of 1923 faecal samples in randomly selected pens were analysed. One hundred and fifty-one samples (7.9%) were positive for *Salmonella* spp. Among the farms sampled, 70.7% (29/41) were positive for isolation of *Salmonella*. The different levels in the integrated production were unevenly contaminated. Replacement sow (15.9%) and finishing unit for gilts (21.9%) were the most contaminated levels. Ten serotypes of *Salmonella* (n=132) were identified in the production pyramid with a predominance of *Salmonella* Derby (37.1%) and *Salmonella* Typhimurium (34.1%). Pulse Field Gel Electrophoresis analysis of the various isolates from serotypes and *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Derby and *Salmonella* Anatum showed no variation in the genetic profiles, within each serotype, suggesting a vertical contamination throughout the different production steps.

Key words: *Salmonella*, swine, prevalence, contamination sources, genotypes

INTRODUCTION

Salmonella infections rank among the most important causes of bacterial enteritis in humans (Todd, 1995). At present, salmonellosis is considered, along with campylobacteriosis as one of the two most prevalent reported foodborne diseases in industrialized countries (Doyle, 1981; Beran, 1995), most often associated with eating contaminated meat. Pork meat and pork meat-based products are significant sources of infection in human (Beran, 1995).

Although *Salmonella* spp. may survive for long periods in the environment (Thomason *et al.*, 1975 ; Bohm, 1993) it is believed that the carrier animal is the major source of infection for both animals and humans (Gray and Ferdorka-Cray, 1996). Swine can carry *Salmonella* in both the intestinal tract and in the mesenteric lymphatic nodes (Wood *et al.*, 1989). Stress factors, such as transport to the abattoir, have been shown to promote shedding of *Salmonella* by carrier swine. This release of *Salmonella* contributes to the contamination of carcasses and the environment at slaughterhouse (Wilcock and Schwartz, 1992).

In many countries, efforts are now being made to reduce the incidence of *Salmonella* carriage at the farm level (Fedorka-Cray *et al.*, 1994; Wierup, 1994; Olson , 1996; Dahl *et al.*, 1997; Letellier *et al.*, 1997). To do so, it is important to identify contamination sources at the farm. The development of efficient on-farm strategies to control *Salmonella* spp. requires knowledge of basic epidemiological data, such as prevalence and distribution of pathogens in animals and production units.

The aim of the first part of this study was to identify, in herds known to be positive for the presence of *Salmonella* (Letellier *et al.*, 1999), possible sources of contamination.

In the second part, we evaluated the prevalence and distribution of *Salmonella* spp. at the different levels in an integrated swine production system.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection of samples

Producers from five farms, where animals were found positive in a previous study by bacteriological cultures of fecal material, agreed to participate in the project. Two of these farms were specifically chosen because of the presence of clinical signs during an outbreak of salmonellosis. The farms were sampled to identify sources of contamination. A total of 208 samples were taken from different locations within these five farm units. Sampling taken on each farm included random sample of pens (1 g of fecal material from four sites), water (1 mL in pens and main source) and feed (1 g in pens), swabbing of the doors (bottom and handle) and a 10 cm² surface from the floors, farm accessories (brooms, boots) and the ventilation units (except for one farm with natural ventilation). Other environment samples were taken only when present or in significant number, such as rodents (either intestinal content when animal were caught; trap swabbing; or sample of soil from nests), flies (pool of five), fecal material from birds (pool of five), insects such as grasshoppers, crickets and spiders, dust from windows sills and pipes (swab on four sites).

Finishing units C and D were part of an integrated production system. A total of 1923 samples of fecal material from pens randomly selected were collected on 41 farms from the different production levels, beginning with replacement gilts (n=1) and sows (gestation, n=1), followed by the farrowing house with nursery (n=1), the finishing units for gilts (n=6), the commercial farrowing houses (n=14), the off-site nurseries (n=4) and the commercial finishing units (n=14). Prevalence and 95% confidence interval (Fleiss,

1981) were computed for each level of production. Feedstuffs and supplements (n=46) were sampled from the main milling. The farrowing house was visited six times, sows gestation and farrowing houses were visited twice while the other production levels were sampled once.

2.2 Isolation and identification of *Salmonella* spp.

Each sample was put in a tube containing 9 mL of nutrient broth (NB) (Difco, Detroit, MI) and incubated for 18-24 h at 37°C. A 1 mL aliquot of each pre-enriched culture was inoculated into 9 mL of Tetrathionate brilliant green (TBG)(BBL, Cockeysville, MD) for the selective enrichment of *Salmonella* spp. and incubated for 24 to 48h at 37°C. Then, one loopful (10 µL) of TBG was inoculated onto a Brilliant Green Sulfa agar (BGS agar, Difco) containing novobiocin (Sigma, St-Louis, MO) at 20 µg/mL (Tate *et al.*, 1990) and incubated for 24 to 48h at 37°C. Lactose negative colonies were tested for urease production and for typical reaction on Triple sugar iron media (Difco). Colonies with a pattern suggestive of *Salmonella* spp. were tested by slide agglutination with a polyvalent O-antisera (Poly A1-Vi, Difco) and *Salmonella* isolates were serotyped at the Agriculture and Agrifood Canada Laboratory in Guelph, under the supervision of Dr C. Poppe.

2.3. Pulsed-field gel electrophoresis analysis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was carried out on DNA which had been extracted from *Salmonella* spp. isolates and digested with *Spe I* as described previously (Schwarz and Liebisch, 1994). DNA fragments were separated by electrophoresis in a 1.2% agarose gel at 200 V with a linear ramp switch time of 5 to 25 sec for 18 h with a Gene Navigator apparatus (Pharmacia, Sweden).

RESULTS

The environment of the five farms examined were found to be contaminated and the number of positive samples on each farm ranged from 17 to 66%. On two of these farms, A and C, clinical signs compatible with salmonellosis had been noted. On farm A, pigs had mild to severe diarrhea, some were prostrated and deaths were noted. Farm A was extensively sampled and a large variety of samples were found positive (Table 4.1). Fecal material from dead animals (86 %), fecal material from pens (100 %), water (79 %) and feedstuff (40 %) were found to be positive for the presence of *Salmonella* by culture. Other samples within the barn such as doors, floors, ventilation units, and dust were found positive for *Salmonella*. Despite the low number of samples taken, farm accessories like boots, shovel and soil from rodent's nests were also found positive. On this farm, flies caught within the barn, and samples such as soil and water near dead animals close to the front door were found positive.

On farm C, pigs had clinical signs similar to those of farm A but no mortality was observed. No dead animals, flies or rodents were sampled on this farm. A total of 83.3% of the samples of fecal material taken from the pens were found positive for *Salmonella*. Water samples as well as samples taken from the doors, floors, ventilation units, and dust were found positive. The boots of the animal caretaker working on this farm were also found positive for *Salmonella*. Overall, 70 out of the 115 samples taken from herds with clinical signs were positive for *Salmonella* in comparison to 17 out of the 93 samples taken from herds without clinical signs.

The average prevalence of *Salmonella* spp. in the fecal samples from the integrated swine unit was 7.9% (Table 4.2). The highest prevalences were found in the replacement gilts unit (15.9%) and finishing units for gilts (21.9%).

The various isolates of *Salmonella* were found belonging for the most part to serogroup B (76.5%), followed by serogroup C1 (10.6%) and E1 (10.6%) (Table 3). A small percentage (2.4%) was not associated to any specific serotype. Among the isolates of group B, *Salmonella* Derby and *Salmonella* Typhimurium (phage types 108, 104, 169 and 771) were the most frequent. No *Salmonella* were isolated from the feedstuffs and supplements sampled from the main milling. On the same sampling day from different samples, two different serotypes were recovered in 11 out of the 46 sampled herds, and a maximum of three serotypes were detected in two herds.

Three different serotypes, *Salmonella* Typhimurium DT108, *Salmonella* Anatum and *Salmonella* Derby, were found throughout the integrated system and using macrorestriction analysis of DNA by PFGE, we did not detect any variation of the genetic profile between isolates of the same phage type.

DISCUSSION

In the herds studied, many environmental samples such as water taken in the pen, boots, floors, doors, rodent or rodent's nests were found to be contaminated. Although we cannot conclude that these positive samples were the source of the infection for swine, there is no doubt that they could be involved in subsequent recontamination if appropriate measures are not taken. Rodents and wildlife are well known vectors of *Salmonella* (Muirhead, 1993; Davies *et al.*, 1997). In addition, on farm A, where clinical signs were present, a water sample taken from the main water supply was positive, indicating that water can play a significant role in the spread of salmonellosis. This could explain the high prevalence of *Salmonella* in the environment and in animals on this farm. However, since many animals were found positive for *Salmonella*, we cannot exclude the possibility of animal to animal transmission. Flies were positive for *Salmonella* on the highly

contaminated farms and as mentioned elsewhere, they may be involved in the dissemination of *Salmonella* in the environment as carrier of microorganisms (Morse and Duncan, 1974; Khalil *et al.*, 1994). It is important to note that in these herds, dead animals were possible sources of contamination. Disposal of dead animals in specific sites with no risk of premise recontamination is thus an important feature of a biosafety program. Given the widespread dissemination of *Salmonella* in the environment of the affected finishing unit, once assured that water is free of *Salmonella*, harsh hygienic measures such as fumigation or rigorous washing and disinfection combined with implementation of strict sanitary measures and control of rodents and flies on the farm are indicated in order to reduce contamination by *Salmonella*.

In herds without visible clinical signs, although several pens were found positive for the presence of *Salmonella*, there was limited cross contamination of the environment. Water and feedstuffs from the pens were not found to be contaminated and the building environment and accessories were less contaminated. It is of interest to point out that boots of animal caretakers were found positive for *Salmonella* in both type of herds, indicating that a particular attention should be given to the disinfection of boots to avoid the spread of *Salmonella*. Given the fact that *Salmonella* was present in animal feces without massive environmental contamination, this led us to believe that animals were the main source of contamination in these herds.

In the second part of the study, the prevalence and distribution of *Salmonella* in the integrated swine unit was evaluated at different levels of an integrated production system. The overall prevalence was estimated at 7.9 and 70.7% of the farms sampled were positive for *Salmonella* spp. by culture, indicating a wide distribution of this pathogen in the integrated unit with a high contamination rate in replacement gilts level (15.9%) and finishing unit for gilts (21.9%). Davies *et al.*, (1998) also reported high prevalence (18-

22%) of *Salmonella* spp. in breeding animals. Given the risk of spreading *Salmonella* in the steps above caused by the higher prevalence in reproducing animals on the top of the integrated production, control measures were undertaken in priority as a first step of a global control program.

Since no variation of the genetic profile was noted by PFGE within a same serotype, this suggests that the origin of the contamination of the pyramid by *Salmonella* Typhimurium DT108, *Salmonella* Anatum and *Salmonella* Derby is the nucleus herd. From these observations, it was concluded that in these swine herds, *Salmonella* infection was transmitted vertically by the introduction of the pathogen into herds via carriers at the breeding level.

Control of the infection caused by *Salmonella* spp. is linked to the detection of carrier pigs, contaminated feed or water and of environmental sources of infection. Pigs are most likely to develop disease during periods of stress or when exposed to large numbers of *Salmonella* (Allred, 1972). It is well documented that carrier pigs are positive for *Salmonella* in the mesenteric lymph nodes, tonsils, cecum or feces (Wilcock and Olander, 1978; Wood *et al.*, 1989). This facultative intracellular pathogen can avoid humoral immunity in the intracellular environment. This suggests that a strong cellular response is needed for the elimination of this pathogen (Sell, 1987). It would thus be important in the future to find tools to reduce carriage of *Salmonella* in swine in order to achieve better control of the contamination of carcasses at the slaughterhouse.

The demonstration of vertical transmission of *Salmonella* at different levels of an integrated production system stresses the importance of reducing carriage in live animals by very strict and constant farm hygiene measures, starting at breeding farms, combined

with other measures such as prudent use of antibiotics and promotion of resistance to colonization by *Salmonella* (Berends *et al.*,1996).

ACKNOWLEDGEMENTS

Louise Lessard, Eric Nadeau, Louise Beausoleil, Kathie Roseberry, Avila Croisetière, Laure Dudet, Marie-Hélène Venne.

REFERENCES

Allred, J.N.,1972. Comments on salmonellosis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160, 601-602.

Beran, G.W., 1995. Human health hazards from meat and meat products. In: Allen D. Leman. Swine Conference, pp.72-79.

Berends, B.R., Urlings, H.A., Snijders, J.M. and Van Knapen, F., 1996. Identification and quantification of risks factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. Int. J. Food Microbiol. 30 :37-53.

Bohm, R., 1993. Behavior of selected *Salmonellae* in the environment. Dtsh Tierarztl. Wochenschr. 100, 275-278.

Dahl J., Wingstrand A., Nielsen B., and Baggesen, D.L., 1997. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by strategic movement of pigs. *Vet. Rec.* 140, 679-681.

Davies, P.R., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J., Fedorka-Cray, P.J. and Harris, I.T., 1997. Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol. Infect.* 119, 237-244.

Davies, P.R., Bovee, F.G., Funk, J.A., Morrow, W.E., Jones, F.T. and Deen, J., 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 1925-1929.

Doyle, M.P., 1981. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: An old pathogen of new concern. *J. Food Prot.* 44, 480-488.

Fedorka-Cray, P.J., Whipp, S.C., Isaacson, R.E., Nord, N. and Lager, K., 1994. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Vet. Microbiol.* 41, 333-344.

Fleiss, J. L., 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Wiley, 2nd ed., Wiley, New York. 321pp.

Gray, J.T. and Fedorka-Cray, P.J., 1996. Salmonellosis in swine: A Review of significant areas affecting the carrier state. In *Proceeding of the First International Symposium on Ecology of Salmonella in Pork Production.*, pp. 80-103.

Khalil, K., Lindblom, G.B., Mazhar, K. and Kaijser, B., 1994. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* 113, 435-444.

Letellier, A., Messier, S. and Quessy, S. 1997. Control of *Salmonella* in swine by use of probiotics. In *Proceeding of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork.*, pp. 160-163.

Letellier, A., Messier, S. and Quessy, S. 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J. Food Prot.* 62, 22-25.

Morse, E.V. and Duncan, M.A., 1974. Salmonellosis-an environmental health problem. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165, 1015-1019.

Muirhead, S., 1993. House mice linked to persistence of salmonellosis on pig farms. *Feedstuffs.* 65, 11.

Olson, O., 1996. The Swedish farrow-to-slaughter (FTS) pig production system. A new concept. In *Int. Seminar on Alternative Swine Housing and Production Systems*, University of Wisconsin, USA, 26 March, 1996.

Schwarz, S., and Liebisch, B., 1994. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. Letters Appl. Microbiol. 19, 469-472.

Sell, S., 1987. Immunology, Immunopathology, and Immunity, Elsevier, New York., pp. 1-317.

Tate, C.R., Miller, R.G., Mallinson, E.T., Douglass, L.W. and Johnston, R.W., 1990. The isolation of *Salmonellae* from environmental samples by several enrichment procedures using plating media with and without novobiocin. Poul. Sci. 69, 721-726.

Thomason, B.M., Biddle, J.W., and Cherry, W.B., 1975. Detection of *Salmonellae* in the environment. Appl. Microbiol. 30, 764-767.

Todd, E.C.D., 1995. Worldwide surveillance of foodborne disease : the need to improve. J. Food Prot. 59, 82-92.

Wierup, M., 1994. Control and prevention of salmonellosis in livestock farms. In Comprehensive Report on Technical Items presented to the International Committee or to Regional Commissions, pp.249-269.

Wilcock, B. and Olander, H., 1978. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella typhimurium*. Am. J. Vet. Med. Assoc. 172, 472-477.

Wilcock, B.P., and Schwartz, K.J., 1992. Salmonellosis. In Leman, A.D., B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. Taylor (Eds.), Diseases of swine, Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 570-583.

Wood, R.L., Pospischil, A., and Rose, R., 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. 50, 1015-1021.

Table 4.1. Environmental sampling in swine herds positive for *Salmonella* spp.

Samples	Farms				
	A ^a	B	C ^a	D	E
Fecal material from pens	18/18	4/19	5/6	3/4	3/7
Water	11/14	0/2	1/3	0/2	0/1
Feedstuff	2/5	0/4	0/1	0/3	0/1
Floors	1/3	0/1	2/2	0/2	0/4
Doors	2/4	1/2	1/1	1/2	0/4
Ventilation units	2/8	2/8	0/3	-	0/3
Dust	2/2	-	0/2	0/1	0/1
Dead animals	12/14	-	-	-	-
Rodents (animals and traps)	1/4	1/3	-	0/1	-
Flies	6/7	-	-	0/1	-
Spider, cricket, grasshopper	0/1	0/3	-	-	0/1
Birds fecal material	-	-	0/3	0/4	-
Boots	1/2	-	1/1	-	1/1
Shovel	1/1	-	0/1	0/2	0/1
Broom	0/1	-	-	0/2	0/1
Exterior (soil near dead animals)	1/7	1/3	0/1	-	-
Total	60/91	9/45	10/24	4/24	4/24
% positive	66	20	42	17	17

^aFarms with clinical salmonellosis

Table 4.2. Prevalence and distribution of *Salmonella* spp. in an integrated swine unit.

Production level ^a (No. of sites)	No. of samples	No. of positive isolates	Prevalence (CI 95%) ^b
Replacement gilts (1)	63	10	15.9 (8.3-27.7)
Sow (gestation) (1)	148	8	5.4 (2.5-10.7)
Farrowing house-Nursery (1)	136	3	2.2 (0.6-6.8)
Finishing unit for gilts (6)	183	40	21.9 (16.2-8.7)
Commercial farrowing house (14)	656	37	5.6 (4.1-7.8)
Nursery off-site (4)	192	2	1.0 (0.2-4.1)
Commercial finishing unit (14)	545	51	9.4 (7.1-12.2)
Total samples	1923	151	7.9 (6.7-9.2)
Total farms	41	29	70.7 (54.3-83.4)

^a The different production levels of an integrated swine unit are indicated in the same order as the one followed by the pigs in the integrated unit.

^b Confidence interval 95%

Table 4.3. Serotypes and phage types of *Salmonella* isolated from an integrated swine production unit at different production levels (n=132)

Serogroups	Serotypes	Positive samples	Proportion of total number of isolates
B	<i>Salmonella</i> Derby	49	37.1%
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	45	34.1%
	DT 108	(34)	
	DT 104	(6)	
	DT 169	(3)	
	DT 771	(1)	
	atypical	(1)	
	<i>Salmonella</i> Heidelberg	6	4.5%
	<i>S. Schwartzengrund</i>	1	0.8%
C1	<i>Salmonella</i> Ohio	11	8.3%
	<i>Salmonella</i> Infantis	3	2.3%
E1	<i>Salmonella</i> Anatum	14	10.6%
NA ^a	I:6,7:-:-	1	0.8%
	I rough O:i:1,2	1	0.8%
	I:4,5,12:-:-n-m	1	0.8%
Total	10	132	

^aNot associated to specific serotype

CHAPITRE 5

Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine.

**Manuscrit publié dans The Canadian Journal of Veterinary Research
2000, 64:27-31**

Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine.

A. Letellier, S. Messier , L. Lessard and S. Quessy

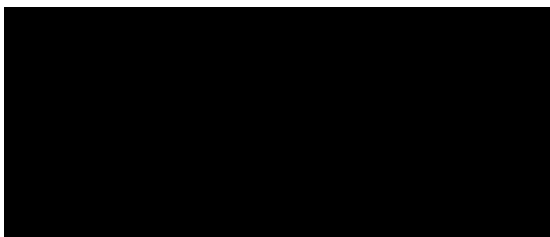
Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe,

Québec, J2S 8E3 (Letellier, Messier)

Santé Canada, Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire, 3400 Casavant

Ouest, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6 (Lessard, Quessy)

Corresponding author: Dr. Sylvain Quessy



RÉSUMÉ

Dans cette étude, différentes stratégies, incluant des agents probiotiques et prébiotiques, la vaccination et l'acidification de l'eau de consommation ont été évaluées afin de réduire l'état de porteurs de *Salmonella* spp. chez le porc. Suite à une infection expérimentale, une réduction de la colonisation des nœuds lymphatiques mésentériques (NLM) par *S. Typhimurium* a été observée chez les animaux ayant reçu des bambermycines, ainsi que chez les animaux vaccinés avec un vaccin vivant atténué. L'acidification de l'eau de consommation, l'utilisation de poudre d'œuf contenant des immunoglobulines spécifiques dirigées contre *S. Typhimurium* et un vaccin à base d'endotoxine n'ont pas amené de réduction de l'excrétion de *Salmonella* spp. chez des animaux infectés expérimentalement. Cependant, une réduction de l'excrétion de *S. Typhimurium* dans les fèces a été notée chez les animaux ayant reçu des fructooligosaccharides (FOS) dans l'eau de consommation. Une modification de la flore bactérienne des matières fécales des animaux supplémentés avec les probiotiques et les prébiotiques a été observée lors de l'examen au Gram des frottis provenant des écouvillons rectaux.

ABSTRACT

In this study, different strategies to reduce carriage of *Salmonella* spp. in pigs were evaluated. Probiotics, prebiotics, vaccination, and acidification of drinking water were assessed as means of reducing *Salmonella*. Acidification of water, use of egg yolk-specific immunoglobulins, and vaccination with an endotoxin vaccine did not reduce

Salmonella excretion in experimentally infected pigs. A reduction of *Salmonella* in the colonization of mesenteric lymph nodes was observed with the use of bambarmycins and a live attenuated vaccine. A reduction in the shedding of *S. Typhimurium* was also observed after supplementation with fructooligosaccharides in drinking water. The use of probiotics and prebiotics appeared to change the pig fecal bacterial flora as indicated by Gram staining of smears from rectal swabs.

KEY WORDS: Swine, *Salmonella*, bambarmycins, probiotics, vaccination, prebiotics.

INTRODUCTION

Salmonellosis has become one of the most important zoonoses transmitted by meat in developed countries (1). From 1977 to 1984, Bryan (2) observed that pork was responsible for 11% of the *Salmonella* outbreaks attributed to meat. In addition to the impact of salmonellosis on human health, it is also a major disease resulting in economic losses for the swine industry (3).

It was reported that animals can become infected by contaminated feed, chronic carriers introduced into the herd, rodents or people who visited a contaminated farm before entering the production unit (4-6). At the abattoir, the initial source of contamination of the environment and animals, is the carrier pig, and transmission is thought to occur by pig-to-pig contact or by exposure to the contaminated environment (7). Current efforts to identify and eradicate the carrier population has been impeded by a lack of information regarding the epidemiology and pathogenesis of salmonellosis in

swine and by the lack of practical means to control the carriage of *Salmonella* by asymptomatic animals. *Salmonella* Typhimurium is one of the most frequently isolated serovars in swine in Québec (8) and infections caused by this serotype are mainly limited to the intestinal tract (9).

Clinical signs associated with infection by *S. Typhimurium* include diarrhea, dehydration and death due to a necrotizing fibrinous enterocolitis (6, 10). The severity of enterocolitis produced by infection from this serotype is variable (11). Once ingested, *S. Typhimurium* attaches to and penetrates the intestinal mucosa and invades the lamina propria where it is phagocytized by macrophages. *Salmonella* is then spread throughout the body into organs such as tonsils, Peyer's patches, gastric, hepatic, jejunal and ileocecal nodes (12). The duration of the shedding in feces is variable and Wood and Rose (13) have demonstrated that *S. Typhimurium* persists in swine in low numbers for at least 28 wk following experimental infection.

Since *Salmonella* is widely distributed in the environment, control is difficult to achieve. In many countries, efforts are now being made to reduce the incidence of *Salmonella* infection at the farm level. Fedorka-Cray *et al.* (14) and Nisbet *et al.*, (15) used competitive exclusion to control *Salmonella* in swine. The addition of organic acids to water or feed seems to be promising for reduction of *Salmonella* in swine (16, 17).

The purpose of this study was to evaluate different treatments such as probiotics, prebiotics, vaccination, water acidification and egg yolk immunoglobulins to control *Salmonella* infections in pigs.

MATERIAL AND METHODS

Animals: Early-weaned 12 day-old *Salmonella* free piglets, as verified by culture of fecal material and swabbing of tonsils, were randomly assigned to either control or one of the treatment groups. Each group was composed of 10 pigs. Clinical signs were monitored daily throughout the experiment by a veterinarian.

Pig treatments: Water acidification (0.02% formic acid), administration of probiotics, (Ferlac-2, Rosell Institute, Montréal, Québec; 2×10^9 colony forming units (cfu)/day, composed of *Lactobacillus acidophilus* (4%), *L. rhamnosus* (65%), *Enterococcus faecium* (25%), *Streptococcus thermophilus* (5.9%) and *L. bulgaricus* (0.1%) in feed), Flavomycin (Hoechst Canada, Regina, Saskatchewan; final concentration of 0.5 g/ton of feed, Canada), fructooligosaccharides (FOS) (Encore Technologies, USA; 1% in water or feed) and egg-yolk specific immunoglobulins (1g /piglet/day in the feed, Vetco Inc., St-Hyacinthe, Québec) were used in different groups from Day 0 (at 21 days of age) to Day 28. Two other groups were also immunized with an endotoxin vaccine (Endovac-bovi, Bayer, USA; 2 mL intramuscularly) or a live attenuated *S.Choleraesuis* vaccine (SC54, *S.Choleraesuis* strain 54, Boehringer, Iowa, USA; an attenuated homologous derivative of *S.Choleraesuis* strain 38, was isolated via passage through porcine neutrophils and cured of the 50-kb virulence plasmid, with no

evidence of reversion after laboratory and field evaluations (22); 2 mL, intranasally) at Day 0. The control group was not supplemented and each group was housed in environmentally separate controlled facilities.

Challenge : For the experimental infection, a strain of *Salmonella* Typhimurium, isolated from a septicemic pig (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec) was used. This strain was inoculated into nutrient broth (NB, Difco, Detroit, Michigan, USA) and incubated at 37°C for 18 h. The starting culture was used to inoculate a fresh NB tube (1 :100). This culture was incubated at 37°C and log phase bacteria were used for the challenge. A dose of 10^7 cfu was given orally to each piglet in the different groups 14 days after the beginning of the treatment (Day 14).

Bacteriology and necropsy: Rectal swabs were collected 2d before and every 2d after the challenge with *S. Typhimurium* and were processed as described below. Fourteen days after the challenge (Day 28), pigs were euthanatized and the necropsy was performed within 20 min, to avoid post mortem bacterial invasion of tissues. Tissues collected for bacteriology were tonsils, liver, spleen, middle ileum, colon and mesenteric lymph nodes (MLN). One gram of each tissue or of feces was homogenized in 9 mL NB and incubated for 18 h at 37° C. One mL of NB of each specimen submitted to the primary enrichment was inoculated into 9 mL of tetrathionate brilliant green (BBL, Cockeysville, Maryland, USA) and incubated for 24-48 h at 37° C, for selective enrichment. Then, one loopful (10 µL) of the selective enrichment media was inoculated on Brilliant green sulfa agar (BGS, Difco) containing novobiocin (Sigma

Chemical Co., St-Louis, Missouri, USA) at 20 µg/mL and incubated for 24-48 h at 37° C. Lactose negative colonies were examined biochemically by inoculation on urea and Triple sugar iron slants (Difco). Colonies that corresponded to *Salmonella* spp. were tested for agglutination by using polyvalent O-antisera (Poly AI-Vi, Difco) and *Salmonella* isolates were serotyped under the supervision of Dr. C. Poppe, Health Canada in Guelph, Ontario, Canada. Quantitative bacteriology was done on MLNs. Dilutions of homogenized tissues were made in PBS and colony forming units (cfu) were evaluated by plating dilutions on BGS agar. Colonies that corresponded to *Salmonella* were identified as described above.

Fecal flora evaluation. An evaluation of fecal bacterial populations was done. Rectal swabs saturated by manure at Day 14 ($0,5 \text{ g} \pm 0,04$) were smeared on glass slide and stained by the Gram procedure. Evaluation was performed by bacterial population counts in 5 fields at 1000x magnification and the predominant organism, as assessed by shape and Gram stain, was noted for each group. Results are expressed as median number of bacteria and the *P*-value was determined by a non-parametric Mann-Whitney test.

PFGE analysis. Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was carried out to compare the DNA profiles from *Salmonella* strains isolated from each animal to the profile of the experimental strain of *S. Typhimurium*. The DNA was extracted and digested with *SpeI* as described previously (18). DNA fragments were separated by

electrophoresis in a 1.2% agarose gel at 200 V with a linear ramp switch time of 5 to 25 s for 18 h with a Gene Navigator apparatus (Pharmacia, Sweden).

RESULTS

Following the experimental infection, 70% of the control pigs were colonized by *S. Typhimurium* in the gut and 60% were infected in mesenteric lymph nodes (MLN) (Table 5.1). There was no significant difference in numbers of *S. Typhimurium* in MLN (data not shown) between the different groups. Bacterial counts of less than 30 cfu were observed in the MLN collected for quantitative evaluation.

No beneficial effect was observed when Endovac-bovi was used as a vaccine. In treated pigs, 100% of pigs were shedding the organism during the last 2 samplings. *Salmonella* were recovered from 90% of MLN but only 30% of the ileal samples and 50% of the colon samples at post mortem. On the other hand, a reduction of the presence of the bacteria in the MLN was noted with the SC54 vaccine, in comparison to the control group. No change was observed in the shedding of the bacteria in feces. However, a significantly lower prevalence in the ileum ($P < 0.05$, Fisher test) was noted, and the distribution in other tissues was similar to that of the control group. Furthermore, SC54 treated pigs had a good concordance between fecal shedding at the last sampling (Figure 5.1) and the presence of the bacteria in MLN, ileum, and colon. Acidification of the drinking water and administration of egg yolk-specific immunoglobulins directed against *S. Typhimurium* were not effective in reducing infection by *Salmonella* in swine.

Prebiotics such as fructooligosaccharides (FOS) and Flavomycin were associated with the tendency, although not statistically significant, to reduce the shedding of *S. Typhimurium* in feces. Flavomycin reduced the shedding of *S. Typhimurium* for only a few days after the experimental infection but we also observed a tendency to reduce the presence of the bacteria in MLN. The presence of FOS in the drinking water also had the tendency to reduce the level of shedding (Figure 5.1) but this effect was not observed when FOS was given in feed. Probiotics such as Ferlac-2 slightly reduced the presence of bacteria in MLN and other tissues; however, no effect was observed on shedding and only a slight reduction of the carrier state was noted when it was given in the feed. The use of FOS and Ferlac-2 together in the feed had no effect on *Salmonella* infection in swine (Table 5.1).

The use of probiotics and prebiotics induced changes in the microbial flora in colon (Table 5.2). A predominantly Gram positive microflora was noted in pigs supplemented with FOS, Ferlac-2 or FOS in combination with Ferlac-2.

No clinical signs were noted in pigs throughout the experiment. A PFGE analysis was done in order to compare the DNA profiles from *Salmonella* strains isolated from each infected animal to the profile of the challenge strain of *S. Typhimurium*. To conclude that an animal had become a carrier of the experimental infection strain of *Salmonella*, the DNA profiles had to be the same. The DNA profiles of all but two strains recovered from infected animals were identical to the profile of the challenge strains. The only animal from which other *Salmonella* DNA profiles were observed

were not considered in the compilation of the results. The DNA profile appeared similar that of a *Salmonella* Derby serovar.

DISCUSSION

Pigs leaving the farm are considered to be the main source of abattoir contamination by *Salmonella* (19). It is thus believed that pigs represent an important reservoir of *Salmonella* spp. and can spread the bacteria throughout the abattoir environment. Carrier pigs are positive for *Salmonella* in mesenteric lymph nodes, tonsils, colon or feces (11,20) and development of control measures to reduce fecal or lymph node carriage of *Salmonella* in live animals would be an important step in the reduction of this pathogen in meat products.

Salmonella spp. are facultative intracellular pathogens that can avoid humoral immunity in the intracellular environment, suggesting that a strong cellular response is needed for the elimination of this pathogen (21). Vaccination of pigs with SC54 vaccine, a *S. Choleraesuis* var *kunzendorf* avirulent live strain, has been reported to be beneficial in protecting pigs against the development of clinical disease from infection by virulent *S. Choleraesuis* (22). In this study, the use of SC54 before experimental infection with *S. Typhimurium* resulted in a decrease in the bacteria in the MLN suggesting that the use of an avirulent, live *S. Choleraesuis* vaccine can prevent the colonization of MLN by *S. Typhimurium*. The significant reduction in prevalence observed in the ileum would suggest that a stimulation of local defense mechanism, such as an increase of immunoglobulins A, could also be involved in the vaccine's

mechanism of action. Other live *Salmonella* vaccines for reduction of *Salmonella* were studied in the past (25), but the use of the Typhimurium serovar in vaccine, given the zoonotic potential of this serotype, may raise some concerns in the context of the on-farm control of foodborne pathogens.

It is recognized that prebiotic and probiotic supplements promote colonization by beneficial microorganisms (23). We observed in this study that probiotics and prebiotics changed the fecal bacterial flora: bambarmycins had a tendency to reduced the colonization of MLN and FOS to reduced the shedding of *Salmonella*. The mechanism by which probiotic and prebiotic supplements affect the microecology of the intestinal tract was recently studied. It was suggested that one or more of the following mechanisms may be involved: competition for nutrients (24), production of inhibitory substances or antimicrobials that inhibit growth of certain enteropathogens (23), competition for receptors or adhesins of the intestinal mucosa (23) and finally, immunomodulation such as macrophage activation (26), an increase in IgA production (27), cytokine production and an increase of T and B cells (28).

In a previous study (29) Ferlac-2, used as a paste was found to be more efficient in reducing colonization of MLN and other tissues by *S. Typhimurium*, in comparison to administration in feed. This method of administration provided a constant concentration of probiotic bacteria in the gut and competitive exclusion. In this mechanism, microflora develop and adhere to the mucosal surfaces of the intestinal tract. This prevents pathogenic bacteria from colonizing and thus excludes them from lining the intestine. This study, as well as the investigation in horses by Parraga *et*

al.(30), indicated that the probiotic was not effective in reducing shedding of *Salmonella*. Thus, it appears that this exclusion mechanism is not sufficient to avoid the survival and replication of *Salmonella* in mucus blanket without massive colonization of the cells of the mucosa.

The presence of FOS in water considerably reduced the shedding of *S. Typhimurium* in feces and changes were observed in gut microbial composition of selected sections of the intestinal tract. Changes in microbial flora composition may be achieved by different mechanisms. Colonization of the mucosa by *Salmonella* can be reduced by direct antagonism mediated by antibacterial agents produced and secreted by the microflora organisms (31). The combination of FOS with Ferlac-2 was not efficient suggesting that probiotics and prebiotics, given together, became antagonists. Flavomycin, consisting of bambarmycins, is used to control pathogenic bacteria in poultry, swine and cattle, has been investigated in *Salmonella* challenge models in swine, and results showed that Flavomycin significantly reduced the rate and the magnitude of *Salmonella Typhimurium* shedding in pigs (32). In the present study, Flavomycin, at the concentration used, was effective in reducing the presence of *Salmonella* in MLN but did not the shedding. It was shown that *Lactobacillus* spp. can stimulate local immunity (23), and this may explain the reduction of *Salmonella* in tissues. However, since the shedding was not affected by the microbial changes observed, it would suggest that this competitive flora was not efficient in avoiding the colonization of the intestine by *Salmonella*. The supplementation of feed by egg yolk immunoglobulins directed against *S. Typhimurium* was not efficient in reducing the shedding or colonization of MLN by this bacteria. It is thus probable that

immunoglobulins from eggs were altered by the swine digestive tract and failed to recognize *Salmonella* before its penetration of the mucosa.

Finally, we observed that while only 10% of the control pigs were shedding the bacteria in the feces at the last sampling, most of the animals were positive in MLN at that time. This would suggest that, in most instances, the duration of shedding is limited and that the carriage state in MLN is established soon after the infection.

In conclusion, it was observed that some probiotics and prebiotics can alter the composition of the gut microflora to the benefit of the host. On the other hand, vaccination with SC54 showed a significant reduction in the presence of *S. Typhimurium* in the ileum and lower, but not significantly different, percentages in the MLN, suggesting a potential effect to reduce the carrier state of *S. Typhimurium* in ileum in swine. Field experiments should be done to evaluate the potential efficiency of treatments where a level of natural *Salmonella* contamination occurs. Resistance to the infection was also noted in 30-40% of experimentally infected pigs, suggesting a natural host resistance to *Salmonella* infection in some animals. A comprehensive study on host response to SC54 vaccine, probiotics and prebiotics is needed to better understand the protection against *Salmonella* infection achieved by these treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Louise Beausoleil and Julie Paré for their help in this project. This work was supported by F. Ménard inc. and the Canadian Food Inspection Agency.

REFERENCES

1. Beran GW. Human health hazards from meat and meat products. Leman A. D. Swine Conference. Ames : Iowa State University Food Safety Consortium, 1995 :72-79.
2. Bryan FL. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne disease. J Food Prot 1988; 51:663-667.
3. Schwartz K. Salmonellosis in Midwestern swine. Proc 94th Ann Meet US Anim Health Assoc. Denver, Colorado. 1990 :443-449.
4. Buxton A., Fraser G. *Salmonella*. In Buxton A, Fraser G, eds. Animal microbiology. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1988 :103-115.
5. Letellier A, Messier S, Quessy S. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. Vet Microbiol 1999. In press.
6. Wilcock BP, Schwartz KJ. Salmonellosis. Leman, A.D., Straw, B., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D. (Eds.). Diseases of swine. 7th ed. Ames : Iowa State University Press. 1992.
7. Newell KW, Williams LP Jr. The control of *Salmonellae* affecting swine and man. J Am Vet Med Assoc 1971; 158 (1):89-98.

8. Letellier A, Messier S, Quessy S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J Food Prot* 1999; 62:22-25.
9. Roof MB, Roth J, Kramer TT. Porcine salmonellosis: Characterization, immunity, and potential vaccines. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1992; 14:411-423.
10. Reed WM, Olander HJ, Thacker HL. Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *S. choleraesuis* var *kunzendorf* infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* 1986; 47:75-83.
11. Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 1989; 50:1015-1021.
12. Kramer TT, Rhiner J, Beran GW. *Salmonella* carrier detection at slaughter. Ames, IA, Iowa State University Extension. 1995.
13. Wood RL, Rose R. Populations of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. *Am J Vet Res* 1992; 53:653-658.
14. Fedorka-Cray PJ, Bailey JS, Stern NJ, Cox NA. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *Proc. of the second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. 1997:164-165.

15. Nisbet DN, Anderson RC, Buckley SA, Fedorka-Cray PJ, Stanker LN. Effect of competitive exclusion on *Salmonella* shedding in swine. Proc. of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. 1997:176.
16. Vanschie FW, Overgoor GHA. An analysis of the possible effects of different feed upon the excretion of *Salmonella* bacteria in clinically normal groups of fattening pigs. The Veterinary Quarterly 1987; 9:185-188.
17. Wingstrand A, Dahl J, Thomsen LK, Jorgensen L, Jensen BB. Influence of dietary administration of organic acids and increased feed structure on *Salmonella* Typhimurium infection in pigs. Proc. of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. 1997:170-172.
18. Schwarz S, Liebisch B. Pulse-field gel electrophoretic identification of *Salmonella* enterica serovar typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. Letters Appl Microbiol 1994; 19:469-472.
19. Gray JT, Fedorka-Cray PJ. Salmonellosis in swine: A review of significant areas affecting the carrier state. In: Proceeding of the First International Symposium on Ecology of *Salmonella* in Pork Production. 1996: 80-103.

20. Wilcock B, Olander H. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance, and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella typhimurium*. J Am Vet Med Assoc 1978; 172:472-477.
21. Sell S. Immunology, Immunopathology, and Immunity. Elsevier, 4th edition. New-York. 1987. pp. 1-317.
22. Kramer TT, Roof MB, Matheson RR. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. Am J Vet Res 1992; 53:444-448.
23. Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand J Gastroenterol 1997; 222:28-31.
24. Saavedra JM. Microbes to fight microbes : A not so novel approach to controlling diarrheal disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995; 21 :125-129.
25. Coe NE, Wood RL. The effect of exposure to a $\Delta cya/\Delta crp$ mutant of *S. Typhimurium* on the subsequent colonization of swine by the wild-type parent strain. Vet Microbiol 1992; 31:207-220.
26. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbaton . Immune system stimulation by probiotics. J Dairy Sci 1995; 78:1597-1606.

27. Kailam M, Isolaurie Soppie E. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human lactobacillus strain. *Pediatr Res* 1992; 32:141-4.
28. Perdigon G, Alvarez S. Probiotics and the immune state. Fuller R., editor. *Probiotics. The scientific basis*. London: Chapman & Hall. 1992: 45-80.
29. Letellier A, Messier S, Quessy S. Control of *Salmonella* spp. by use of probiotics. *Proc. of the second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. 1997: 160-163.
30. Parraga ME, Spier SJ, Thurmond M, Hirsh D. . A clinical trial of probiotic administration for prevention of *Salmonella* shedding in the postoperative period in horses with colic. *J Vet Intern Med*. 1997; 11:36-41.
31. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 70:347-358.
32. Francisco CJ. Competitive exclusion and microflora management strategy for the swine industry. *American Association of Swine Practitioners* 1999: 229-232.

Table 5.1. Recovery of *S. Typhimurium* from tissues and feces after experimental infection of pigs receiving various treatment (percentage of animals positive).

Groups	Liver	Spleen	Tonsils	MLN	Ileum	Colon	Feces
Control	10%	0%	20%	60%	70%	10%	30.0% ^a
Endovac	10	10	40	90	30	50	80.0
SC54	10	10	40	20	0 ^b	10	42.5
Water Acidification	0	10	10	90	80	40	22.5
FOS in water	50	30	10	60	50	10	7.5
FOS in feed	40	10	70	50	40	30	25.0
Ferlac-2 in feed ^c	0	11	44	44	89	33	75.0
Ferlac-2 + FOS	10	0	40	100	70	40	57.5
Flavomycin	10	0	40	30	50	40	27.5
Egg-yolk	0	0	60	50	70	10	35.0

Endovac-bovi-endotoxin vaccine, SC54-live *S. Choleraesuis* avirulent vaccine, FOS-fructooligosaccharides, Ferlac-probiotics; MLN-Mesenteric lymph nodes

^a Percentage as number of positive samples in relation to the maximum possible number of positive samples

^b Significantly different from control group ($p < 0.05$, Fisher test)

^c In this group, one piglet died during the experiment

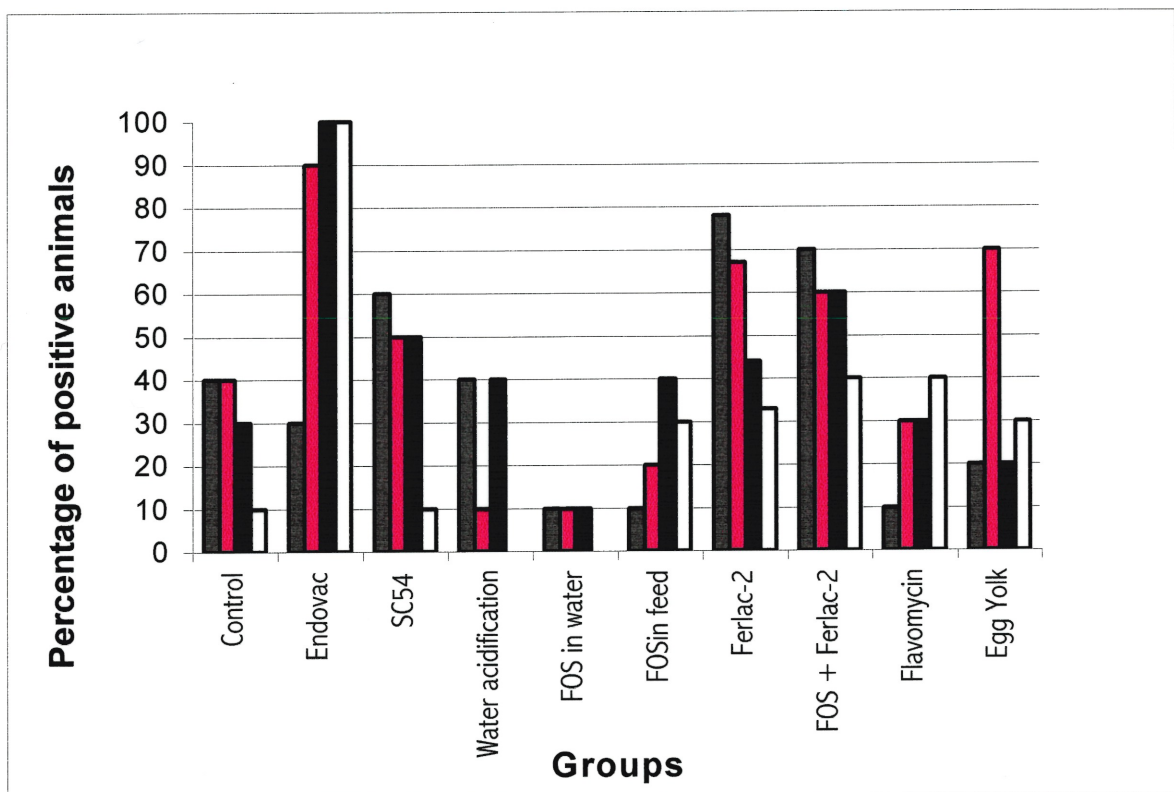
Table 5.2. Evaluation of bacterial flora in the colon of treated and control pigs

Groups	Predominant flora	Median number of bacteria
Control	Gram positive and -negative rods	3.6
FOS in feed	Gram positive rods and coccoïd bacteria	83.0*
Ferlac-2 + FOS	Gram positive rods and coccoïd bacteria	68.1 *
Ferlac-2 in feed	Gram positive rods and coccoïd bacteria	65.4 *
SC54	Gram positive and -negative rods	42.2
Flavomycin	Gram positive rods	63.9 *
Egg yolk Ig	Gram positive and -negative rods	27.1

FOS-fructooligosaccharides

* *P*- value < 0.001 (Mann-Whitney) in comparison to control group

Figure 5.1. Shedding of *S. Typhimurium* in feces following the experimental infection of pigs in each group. Results were expressed as the percentage of positive animals for *Salmonella* shedding in each group. Rectal swabs were taken every 2 d for an 8-day period after experimental infection. The gray bar represents 2 d after experimental infection, the red bar represents Day 4, black bar represents Day 6 and white bar represents Day 8 after the experimental infection.



CHAPITRE 6

Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine

Soumis pour publication dans Canadian Journal of Veterinary Research

Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine

A. Letellier¹, S. Messier¹, L. Lessard², S. Chénier² and S. Quessy²

¹ Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 rue Sicotte, St-Hyacinthe,
Québec, Canada

² Santé Canada, Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire, 3400 Casavant Ouest, St-
Hyacinthe, Québec, Canada

RÉSUMÉ

Dans cette étude, la réponse immunitaire de l'hôte a été évaluée, suite à l'administration de différents traitements tels l'utilisation d'agents probiotiques, prébiotiques et la vaccination, afin de réduire la présence de *Salmonella* chez le porc. La réponse de l'hôte aux différents traitements a été évaluée en étudiant le taux de phagocytose par cytométrie en flux, l'activation des phagocytes du sang total par bioluminescence, la production d'IgA dirigés contre *S. Typhimurium* et par un examen histopathologique des tissus. Des différences significatives ont été observées au niveau de l'activation des phagocytes sanguins dans tous les groupes de porcs traités ($P=0.0001$). Chez les porcs vaccinés au SC54™, une réduction significative de la colonisation de l'iléon par *Salmonella* a été observée ($P < 0.05$) ainsi qu'un taux d'IgA dirigés contre *S. Typhimurium* plus élevé dans ce groupe en comparaison aux porcs contrôles non infectés ($P=0.0007$). De plus, chez les porcs vaccinés au SC54™, des changements histopathologiques significatifs ($P < 0.05$) ont été notés. La hauteur des villosités ainsi que la densité de la couche de mucus et des cellules à gobelets dans l'iléon ont été réduites chez les animaux vaccinés comparativement aux animaux contrôles infectés. Ces observations suggèrent que le vaccin SC54™ peut stimuler l'immunité locale et réduire la présence de *Salmonella* au niveau de l'iléon chez le porc. L'utilisation de ce vaccin vivant devrait être considérée dans des études en conditions naturelles d'infection.

ABSTRACT

Host-response was evaluated following the administration of various treatments as probiotics, prebiotics and vaccination, to reduce *Salmonella* in swine. Response to the treatments were studied by the evaluation of phagocytosis rates by flow cytometry, by studying the activation of whole-blood phagocytes by bioluminescence, the production of IgA against *S. Typhimurium*, and by histopathology. Significant differences were observed in the activation of whole-blood phagocytes in all groups of treated pigs ($P=0.0001$). In SC54TM vaccinated pigs, a significant reduction of *Salmonella* in the ileum was observed ($P < 0.05$) and the production of IgA against *S. Typhimurium* was higher in this group in comparison to uninfected control pigs ($P=0.0007$). Furthermore, significant histopathological ($P < 0.05$) changes were observed in SC54TM vaccinated pigs. Villi height and mucus and goblet cells density in the small intestine were reduced in vaccinated pigs in comparison to infected control pigs. Taken together, these findings suggest that SC54TM vaccine can stimulate local immunity and reduce the presence of *Salmonella* in the ileum in swine. Use of SC54TM vaccine should thus be considered in further field experiments.

KEY WORDS : Carrier state, shedding, swine, *Salmonella*, immune response, vaccination

INTRODUCTION

Salmonellosis is one of the most economically important enteric and septicemic diseases affecting growing pigs in many parts of the world (1). *Salmonella* Typhimurium is the most frequently reported *Salmonella* serovar from human sources and typically causes acute gastroenteritis (2). Failure to control *Salmonella* infection in meat animals has resulted in salmonellosis becoming one of the most important zoonoses in developed countries. In a study of food-borne disease from 1977 to 1984 (3), it was noted that pork was responsible for 11% of the *Salmonella* outbreaks attributed to meat. Bean and Griffin (4) reported that from 1973 to 1987, pork was the food vehicle for 25 food borne outbreaks on a total of 252 in United States. Carrier pigs are a source of contamination at slaughter. In pigs, transmission is thought to occur by pig-to-pig contact or from exposure to the contaminated environment (5). In many countries, efforts are being made at a farm-level to reduce the incidence of infected live animals (6,7,8,9). There is a need to increase the animal resistance to *Salmonella* for the establishment of efficient on-farm control strategies.

The aim of this study was to evaluate host responses to the following treatments : probiotics (Ferlac-2™), fructooligosaccharides (FOS), vaccination with a live attenuated *S. Choleraesuis* strain (SC54™), and their efficacy in controlling *Salmonella* infections in pigs.

MATERIAL AND METHODS

Animals : Early-weaned 12 day-old *Salmonella* free piglets, shown to be free of *Salmonella* by a rectal swab culture, were randomly assigned to either control or treatment groups. Each infected group was initially composed of 10 pigs and uninfected control group was composed of 5 pigs. Clinical signs were monitored daily throughout the experiment.

Pig treatments : Fructooligosaccharides (FOS, 1% in feed; Encore Technologies, Minnesota, USA); probiotics Ferlac-2™ (F2, 2×10^9 colony-forming-units (cfu)/day in feed, Rosell Institute, Montreal, Canada, composed of *Lactobacillus acidophilus* (4%), *L. rhamnosus* (65%), *Enterococcus faecium* (25%), *Streptococcus thermophilus* (5.9%) and *L. bulgaricus* (0.1%)) and intranasal vaccination (SC54™, Boehringer, Ridgefield, USA.) were used in this study.

Experimental design : Each infected group was composed of 21-day-old piglets. The SC54™ vaccination was done one time at Day 0. Other groups were supplemented from Day 0 to Day 28 with each treatment described above (FOS, FOS+F2, F2). All groups were infected at Day 14 and necropsied at Day 28. Infected control group (CTL) was not supplemented but infected and the uninfected control group was not supplemented and not infected. Each group was housed in separate controlled facilities.

Challenge : A field isolate of *Salmonella* Typhimurium, obtained from a septicemic pig (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal) was used. *Salmonella* Typhimurium was inoculated into Nutrient broth (NB, Difco, Detroit, MI) and incubated at 37°C for 18 h. This culture was used to inoculate fresh NB tubes (1:100), that were also incubated at 37°C and bacteria in log phase were used for the challenge. A dose of 10^7 cfu was individually given orally to piglets in groups vaccinated, supplemented and control, 14 d after the beginning of each treatment (Day 14).

Necropsy and bacteriology: As previously described by Letellier et al., (14), fourteen days after the challenge (Day 28), pigs were euthanized by intravenous injection of Euthanyl (MTC Pharmaceutique Ltée, Cambridge, Ont. Canada) and necropsied. Tonsils, liver, spleen, middle ileum, colon, and mesenteric lymph nodes (MLN) were collected for bacteriology. One gram of each tissue or fecal sample was homogenized in 9 mL NB and incubated 18 h at 37°C. One mL of NB of each specimen in the primary enrichment was transferred to 9 mL of Tetrathionate Brilliant Green (BBL, Cockeysville, MD) and incubated for 24 h at 37°C, for selective enrichment of *Salmonella* spp. Then, one loopful (10 µL) of the selective enrichment media was inoculated in Brilliant Green Sulfa agar (BGS, Difco, Detroit, MI) containing novobiocin (Sigma Chemical Co., St.-Louis, MO) at 20 µg/mL and incubated for 24-48 h at 37°C. Lactose negative colonies were tested biochemically on urea and triple sugar iron slants (Difco, Detroit, MI). Colonies with reactions characteristic of *Salmonella* spp. were tested by agglutination with a polyvalent O-antisera (Poly Al-Vi, Difco, Detroit, MI) and *Salmonella* isolates were serotyped at the

Office International des Épizooties (OIE) *Salmonella* Reference Laboratory, Health Canada, Guelph, Ontario, Canada.

Collection of blood samples: Peripheral venous blood from the branchiocephalic trunk was collected on Day 0 (before treatment) and Day 14 (after treatment and before challenge) in tubes containing heparin as anticoagulant. Total and differential leukocyte counts were performed with an Abbott Cell-Dyn 3500 hematologic counter (Abbott Laboratories, Rungis, France) at the hematology laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal. If necessary, cells concentration was adjusted with phosphate buffer saline (PBS) to approximately 1.0×10^7 cells/mL. Analyses were done within 60 min after collection of blood samples.

Activation of phagocytes by chemiluminescence assay: Whole blood was collected as described above and used immediately to study the myeloperoxidase activity associated with phagocytosis activity as described by Tatsuhiro *et al.* (10). Briefly, 200 μ L of whole blood was pre-equilibrated at 37°C in the luminometer chamber for 10 min and 200 μ L of luminol solution (10^{-4} M) with 400 μ L of PBS added. Background activity was monitored for 10 min before activation. The phagocytic response was stimulated with phorbol myristate acetate (PMA, 200 μ L, 10 μ g/mL), a soluble initiator of the metabolic burst. The samples were mixed, incubated at 37°C and the light emission was recorded over a period of 60 min. These results were plotted as difference of light emission between activation level after (Day 14) and before (Day 0) treatments or vaccination.

Labelling of *S. Typhimurium*: The strain was grown for 4 h in NB at 37°C, and the bacteria were washed and resuspended in PBS at a concentration of 10^9 cfu/mL. A volume of 1 mL of bacterial suspension and 25 μ L of a 20 mg/mL fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma, St.-Louis, MO, USA) solution were mixed by rotation (100 RPM) for 60 min at 37°C. The FITC-labelled bacteria were washed 3 times in PBS and suspended in PBS to a final concentration of 10^9 cfu/mL. Confirmation of the bacterial fluorescence was provided by flow cytometry and fluorescence microscopy. Bacterial suspensions were immediately used for the phagocytosis assay.

Phagocytosis assay using flow cytometry: As described by Busque et al. (11), 100 μ L samples of whole blood or whole blood diluted with PBS from each animal at Day 0 and Day 14, were incubated with 10 μ L of live FITC-labelled *S. Typhimurium* and FITC-latex beads (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) as inert control. Samples were incubated for 30 min at 37°C, and phagocytosis was stopped by the addition of 4 mL of ice-cold PBS. Erythrocytes (RBC) present in samples were lysed using Immuno-Lyse reagent (Beckman Coulter, Miami, USA) as described by White-Owen et al. (12). Cells were then fixed by addition of 200 μ L of 2% (w/v) paraformaldehyde solution. Phagocytosis rates were obtained by subtracting the percentage of phagocytosis at 4°C (adherence control) from the percentage of phagocytosis obtained at 37°C. Flow cytometry analyses were performed on a FACStar flow cytometer (Becton Dickinson, model 2350, Qume Drive, San Jose, CA, USA) using 488 nm line of an argon ion laser and a 200-mV light output. Data were acquired in mode list for 10,000 events and analyzed by Consort 30 software. The flow system was equipped with a 75 μ m nozzle tip, and the analysis was performed at

a flow rate of 1,000 events per sec. Green fluorescence (FITC) was collected with a 530/30 nm filter.

IgA detection by ELISA : A 10 cm portion of ileum was removed from each pig and washed in 5 mL of PBS (pH 7.2). This preparation was centrifuged and the supernatant was filtered through a 0.22 μ m filter. Each preparation was tested in PBS-Tween (100 μ L) in the ELISA test. The IgA titer was evaluated by an ELISA using the filtrated supernatant from heat-extracted surface membrane antigens of *S. Typhimurium* that were enzymatically treated. NuncTMPolysorplates (Nunc, Denmark) were coated with the final dilution of 1/100 in 0.05M carbonate buffer pH 9.6 (Sigma), corresponding to 1.25 μ g of total sugar per well. Plates were incubated overnight at 4°C and blocked with 0.3% caseine for 30 min. Plates were then washed with NaCl-Tween and supernatant was added at different dilutions for 1.5 h at 37°C. Plates were washed and anti-swine IgA-Horseradish-peroxydase conjugate (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Tx, USA) was added for 1 h at 37°C. After washing the plates, a colour reaction was obtained by adding ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid), Sigma, St-Louis, MO, USA) in citrate buffer (Sigma). Plates were read at 414 nm in a Bio-Rad apparatus and sample.

Histopathology: Evaluation of lesions was done in vaccinated, control and uninfected groups and analysis of measurement parameters was done with the help of a computer analysis system with a camera linked to an image processing and analysis system (Quantimet 500, Leica Cambridge Ltd, England). Tissues were fixed in 10% buffered

formalin for routine processing, paraffin-embedded, sectioned at 3–4 μm , and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES). Preparations for mucus and goblet cells analysis were stained with Periodic-acid Schiff (PAS). Mesenteric lymph nodes (MLN) and small intestine preparations were analysed to determine the follicular area and cellular density in MLN (magnification of 100x); length of the villi (100x), the area of the Peyer's patches (100x), the cellular density in villi (250x) and the mucus and goblet cell density in small intestine (250x). For each examination, 5 fields were analysed by a pathologist without knowledge of treatment groups.

Statistical analyses: A Mann-Whitney non parametric test was used for the histopathology analyses, phagocytosis assay and IgA production. To determine the significance of the activation of phagocytes, ratios of treatment groups (FOS, F2, FOS+F2 and SC54) were compared to that of control group using a repeated measures ANOVA. Group, time and Group*time effects were examined.

RESULTS

No clinical signs were noted in the pigs throughout the experiment. In the PMA-induced chemiluminescence response of whole blood phagocytes from treated and control pigs, differences in the activation were observed between control and treated pigs ($P=0.0001$). In comparison to control pigs, Ferlac-2™, FOS in combination with Ferlac-2™, and SC54™ vaccinated pigs had significantly higher cell activation level ($P=0.009$, $P=0.001$ and $P=0.04$ respectively) whereas treatment with FOS alone was not found to activate whole blood phagocytes (Figure 6.1).

No significant difference was noted between groups in the phagocytosis assay using whole blood phagocytes. A slight increase in latex beads phagocytosis was noted for all groups at Day 14 (ratio >1). On the other hand, at Day 14, all groups, including control, showed a reduction in the *S. Typhimurium* phagocytosis rate indicated by a ratio < 1 (Figure 6.2).

Results on IgA detection in the small intestine indicated that SC54™ vaccinated pigs had a higher titer of IgA in ileum (median OD=0.721) in comparison to uninfected control pigs (OD=0.063, $P=0.0007$) and other groups (OD=0.136 to 0.677) (Table 6.1).

Histopathologic exams revealed significant differences in the small intestine. The villi height was shorter for vaccinated pigs in comparison to infected control and uninfected control pigs ($P<0.05$). The density of mucus and goblet cells was significantly lower in infected control and vaccinated pigs ($P<0.05$) in comparison to uninfected control pigs. Finally the cellular density in MLN tend to be higher in vaccinated pigs in comparison to infected control group (Table 6.2).

DISCUSSION

Host response is crucial to eliminate pathogens. Acquired resistance to infectious disease may be expressed by a predominantly humoral or a cellular mechanism or, more frequently, by a combination of both mechanisms (13). The host response involves

three different cell types: phagocytes, thymus-dependent (T) lymphocytes, and thymus-independent (B) lymphocytes. The normal, unstimulated phagocytic cell is able of killing most nonpathogenic bacteria that gain entry to the tissues. However, the presence of opsonic antibodies and activated macrophages are required to eliminate pathogenic intracellular pathogens or facultative intracellular pathogens such as *Salmonella* or *Listeria monocytogenes*.

We recently described the colonization of various tissues by *Salmonella* in control and treated pigs using vaccination and supplementation with prebiotics and probiotics (14). In this latter study, colonization in mesenteric lymph nodes (MLN) for SC54™ vaccinated pigs was reduced in comparison to the infected control group and a significant reduction of recovery of *Salmonella* in ileum was also noted. In the present study, phagocytosis from whole-blood phagocytes was not increased after supplementation or vaccination, suggesting that systemic stimulation of phagocytes was not sufficient to increase resistance to *S. Typhimurium*.

Supplementation with Ferlac-2™ or FOS in combination with Ferlac-2™ activated phagocytes without a significant reduction in number of animals with ileum colonization. However, significant activation of whole blood phagocytes accompanied by a significant reduction in the number of animals from which *Salmonella* was recovered from the ileum was observed after SC54™ intranasal vaccination. These results suggest that the local immune response might be involved in the reduction of *Salmonella* in the MLN and the ileum.

We therefore studied the local immune response, particularly production of IgA in the small intestine. Most pigs vaccinated with SC54™ were protected from colonization by *S. Typhimurium* in the MLNs during experimental infection and these pigs showed a significantly higher IgA titer in the small intestine in comparison to uninfected control group. In the group supplemented with Ferlac-2, the IgA titer was also higher than that of uninfected control group, without reduction of colonization in the ileum and MLNs, suggesting that the increase of IgA by itself is not sufficient to protect pigs from *Salmonella* colonization. These observations suggest that local immunity including IgA production, cellular immunity and the cytokine network, is involved in the reduction of *S. Typhimurium* in MLN and ileum in vaccinated pigs. Indeed, there was a tendency to an increase in the cellular density in MLN with the use of live vaccine SC54™. It suggests an increased in the number of lymphocytes, plasmocytes or other secretory cells.

Histopathologically, there was a significant reduction of villi length in the ileum in vaccinated pigs in comparison to infected control and uninfected control pigs, suggesting a destruction of villi and a possible reduction of adhesion receptors. Bayer *et al.* (15) in chickens and Wallis *et al.* (16) in rabbits, reported that animals infected with *Salmonella* had areas on their intestinal mucosal cells devoid of microvilli or with microvilli shortened by loss of their tips. The carriage reduction of *Salmonella* in the ileum and the MLNs in vaccinated pigs might be associated with the loss of adhesion receptors for *Salmonella*.

Density of mucus and goblet cells in small intestine was significant lower in infected and vaccinated pigs in comparison to uninfected pigs, suggesting a reduction in mucus secretion or in the number of goblet cells. Arnold *et al.*, (17) also observed a reduction of intestinal mucus production in murine salmonellosis which was associated with an increased level of tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

In summary, these findings show that vaccination with SC54TM, administrated intranasally at weaning, has immuno-enhancing properties and reduces the presence of *S. Typhimurium* in the ileum of swine. Field studies are now being performed in order to evaluate the efficacy of vaccination with SC54TM. Furthermore, histopathological changes in the mucosa and submucosa of the ileum of pigs vaccinated with SC54TM, suggest that the local response to this treatment may be important in the outcome of the infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank, Dr. Julie Paré and Louise Beausoleil for their professional advice or technical help in this project. This work was supported by F. Ménard Inc. and The Canadian Food Inspection Agency.

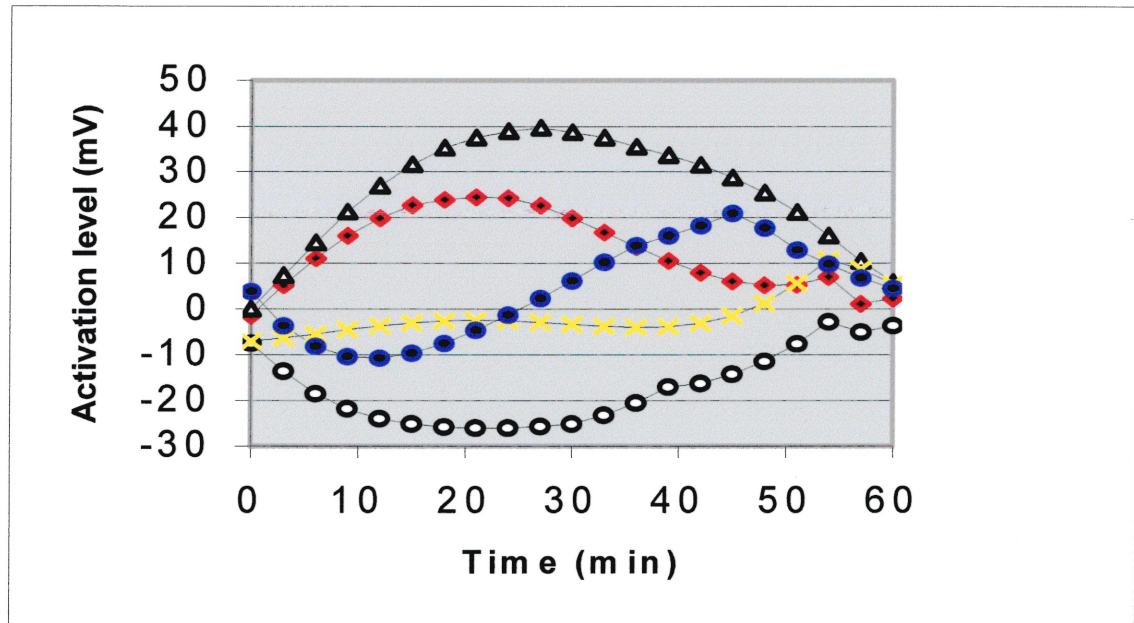
REFERENCES

1. **REED WM, OLANDER HJ, THACKER HL.** Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *S. choleraesuis* var *kunzendorf* infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* 1986; 47:75-83.
2. **LAX AJ, BARROW PA, JONES PW, WALLIS TJ.** Current perspectives in salmonellosis. *Br Vet J* 1995; 151:351-377.
3. **BRYAN FL.** Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne disease. *J Food Prot* 1988; 51:663-667.
4. **BEAN NH, GRIFFIN PM.** Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles and trends. *J Food Prot* 1990; 53 :804-817.
5. **NEWELL KW, WILLIAMS LP Jr.** The control of *Salmonellae* affecting swine and man. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158 :89-98.
6. **WIERUP M.** Principles for integrated surveillance and control of *Salmonella* in swine production. In *Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. 1997:42-49.

7. **FEDORKA-CRAY PJ, BAILEY JS, STERN NJ, COX NA.** Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in pork. 1997:164-165.
8. **DAHL J, WINGSTRAND A, BAGESSEN DL, NIELSEN B.** *Salmonella* reduction at the farm level. In: 14th Congress Int Pig Vet Soc, Bologna, Italy. 1996.
9. **LETELLIER A, MESSIER S, QUESSY S.** Control of *Salmonella* spp. by use of probiotics. Proceedings of the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. 1997: 160-163.
10. **TATSUHITO T, UENO N, MATSUMOTO T.** Chemiluminescence of whole blood. A simple and rapid method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity in whole blood. Clin Immun Immunopath 1983; 26:66-75.
11. **BUSQUE P, HIGGINS R, SENECHAL S, MARCHAND R, QUESSY S.** Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. Vet Microbiol 1998; 63:229-238.
12. **WHITE-OWEN C, ALEXENDER JW, SRAMKOSKI RM, BABCOCK GF.** Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis. J Clin Microbiol 1992; 30: 2071-2076.

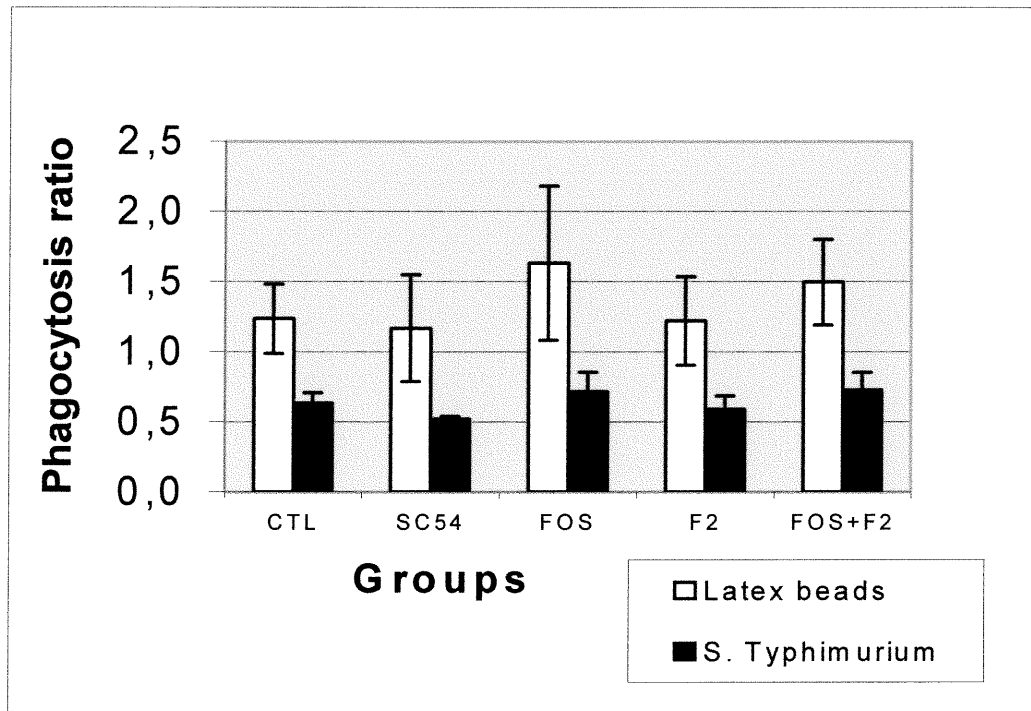
13. **COLLIN FM.** Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol Rev* 1974; 38:371-402.
14. **LETELLIER A, MESSIER S, LESSARD L, QUESSY S.** Assessment of different treatments to reduce *Salmonella* in swine. *Can J Vet Res* 2000; 64 :27-31.
15. **BAYER RC, GERSHMAN M, BRYAN TA, RITTENBURG JH.** Degeneration of the mucosal surface of the small intestine of the chicken in *Salmonella* infection. *Poult Sci* 1977; 56 :1041-1042.
16. **WALLIS TS, STRAKEY WG, STEPHEN J, HADDON SJ, OSBORNE MP, CANDY DC.** The nature and role of mucosal damage in relation to *Salmonella* Typhimurium-induced fluid secretion in the rabbit ileum. *J Med Microbiol* 1986; 22 :39-49.
17. **ARNOLD JW, KLIMPEL GR, NIELSEN DW.** Tumor necrosis factor (TNF-alpha) regulates intestinal mucus production during salmonellosis. *Cell Immunol* 1993; 15:336-44.

Figure 6.1. PMA-induced chemiluminescence response of whole blood phagocytes from treated and control pigs.



Legend : Each point represents mean activation value. The black curve represents the activation level of whole blood from pigs supplemented with the combination of FOS and Ferlac-2, the red curve represents the Ferlac-2 supplemented group, the blue curve represents the vaccinated (SC54) group, the yellow curve represents the group supplemented with FOS only and the white curve represents the control group.

Figure 6.2. Phagocytosis of *Salmonella* Typhimurium or latex beads by whole-blood phagocytes.



Legend : Results are represented by a phagocytosis ratio (Day 14/Day 0). The white bar represents the phagocytosis ratio of latex beads and the black bar represents the phagocytosis ratio of *Salmonella* Typhimurium. CTL represents the control group, SC54 represents the SC54 vaccinated group, the FOS represents the group supplemented with fructooligosaccharides, F2 represents the group supplemented with Ferlac-2 and FOS+F2 represents the group supplemented with the combination of fructooligosaccharides and Ferlac-2.

Table 6.1. Recovery of IgA in small intestine (median OD) from pigs from different groups and percentage of animals colonized by *Salmonella* Typhimurium in mesenteric lymph nodes (MLN) and ileum.

Groups	IgA	MLN	Ileum
Uninfected control	0.063	0% ^b	0% ^b
Infected control	0.240	60%	70%
SC54 TM	0.721 ^a	20%	0% ^a
FOS	0.136	50%	40%
Ferlac-2 TM	0.677 ^a	44%	89%
Ferlac-2 TM + FOS	0.364	100%	70%

^aMann-Whitney *P* value < 0.05 in comparison to uninfected and infected control pigs.

^bData of percentage of animals colonized by *Salmonella* Typhimurium in mesenteric lymph nodes and ileum was the first part of the study and were obtained from Letellier *et al.* Can J Vet Res 2000. 64 :27-31 (14).

Table 6.2. Histopathological analysis of tissues from SC54™ vaccinated, infected control and uninfected control pigs (median value)

Tissues	Uninfected Control	Infected control	SC54™ vaccinated
<i>Mesenteric Lymph Nodes</i>			
Follicular area (x1000 μm^2)	113,8	124,5	123,7
Cellular density (x1000 μm^2)	352,8	366,1	468,0
<i>Small intestine</i>			
Villi height (μm)	654,1	589,5	505,0 ¹
Peyer's patches area (x1000 μm^2)	367,6	423,9	391,0
Cellular density in villi (μm^2)	1474,0	2394,0	2184,0
Mucus/goblet cells (x1000 μm^2)	29,6	22,8	14,8 ¹

¹P value < 0.05 in comparison to uninfected and infected control group

CHAPITRE 7. DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans un premier temps, afin d'identifier les mesures de contrôles possibles pour les infections à *Salmonella* spp. chez le porc, il était primordial d'obtenir des données épidémiologiques de base telles la prévalence et la distribution dans les élevages. Nous voulions aussi, identifier des élevages contaminés et plus particulièrement des élevages démontrant une haute prévalence de ce micro-organisme afin de mieux comprendre la distribution de la bactérie à l'intérieur des élevages contaminés. Ces informations étaient un pré-requis à toute suggestion quant aux mesures de contrôle possibles à l'intérieur des élevages.

Toutefois, la problématique associée au contrôle à la ferme des infections à *Salmonella* spp. chez le porc apparaît assez complexe, puisque l'animal à la ferme, peut se contaminer par diverses sources. La transmission entre les animaux est fréquente, par l'alimentation ou par l'environnement à la ferme. L'identification des animaux porteurs de salmonelles ainsi que l'identification des sources de contamination par ce micro-organisme sont donc très importants afin de contrôler les infections à salmonelles chez l'animal vivant et de réduire conséquemment, le taux de contamination des carcasses à l'abattoir (figure 7.1).

La seconde partie du projet visait donc à réduire la pression d'infection dans les élevages contaminés par les salmonelles. Pour se faire, les sources de contamination ont été identifiées, afin de permettre de réduire les cycles de recontamination à la ferme. Ces résultats ont généré des données qui ont été intégrées dans le programme d'assurance qualité (modèle HACCP) à la ferme, présentement en vigueur au Canada (section 7.2).

Puisque les animaux porteurs asymptomatiques ont été identifiés comme source importante de contamination des élevages, notamment les animaux de remplacement, la dernière partie du projet visait à développer des stratégies de traitement des animaux positifs à salmonelles, afin de mieux contrôler ou même éliminer l'état de porteur (section 7.3).

7.1 Données épidémiologiques concernant la prévalence de *Salmonella* spp. dans les élevages porcins.

Le premier objectif du projet visait à préciser la prévalence de *Salmonella* spp. chez le porc en fin d'engraissement et la distribution des différents sérovars dans les élevages afin d'obtenir les données de base devant servir à l'établissement de mesures de contrôle de *Salmonella* dans la population porcine. Des données épidémiologiques sur la prévalence chez le porc en fin d'engraissement ont donc été obtenues à l'abattoir par un échantillonnage de matières fécales pour la recherche de *Salmonella* spp. (chapitre 3). Dans la première partie de cette étude, nous avons observé une prévalence de 5.2% de *Salmonella* spp. dans les matières fécales des porcs à l'abattoir. D'autres études, notamment au Danemark, aux Etats-Unis et au Japon (Yoshida *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996; Fedorka-Cray *et al.*, 1996) ont obtenu des résultats comparables. Les sérovars les plus souvent retrouvés au Canada étaient parmi les plus prévalents aux Etats-Unis et en Europe. Cependant, une certaine variation existe dans la prévalence des différents sérovars dans la population. Dans cette étude, *S. Typhimurium*, un sérovar très souvent associé à des

salmonelloses humaines a été retrouvé au quatrième rang, alors qu'il est souvent rapporté comme le plus prévalent dans certaines études (Di Guardo *et al.*, 1992).

Il a été noté que la prévalence variait d'un élevage à l'autre et pour la majorité des élevages, elle était inférieure à 20%. Ceci suggère que la contamination par cet agent pathogène est limitée à certains sites de production. Il a été observé que, chez un très faible pourcentage (2.8%) des élevages, la prévalence de *Salmonella* spp. était de plus de 50%. Ce faible pourcentage d'élevages fortement contaminés est de nature à faciliter le contrôle de cet agent pathogène à la ferme, contrairement à ce qui est observé chez d'autres espèces animales, notamment la volaille, où la prévalence est plus élevée et la bactérie présente dans la plupart des élevages.

7.2 Identification des sources de contamination et prévention de la contamination à la ferme

Afin de pouvoir établir des mesures de contrôle des infections à *Salmonella* spp. chez le porc, les différentes sources de contamination possibles à la ferme ont été étudiées. La seconde étude (chapitre 4) portait sur l'identification des sources de contamination des animaux dans cinq fermes à prévalence élevée et sur la distribution des salmonelles dans une pyramide de production intégrée. En effet, dans les structures modernes en production porcine, plusieurs élevages appartiennent à des pyramides de production intégrée. Il est important de considérer la contamination par *Salmonella* spp. dans ce type de production afin d'avoir un aperçu du rôle relatif des différents niveaux de production.

Plusieurs échantillons de l'environnement, comme l'eau de consommation dans les parcs, les bottes, les planchers, les portes et la vermine étaient contaminés par les salmonelles. Cette étude ne permettait pas de conclure que ces échantillons positifs étaient des sources d'infection pour les porcs. Cependant, il n'y a aucun doute qu'ils peuvent être impliqués dans le cycle de re-contamination des animaux si des mesures strictes et adéquates ne sont pas entreprises pour détruire ou éliminer la bactérie.

De plus, la présence de signes cliniques de salmonellose dans un élevage semblait être reliée à un plus haut taux de contamination de l'environnement et des animaux par *Salmonella* spp. Il a été noté dans cette étude, que dans une des deux fermes dans laquelle les animaux présentaient des signes cliniques sévères de salmonellose (ferme A), un échantillon de l'eau de l'entrée principale à la ferme était positif à la culture de salmonelles. Ceci indique que l'eau peut jouer un rôle significatif dans la dissémination de la maladie. Ceci peut aussi expliquer la haute prévalence de salmonelles dans l'environnement et chez les animaux de cette ferme. Étant donné que plusieurs animaux étaient positifs à la culture de salmonelles, la transmission animal-animal est aussi, tout à fait probable.

Les mouches étaient aussi positives à la culture de salmonelles dans les fermes fortement contaminées, tel qu'observé par Morse et Duncan (1974) et Khalil *et al.* (1994). Ces insectes, ainsi que la vermine (Muirhead, 1993; Davies et Wray, 1997) peuvent être impliqués dans la dissémination des salmonelles dans l'environnement.

Dans les fermes sans signe clinique de salmonellose (fermes B, D et E), plusieurs parcs étaient positifs à la culture de salmonelles. Cependant, la contamination de l'environnement était limitée. L'eau et la nourriture de ces parcs n'étaient pas contaminées et l'environnement ainsi que les accessoires de ferme étaient beaucoup moins contaminés que dans les fermes avec signes cliniques de salmonellose (fermes A et C). Il a été noté que les bottes des employés de ferme étaient positives dans les deux types de fermes, indiquant que de bonnes pratiques d'hygiène, notamment la désinfection des bottes, doivent être en place afin de réduire la dissémination des salmonelles. Ceci va dans le sens des observations de Berends *et al.* (1997), selon lesquelles la dissémination de *Salmonella* aux autres parcs se faisait à 60% par le biais de l'humain.

Étant donné qu'une de ces fermes fortement contaminées (ferme C), faisait partie d'une pyramide de production intégrée, et sachant que les animaux porteurs asymptomatiques semblent être des sources de contamination importantes dans un élevage, nous avons voulu connaître la distribution des *Salmonella* spp. dans les différents niveaux de production dans ce type d'élevage.

Nous avons échantillonné les parcs de certains élevages dans les différents niveaux de la pyramide de production intégrée. La prévalence totale a été estimée à 7.9% alors que 70.7% des fermes étaient positives à la culture de salmonelles, indiquant une large distribution de cet agent pathogène dans la production intégrée, avec les taux de contamination les plus élevés chez les femelles de remplacement

(15.9%) et les engraissements de femelles (21.9%). Une étude américaine (Davies *et al.*, 1998) a aussi rapporté un taux de contamination élevé (18-22%) chez les animaux de reproduction. Ces données suggèrent fortement que la provenance des animaux de remplacement est un élément clef du contrôle des salmonelles dans la pyramide. Puisque nous savons déjà que plus du tiers des élevages sont contaminés (chapitre 3), il apparaissait évident que les provenances multiples augmentent considérablement les risques de contamination des élevages par *Salmonella* spp.

L'analyse des profils génétiques par électrophorèse en champs pulsés (PFGE) des différents isolats de salmonelles provenant de la pyramide de production intégrée n'a démontré aucune variation de profil entre les différents isolats d'un même sérovar (figure 7.2). Ces données suggèrent que l'origine de la contamination de la pyramide par *S. Typhimurium* DT108, *S. Anatum* et *S. Derby* se situait au niveau du nucleus. Il a été conclu que dans ces élevages, l'infection par salmonelles était transmise verticalement aux différents niveaux de la pyramide, par l'introduction de cet agent pathogène dans les élevages via des porteurs asymptomatiques. Dans une étude complémentaire de Quessy *et al.*, (1999), il ressort que l'achat d'animaux de remplacement de diverses provenances (multisources) était en corrélation avec la présence de *Salmonella* spp. dans les élevages. La réduction du nombre de sources pour les achats d'animaux doit nécessairement être considérée afin de réduire le risque d'introduire *Salmonella* spp. dans les élevages.

Un autre facteur important à considérer est le transport des animaux. Le stress associé à cette opération favorise l'excrétion des salmonelles chez les individus

porteurs. Ce facteur n'a cependant pas été considéré dans cette étude mais est relativement bien documenté dans la littérature (Berends, 1997) comme facteur de risque associé à la contamination des élevages et des animaux à l'abattoir par *Salmonella* spp.

Les données obtenues dans cette partie de l'étude ont également été intégrées au programme d'assurance qualité mis sur pied par le Conseil Canadien du Porc (Quesy et Scovil, 1999). Dans une approche de la ferme à la table, le contrôle des risques microbiens tel *Salmonella* spp. dans les produits de viande requiert la participation de tous les segments de la production, notamment au niveau des fermes, afin de réduire la prévalence de ce micro-organisme chez l'animal vivant. Par cette approche, certains pays ont réussi à réduire considérablement le pourcentage des produits de porc contaminés par *Salmonella* spp. (Bagessen *et al.*, 1997).

Pour ce faire, il demeurerait important d'éliminer ou tout au moins réduire le taux de porteurs asymptomatiques de salmonelles dans les élevages contaminés, afin de mettre en place un système de contrôle préventif permettant de réduire la contamination des carcasses à l'abattoir. C'est pourquoi nous nous sommes penchés sur l'évaluation de différentes stratégies afin de réduire l'état de porteur dans la population porcine.

7.3 Stratégies de réduction de l'état de porteur de salmonelles et réponse immunitaire chez le porc

Le dernier objectif majeur du présent projet était d'élaborer des stratégies de traitement chez l'animal vivant, dans le but de réduire l'état de porteur des salmonelles chez l'espèce porcine. Comme sous-objectif, nous voulions étudier la réponse immunitaire de l'hôte suite à l'administration des différents traitements.

Tel que déjà mentionné, le porc porteur de salmonelles est la principale source initiale de contamination de l'environnement et des autres animaux à la ferme et à l'abattoir. Plusieurs efforts pour identifier et diminuer le nombre d'animaux porteurs ont échoué à cause du manque d'information sur l'épidémiologie et la pathogénie des salmonelles. *S. Typhimurium*, un des sérovars le plus fréquemment isolé de sources humaine et porcine, a été utilisé dans cette étude (chapitre 5). Une fois ingéré, il s'attache, pénètre la muqueuse intestinale et envahit la lamina propria où il est phagocyté par les macrophages, afin de pouvoir se disséminer à travers le corps dans différents organes tels que les amygdales, les plaques de Peyer et les nœuds lymphatiques mésentériques (Kramer, 1995). La durée de l'excrétion dans les fèces est variable. Wood et Rose (1992) ont démontré que *S. Typhimurium* persiste chez le porc en faible nombre au niveau des tissus, pour une période d'au moins 28 semaines, suite à une infection expérimentale. Ces données démontrent que l'état de porteur chez le porc est un élément important de la problématique, étant donné que cet état peut persister pendant toute la période d'engraissement.

Puisque *Salmonella* spp. peut se retrouver un peu partout dans l'environnement, le contrôle de l'infection chez l'animal vivant est particulièrement difficile. Afin d'y parvenir, toutes ces sources possibles de contamination doivent être identifiées et maîtrisées à la ferme. Les animaux infectés doivent être traités pour réduire l'excrétion en période de stress, par exemple lors du transport vers l'abattoir. Il est donc important de contrôler les infections à *Salmonella* spp. par des traitements préventifs afin de réduire ou d'éliminer les animaux porteurs de ce micro-organisme. Depuis quelques années déjà, certains groupes de recherche ont tenté de réduire l'incidence des infections à salmonelles chez le porc à la ferme. Fedorka-Cray *et al.* (1997) et Nisbet *et al.* (1996) ont utilisé l'exclusion compétitive pour le contrôle des salmonelles chez le porc. Ces études ont démontré une certaine capacité à réduire la quantité de salmonelles dans les différents tissus, sans toutefois éliminer l'état de porteur. L'acidification de la nourriture des animaux a été associée à une réduction de l'excrétion du micro-organisme dans les matières fécales sans toutefois qu'une réduction significative de l'état de porteur au niveau des tissus soit démontrée (vanSchie et Overgoor, 1987).

D'autres stratégies ont été envisagées à la ferme. Par exemple, l'élimination stratégique des animaux contaminés des élevages a été considérée (Dahl, 1997). Cependant, la problématique liée à l'efficacité de cette stratégie est liée à la détection précoce et efficace des animaux porteurs. La vaccination avec différentes souches de salmonelles tuées ou atténuées a aussi été évaluée chez l'espèce porcine sans toutefois éliminer l'état de porteur (Roof *et al.*, 1992). Toutefois, il était

difficile de comparer ces différents traitements étant donné leur utilisation dans des conditions expérimentales différentes.

Dans cette partie de notre étude, nous avons voulu évaluer la capacité de différents traitements, comme les probiotiques, les prébiotiques, la vaccination et l'utilisation d'immunoglobulines spécifiques, à contrôler les infections à *S.Typhimurium* chez le porc en période postsevrage. Cette période nous apparaissait importante étant donné que plusieurs animaux de diverses portées sont mélangés à cette étape, ce qui augmente les risques de contamination par un animal porteur.

Il est reconnu que les suppléments probiotiques et prébiotiques peuvent promouvoir la colonisation de l'intestin par des micro-organismes bénéfiques pour l'hôte (Fuller et Gibson, 1997). Ils peuvent permettre une série de facteurs qui facilite la compétition pour les nutriments (Saavedra, 1995), la production de substances inhibitrices ou antimicrobiennes inhibant la croissance de certains agents entéropathogènes (De Vuyst, 1994), ou encore la compétition pour certains récepteurs de la muqueuse intestinale (Fuller et Gibson, 1997). Finalement, ils peuvent avoir un effet immunomodulateur. Ils peuvent favoriser l'activation des macrophages (Perdigon, 1995), l'augmentation de la production des IgA (Kailam, 1992) et l'augmentation de la production de cytokines et de cellules T et B (Perdigon, 1992).

Dans une étude préliminaire (Letellier *et al.*, 1997), l'utilisation du Ferlac-2 en pâte s'est avérée efficace pour réduire la colonisation des nœuds lymphatiques

mésentériques (NLM, 20%) et des autres tissus (0%) par *S. Typhimurium*, en comparaison à l'administration dans les aliments sous forme de poudre (NLM, 44%). Cette forme d'administration en pâte procure un apport constant en micro-organismes probiotiques dans le tube digestif et permet probablement d'établir une exclusion compétitive, empêchant les micro-organismes pathogènes de s'établir au niveau de la muqueuse intestinale, de coloniser et de causer l'infection. Toutefois, l'excrétion des salmonelles n'a pas été affectée par l'utilisation des probiotiques, suggérant que ce mécanisme d'exclusion compétitive n'était pas suffisant afin d'éviter la survie et la réplication des salmonelles dans la couche de mucus. Cette hypothèse a également été avancée par Parraga *et al.* (1997).

L'utilisation des fructooligosaccharides (FOS) comme agents prébiotiques, dans l'eau de consommation des porcs, a permis de réduire l'excrétion de *S. Typhimurium* dans les matières fécales. Des changements considérables ont aussi été notés au niveau de la composition de la microflore intestinale. En effet, les FOS agissent en modifiant la microflore par augmentation de certaines populations entre autres, les lactobacilles et les bifidobactéries (Salminen *et al.*, 1996). Cependant, aucune réduction significative de la colonisation des NLM n'a été observée, ce qui suggérerait que dans ces conditions expérimentales, le FOS n'empêchait pas les salmonelles de pénétrer la muqueuse intestinale. Ceci laisse croire que la microflore intestinale modifiée n'était pas suffisamment stable au niveau de la surface muqueuse pour exercer une exclusion compétitive efficace.

Curieusement, la combinaison du FOS et du Ferlac-2 n'a pu réduire la prévalence de salmonelles chez les animaux à l'étude. Ces données suggèrent que les prébiotiques et les probiotiques, lorsque administrés ensemble, deviennent antagonistes. Cependant, l'utilisation de ces agents ont amené une modification de la microflore du côlon. Une prédominance en micro-organismes à Gram positifs a été observée chez les animaux supplémentés avec le FOS, le Ferlac-2, la combinaison du FOS avec le Ferlac-2 ainsi qu'avec la flavomycine.

La flavomycine, un additif alimentaire agissant comme facteur de croissance, appartenant à la classe des bambermycines est utilisé depuis quelques années pour contrôler les bactéries pathogènes chez la volaille, le porc et le bovin. Cet agent a notamment été utilisé dans un modèle d'infection expérimental chez le porc (Fuller *et al.*, 1997). Les résultats ont démontré que la flavomycine réduit significativement le taux et l'ampleur de l'excrétion de *S. Typhimurium* chez le porc (Francisco 1999). Dans le contexte expérimental de notre étude, la flavomycine n'a toutefois pas permis de réduire l'excrétion de *S. Typhimurium*. Cependant, elle a permis une réduction non significative de l'état de porteur au niveau des NLM.

Aucune diminution n'a été notée dans l'excrétion et dans la colonisation par *Salmonella* dans les NLM suite à l'utilisation de la poudre d'œuf contenant des immunoglobulines dirigées contre *S. Typhimurium*. Il est donc probable que les immunoglobulines contenus dans la poudre d'œufs ont été altérées par les enzymes protéolytiques présents dans le tractus digestif du porc. Cette dénaturation a

probablement fait en sorte que les immunoglobulines n'ont pu reconnaître les salmonelles.

Il a été rapporté dans la littérature que la vaccination des animaux par le vaccin vivant SC54, une souche atténuée de *S. Choleraesuis* var *kunzendorf*, était utile pour protéger les porcs contre les signes cliniques associés à l'infection par une souche virulente de *S. Choleraesuis* (Kramer *et al.* 1992). Cependant, ce sérovar de salmonelle n'est pas ou n'est que très peu présent au Canada (Sanford et Tilker, 1994). Cette souche vaccinale semble avoir le potentiel de générer une réponse immunitaire chez l'hôte, qui peut conférer un pouvoir protecteur contre d'autres sérovares de salmonelles (Baum, 1996). Dans notre étude, le vaccin vivant SC54, a permis de réduire la présence de *S. Typhimurium* dans les NLM suite à l'infection expérimentale. Ceci suggère que l'utilisation d'une souche vaccinale avirulente de *S. Choleraesuis* peut prévenir la colonisation des NLM par *S. Typhimurium*. Ceci suggère que des anticorps dirigés contre d'autres structures que les LPS, par exemple certaines protéines de la membrane externe, sont importants dans la protection (Udhayakumar et Muthukkaruppan, 1987). La réduction significative de la présence de *S. Typhimurium* dans l'iléon, suggère que ce vaccin vivant stimule un mécanisme de défense local, par exemple la production d'IgA.

Dans le dernier volet de cette étude, nous avons voulu vérifier cette hypothèse en vérifiant la capacité de ces différents traitements à augmenter la résistance de l'hôte à l'infection par salmonelles via la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte. La réponse immunitaire de l'hôte a été étudiée suite à l'administration des

différents traitements. Plus particulièrement, nous avons évalué le taux de phagocytose par cytométrie en flux, l'activation des phagocytes du sang complet par bioluminescence, le taux d'IgA dirigés contre *S. Typhimurium* au niveau de l'iléon. Nous avons aussi procédé à un examen histopathologique du tractus intestinal.

L'activité phagocytaire des phagocytes du sang complet n'a pas été augmentée suite à l'administration de différents traitements (Ferlac-2, FOS et vaccin SC54) suggérant que la stimulation systémique des phagocytes n'était pas suffisante pour augmenter la résistance à l'infection à *S. Typhimurium*. Compte tenu de ces résultats, la seconde étape fut d'évaluer le niveau d'activation des phagocytes sanguins et la réponse immunitaire locale par la détection des immunoglobulines associées aux muqueuses soient les IgA.

Dans un premier temps, il ressort que la supplémentation des animaux avec le Ferlac-2 ou FOS combiné au Ferlac-2 a permis une augmentation du niveau d'activation des phagocytes sanguins, sans réduction significative de la colonisation par *S. Typhimurium* des NLM et de l'iléon chez ces animaux. Ces données suggèrent que l'activation des phagocytes, telle qu'évaluée par l'augmentation des radicaux libres d'oxygène (ROI) libérés lors de l'activation des cellules, n'est pas suffisante pour éliminer les salmonelles chez les animaux infectés. D'autre part, une activation significative des phagocytes sanguins, accompagnée d'une réduction significative de la présence de *S. Typhimurium* dans l'iléon des animaux vaccinés au SC54, a été observée. Ceci suggère que la réponse immunitaire locale est impliquée

dans la réduction du nombre de salmonelles dans les NLM et dans l'iléon de ces animaux.

À la suite de ces constatations, la réponse immunitaire locale a été étudiée, particulièrement la production des IgA dans l'iléon. Chez les animaux vaccinés avec le SC54, comparativement aux porcs non infectés, la réduction de la colonisation des nœuds lymphatiques mésentériques et de l'iléon par les salmonelles était accompagnée d'un taux d'IgA plus élevé dirigés contre *S. Typhimurium* au niveau de l'iléon ($P=0.0007$). Cette observation est en accord avec les résultats de l'équipe de Royal *et al.* (1968), ayant effectué une étude de vaccination par *Salmonella* chez les vaches. Une production d'anticorps spécifiques dans le colostrum avait permis d'interagir avec les micro-organismes du lumen de l'intestin des veaux et influencer le développement de l'infection. Ceci suggère une implication significative de la réponse immunitaire locale lors de la vaccination par voie orale. Dans le groupe des animaux supplémentés au Ferlac-2, le titre d'IgA était aussi plus élevé que chez le groupe non infecté ($P=0.002$), en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Kailan *et al.*, (1992). Toutefois, aucune réduction de la colonisation de l'iléon et des NLM par salmonelles n'a été observée. Ces données indiquent que la seule augmentation du titre d'IgA n'est pas suffisante pour protéger les animaux de la colonisation par *Salmonella*. Ceci suggère qu'une stimulation de l'immunité locale par les IgA ainsi que l'immunité cellulaire, incluant les réseaux de cytokines qui activent notamment les cellules phagocytaires et les lymphocytes, pourraient être impliquées dans la réduction de la colonisation des NLM et l'iléon par *Salmonella* chez les animaux vaccinés au SC54.

De plus, une augmentation de la densité cellulaire a été observée au niveau des microvillosités et des NLM lors de l'examen histopathologique des tissus des animaux vaccinés au SC54. Cette observation suggère également qu'une stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire est impliquée dans la réduction de l'état de porteur de salmonelles.

D'autres changements histologiques significatifs ont été observés, notamment une diminution de la hauteur des microvillosités au niveau de l'iléon chez les animaux ayant reçu la souche avirulente du vaccin SC54 comparativement aux animaux contrôles et aux animaux non infectés ($P < 0.05$). Ces observations pourraient être associées à une destruction des entérocytes des villosités lors de l'infection par les salmonelles et à une réduction possible de récepteurs d'adhésion. Bayer *et al.*, (1977) et Wallis *et al.*, (1986) ont observé, chez la volaille et le lapin respectivement, que chez les animaux infectés par salmonelles, les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale étaient dépourvues de microvillosités ou avaient des microvillosités détruites ou raccourcies. La réduction de la présence des salmonelles dans l'iléon et dans les NLM chez les animaux vaccinés pourrait être associée en partie à une perte de récepteurs d'adhésion pour les salmonelles.

La densité de la couche de mucus et des cellules à gobelet au niveau de l'iléon était significativement plus faible chez les animaux vaccinés et chez les animaux contrôles en comparaison aux animaux non infectés ($P < 0.05$). Ceci suggère une réduction de la sécrétion du mucus et/ou du nombre de cellules sécrétoires. Arnold

et al (1993) ont aussi observé une réduction de la production de mucus intestinal lors de la salmonellose chez la souris, celle-ci étant associée à une production accrue de TNF- α . Ils ont observé, en accord avec nos observations, que lors d'une infection à salmonelles, les villosités sont plus courtes et arrondies, et que le nombre de cellules à gobelet est réduit ainsi que la quantité du mucus produite. *Salmonella* sécrète aussi une heat-shock-protéine de 66 kDa comme facteur de virulence, lui permettant de ce lier au mucus intestinal (Engraber *et al.*, 1992).

À la lumière des ces observations, il est permis de soulever l'hypothèse que lors de la vaccination avec la souche SC54, la destruction des villosités réduit les sites d'attachement possible. De plus, la réduction du nombre de cellules à gobelet entraîne une réduction de l'épaisseur de la couche de mucus qui réduirait également les possibilités d'attachement de *Salmonella* spp. au niveau de l'épithélium intestinal. Toutefois, l'excrétion des salmonelles dans les fèces n'a pas été affectée, suggérant une certaine colonisation au niveau du tube digestif.

Finalement dans cette étude, il a été observé qu'environ 30 à 40% des animaux infectés avaient une résistance naturelle à l'infection par salmonelles. Ceci suggère une résistance à l'infection chez certains individus, probablement liée à des gènes particuliers impliqués au niveau des mécanismes de défense naturelle de l'hôte. Plusieurs travaux récents ont notamment démontré que le gène *Nramp1* est impliqué dans la résistance de l'hôte, ce qui serait liée aux fonctions des macrophages chez différentes espèces animales, chez l'humain (Hu *et al.*, 1996 ; Malo *et al.*, 1994) ainsi

que chez le porc (Sun *et al.*, 1998). Des études complémentaires seront nécessaires afin de déterminer les facteurs impliqués dans la résistance naturelle des porcs aux infections à salmonelles.

Figure 7.1. Illustration de la problématique des infections à salmonelles chez l'espèce porcine.

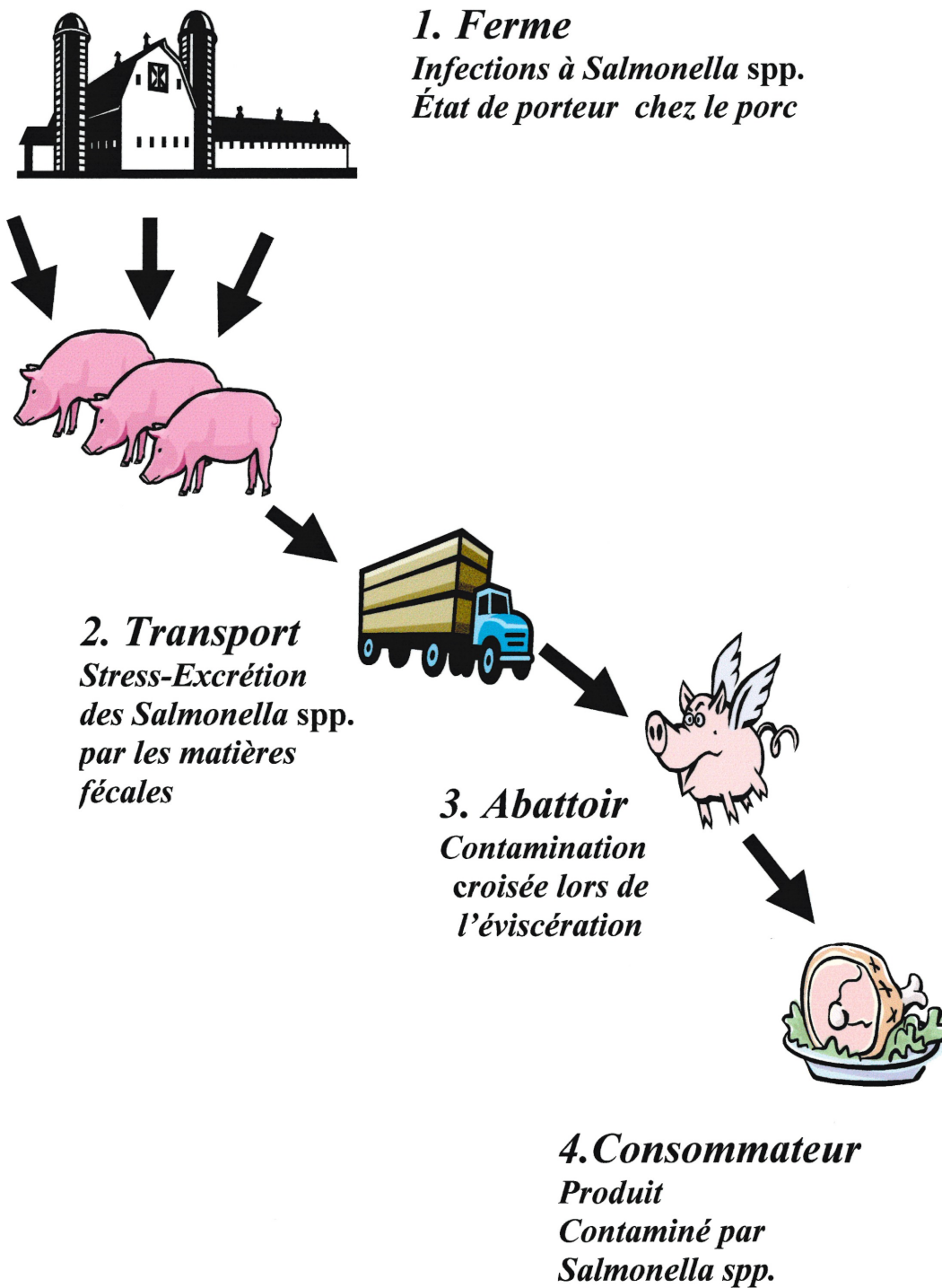
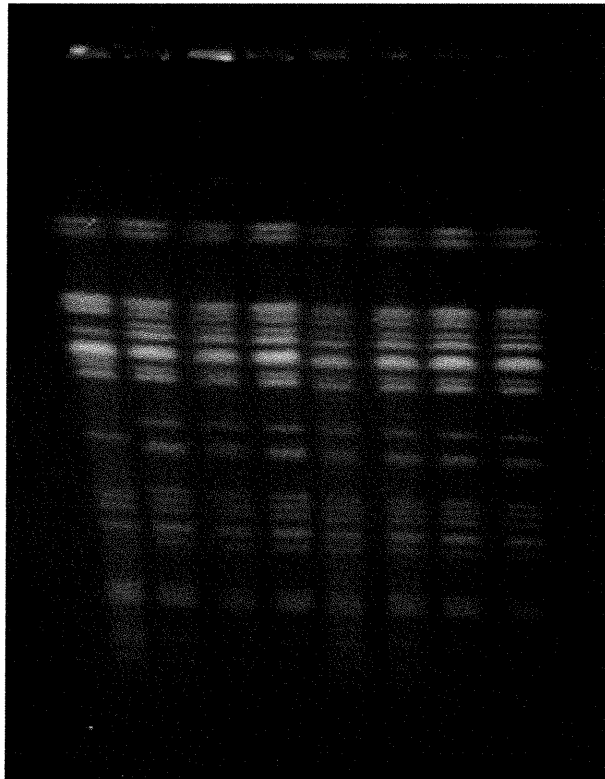


Figure 7.2 Analyse par PFGE des isolats de *S. Typhimurium* DT 108 dans les différents niveaux d'une production intégrée.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.



Légende:

Puits 1. *S. Typhimurium* ATCC 14028,
puits 2 à 8: Profil d'ADN des isolats de *S. Typhimurium*
DT108 provenant des animaux dans les différents niveaux
de la pyramide du nucleus aux engraissements
commerciaux.

CHAPITRE 8. CONCLUSIONS

Les différents volets de cette étude ont permis d'accroître les connaissances en ce qui concerne l'épidémiologie des infections à salmonelles chez l'espèce porcine. Ils ont également accru les connaissances sur les différents moyens de réduire la colonisation des tissus par les salmonelles et sur la réponse immunitaire de l'hôte impliquée dans la réduction de l'état de porteur de ce microorganisme chez le porc. Plus précisément, les conclusions suivantes ont été tirées de cette étude :

- 1- Le porc est un réservoir significatif de *Salmonella* spp., et représente ainsi un certain danger comme source potentielle de contamination de la viande par les matières fécales lors de l'éviscération des carcasses à l'abattoir.
- 2- Le porc est un animal porteur asymptomatique de salmonelles et constitue une importante source de contamination des élevages.
- 3- La démonstration de la transmission des salmonelles aux différents niveaux de la production intégrée souligne l'importance de réduire le taux de portage de ce microorganisme chez l'animal vivant plus particulièrement pour les fermes de reproducteurs se trouvant en haut de la pyramide.
- 4- L'utilisation des agents prébiotiques et probiotiques, dans un contexte expérimental, permet de changer considérablement la microflore intestinale. Cependant cette modification ne permet pas de réduire le taux de porteur de salmonelles des porcs. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour

optimiser le modèle afin que cette modification de la flore soit plus stable et exerce un effet protecteur contre les agents pathogènes intestinaux, entre autre *Salmonella* spp.

5- L'utilisation du vaccin SC54, vivant et avirulent, peut s'avérer une alternative valable afin de réduire la pression d'infection. Cette utilisation devrait toutefois être évaluée dans des études en conditions naturelles d'infection visant à accroître la résistance de l'hôte à l'infection.

6- Les changements histologiques observés au niveau de l'iléon suggèrent, de façon générale, que le vaccin SC54 a des propriétés immunomodulatrices qui permettent de diminuer la colonisation des tissus par *Salmonella*.

7- La réponse immunitaire locale, plus particulièrement l'immunité à médiation cellulaire ainsi que la production d'IgA au niveau de l'iléon, est impliquée dans le contrôle des salmonelles chez l'animal infecté expérimentalement.

8- Une résistance innée aux infections expérimentales à *Salmonella* chez certains porcs a été observée, ce qui suggère l'implication d'un ou de plusieurs gènes de résistance à *Salmonella* dans l'espèce porcine.

Dans ce projet de recherche, nous avons tenté de résoudre la problématique reliée aux infections à *Salmonella* chez le porc par une réduction de l'état de porteur chez l'animal vivant. Cette approche consistait à évaluer la capacité de certains traitements à

modifier la réponse immunitaire de l'hôte afin de réduire l'état de porteur. Il serait souhaitable, dans les projets futurs de considérer également la susceptibilité de l'hôte à l'infection. En fait, cette étude a indiqué qu'environ le tiers des porcs étudiés semblaient avoir une résistance naturelle à l'infection par *Salmonella*, ce qui démontre des variations considérables de susceptibilité entre les individus. Plus précisément, il serait intéressant d'évaluer la susceptibilité des individus à l'infection en fonction des facteurs génétiques de l'hôte, notamment le gène *Nramp1*. De plus, la présence d'IgA au niveau de l'iléon semble être un des éléments importants dans la réduction de la colonisation des tissus par *Salmonella*. Toute l'implication des cytokines devrait être évaluée dans des travaux futurs. En effet, il est reconnu que l'élimination des agents pathogènes intracellulaires facultatifs comme *Salmonella* requiert l'intervention de la réponse immunitaire à médiation cellulaire, c'est-à-dire, l'activation des phagocytes par les cytokines, produites entre autre par les lymphocytes T.

Ces travaux ont donc permis d'approfondir davantage la réponse de l'hôte face à l'infection par *Salmonella* Typhimurium ainsi que sur les propriétés immunomodulatrices de certains traitements susceptibles de réduire l'état de porteur, en offrant notamment un modèle d'infection expérimentale reproduisant cet état de porteur.

BIBLIOGRAPHIE

- Allred, J.N., Walker, J.W., Beal, V.C., Germaine, F.W. 1967. A survey to determine the *Salmonella* contamination rate in livestock and poultry feeds. *J Am Vet Med Assoc* 151:1857-1860.
- Anderson, R.C., Genovese, K.J., Harvey, R.B., Stanker, L.H., DeLoach, J.R., Nisbit, D.J. 2000. Assessment of the long-term pattern of *Salmonella* serovar choleraesuis following experimental infection of neonatal piglets. *J Vet Diagn Invest* 12:257-260.
- Anonymous. 1994. Annual Report on Zoonoses in Denmark. Copenhagen: Ministry of Agriculture and Fisheries, Danish Veterinary Service, Danish Zoonosis Centre.
- Arnold, J.W., Klimpel, G.R., Niesel, D.W. 1993. Tumor necrosis factor (TNF alpha) regulates intestinal mucus production during salmonellosis. *Cell Immunol* 151:336-44.
- Aserkoff, B., Bennett, J.V. 1969. Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of salmonellae. *N Engl J Med* 281:636-640.
- Ashkenazi, S., Cleary, T.G., Murray, B.C., Wanger, A., Pickering, L.K. 1988. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by *Salmonella* strains. *Infect Immun* 56:3089-94.
- Bagessen, D.L., Sorensen, L.L., Krause, M., Gerner-Smidt, P. 1997. The occurrence of *Salmonella* enterica serotypes in animal, feed, pig, pork and man. In Proceedings of

the Second International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in pork. Denmark. pp.56-59.

Barnes, D.M., Bergeland, M.E. 1968. *Salmonella typhisuis* infection in Minnesota swine. J Am Vet Med Assoc 152:1766-1769.

Bailey, J.S., Blankenship, L.C., Cox, N. A. 1991. Effect of fructooligosaccharides on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. Poultry Sci 70:2433-2438.

Bajaj, V., Hwang, C., Lee, C.A. 1996. *hilA* is a novel ompR/toxR family member which activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. Mol Microbiol 22:703-714.

Baretta, R.G., Donis, R.O., Chacon, O., Shams, H., Cirillo, J. 2000. Vaccines against intracellular pathogens. Subcellular Biochemistry, volume 33: Bacterial Invasion into eucaryotic cells, edited by Oelschlaeger and Hacker. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp. 559-599.

Baskerville, A., Dow, C. 1973. Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella Choleraesuis*. J Comp Path 83:207-215.

Baum, D.H., Harris, H., Nielsen, B., Fedorka-Cray, P.J., Roof, M.B., Torrison, J., BeVier, G. 1996. Studies on *Salmonella* infections in pigs with emphasis in food safety applications. In Proceedings of the First International Symposium on Ecology of

Salmonella in Pork Production. p.49.

Bäumler, A.J., Tsois, R.M., Heffron, F. 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. Proc Natl Acad Sci USA 93:279-283.

Bäumler, A.J., Tsois, R.M., Heffron, F. 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella* Typhimurium. Role in bacterial interactions with epithelial cells. Adv Exp Med Biol 412:149-158.

Bayer, R.C., Gershan, M., Bryan, T.A., Rittenburg, J.H. 1977. Degeneration of the mucosal surface of the small intestine of the chicken in *Salmonella* infection. Poult Sci 56:1041-2.

Bean, N.H., Griffin, P.M. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. J Food Prot 53:804-817.

Bean, N.H., Griffin, P.M. 1992. *Salmonella* surveillance, annual summary. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.

Bellamy, R. 1999. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. Microbes and Infection 1:23-27.

- Benjamin, W.H., Turnbough, C.L., Posey, B.S., Briles, D.E.** 1985. The ability of *Salmonella* Typhimurium to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect Immun* 50 :392-97.
- Beran, G.W.** 1995. Human health hazards from meat and meat products. In: Allen D. Leman. Swine Conference. 72-79.
- Berends, B.R., Van Knapen, F., Snijders, J.M., Mossel, D. A.** 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* 36:199-206.
- Bergmann, K.C., Maldman, R.H., Tichner, H., Pohl, W.D.** 1986. Antibody in tears, saliva and nasal secretions following oral immunization of humans with inactivated influenza virus vaccine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 80:107-109.
- Betts, J., Finlay, B.B.** 1992. Identification of *Salmonella* Typhimurium invasiveness loci. *Can J Microbiol* 38:852-857.
- Blackwell, J.M.** 1989. The macrophage resistance gene Lsh/Ity/Bcg. *Res Immunol* 140:767-9.

- Bost, K.L., Clements, J.D.** 1995. In vivo induction of interleukin-12 mRNA expression after oral immunization with *Salmonella* Dublin or the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 63:1076-1083.
- Bowe, F., Lipps, C., Tsolis, R.M., Groisman, E., Heffron, F., Kusters, J.G.** 1998. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection in mice. *Infect Immun* 66:3372-3377.
- Brenner, F.W., McWhorter-Murlin, A.C.** 1998. Identification and serotyping of *Salmonella*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- Brumell, J.H., Steele-Mortimer O., Finlay B.B.** 1999. Force feeding by *Salmonella*. *Curr Biol* 9:R277-280.
- Bryan, F. L.** 1988. Risks associated with vehicles for food borne pathogens and toxins. *J Food Prot* 51:498-508
- Bryan, F. L.** 1998. Foods of animal origin and risks for the consumer. In *Proceedings World Congress on Food Hygiene*. pp.K23-K37.
- Buchmeier, N.A., Heffron, F.** 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248:730-732.

- Buchmeier, N.A., Lipps, C.J., So, M.Y., F. Heffron.** 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella* Typhimurium are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Infect Immun* 7:933-936.
- Buddington, R.K., Williams, C.H., Chen, S.C., Witherly, S.A.** 1996. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *Am J Clin Nutr* 63 :709-716.
- Bussmann, V., Lanthier, I., Pitel, F.** 1998. cDNA cloning structural organization and expression of the sheep NRAMP1 gene. *Mamm Gen* 1027-1031.
- Bush, E.J., Wagner, B., Fedorka-Cray, P.J.** 1999. Risk factors associated with shedding of *Salmonella* by U.S. finishing hogs. In *Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. Washginton. pp. 106-108.
- Cardenas, L., D. Clements.** 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev* 5:328-342.
- Carlson, A.R., Blaha, Th.** 1999. Investigations into the infection-contamination-infection cycle of zoonotic *Salmonella* in the environment on four selected Minnesota swine farms. In *Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. Washginton. pp. 109-112.

- Carr, M.A., Bawcom, D.W., Miller, M.F., Ramsey, C.B., Thompson, L.D.** 1996. Microbiology of pig carcasses. In Proceedings on First International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. NADC, Ames, Iowa. pp. 13-140.
- Chen, W., Martinez, G., Mulchandani, A.** 2000. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal Biochem* 280:166-172.
- Chambers, J.R., Spencer, J.L., Molder, H.W.** 1997. The influence of complex carbohydrates on *Salmonella* Typhimurium colonization, pH, and density of broiler ceca. *Poult Sci* 76:445-451.
- Chatfield, S., Strugnell, R.A., Dougan, G.** 1989. Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. *Vaccine* 7:495-498.
- Chatfield, S., Li, L.J.L., Sydenham, M., Douce, G., Dougan, G.** 1992. *Salmonella* genetics and vaccine development. In *Molecular Biology of Bacterial Infections: Current Status and Future Perspectives*. C.E. Hoermache, C.W., Penn, C.J. Smyth, eds. Cambridge: Cambridge University Press. pp.299-312.
- Cherubin, C.E.** 1980. Epidemiologic assessment of antibiotic resistance in *Salmonella*. *CRC Handbook-Zoonosis* pp.173-200.

- Christensen, J., Bagessen, D.L.** 1996. The occurrence of serotypes of *Salmonella enterica* and phage types of *S. Typhimurium* in Danish swine herds. In Proceedings of the 14th I.P.V.S. Congress, Bologna Italy, pp.7-10.
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H.** 1994. Preferential interaction of *Salmonella Typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 145:543-552.
- Clarke, R.C.** 1985. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella Typhimurium* in calves. PhD dis. University of Guelph, Ontario, Can.
- Clarke, R.C., Gyles, C.L.** 1987. Virulence of wild and mutant strains of *Salmonella Typhimurium* in ligated intestinal segments of calves, pigs, and rabbits. *Am J Vet Res* 48:504-510.
- Clarke, R.C., Gyles, C.L.** 1993. *Salmonella*. In Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2nd edition. Gyles, C.L., and Thoen, C.O. eds. Iowa State University Press pp.133-153.
- Clemmer, D.I., Hickey, J.L.S., Bridges, J.F., Schliessmann, D.J., Shaffer, M.F.** 1960. Bacteriologic studies of experimental air-borne salmonellosis in chicks. *J Infect Dis* 106:197-210.

- Coe, N., Wood, R.L.** 1991. The effect of exposure to a *cya/crp* mutant of *Salmonella* Typhimurium on the subsequent colonization of swine by the wild-type parent strain. *Vet Microbiol* 31:207-220.
- Cohen, M.L.** 1980. Turtle-associated salmonellosis in the United States. Effect of public health action. 1970-1976. *J Am Med Assoc* 243:1247-1249.
- Cohen, N.D., Neibergs, H.L., Wallis, D.E., Simpson, R.B.** 1994. Genus-specific detection of salmonellae in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 55:1049-1054.
- Collazo, C.M., Galan, J.E.** 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* 24:747-756.
- Collins, F.M.** 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol Rev* 38:371-402.
- Collins, F.M., Carter, P.B.** 1978. Growth of *Salmonellae* in orally infected germfree mice. *Infect Immun* 21:41-47.
- Curtiss, R. III, Kelly, S.M.** 1987. *Salmonella* Typhimurium deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun* 55:3035-3043.

- Curtiss, R. III., Porter, S.B., Munson, M., Tinge, S.A., Hassan, J.O., Gentry-Weeks, C., Kelly, S.M.** 1991. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* live vaccines for poultry, p.169-198. In L.C. Blankenship, J.S. Bailey, N.A. Cox, N.J. Stern, R.J., Meinersmann (ed), Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry. Academic Press, New York, N. Y.
- Dahl, J. Wingstand, A., Nielsen, B., Bagessen, D.L.** 1997. Elimination of *Salmonella* Typhimurium infection by strategic movement of pigs. Vet Rec 140:679-681.
- Darlow, H.M., Bale, W.R., Carter, G.B.** 1961. Infection in mice by the respiratory route with *Salmonella* Typhimurium. J Hyg 59:303-308.
- Davies, R.H., Wray, C.** 1997. Distribution of *Salmonella* on 23 pig farms in the UK. In Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. pp. 137-141.
- Davies, P.R., Bovee, F.G., Funk, J.A., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J.** 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. J Am Vet Med Assoc 212:1925-1929.
- DeGeeter, M.H., Stahl, G. L., Geng, S.** 1976. Effect of lincomycin on prevalence duration and quantity of *Salmonella* Typhimurium excreted by swine. Am J Vet Res 37:525-529.

DeGrootte, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., McCord, J.M., Dinauer, M.C., Libby, S.J., Vazquez, T.A., Xu, Y., Fang, F.C. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13997-14001.

DeJong, R., Altare, F., Haagen, I.A. 1998. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 280:1435-1438.

De Simone, C., Salvadori, B., Negri, B., Ferrazzi, R., Baldinelli, M., Vesely, R. 1986. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by conA stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutr Rep Int* 33:419-433.

Desrosiers, R. 1999. Les maladies en émergence chez le porc. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* 29:185-188.

Di Guardo, G., Fontanelli, G., Panfili, G., Condoleo, R., De Grossi, L., Brozzi, A.M., Bozzano, A.I. 1992. Occurrence of *Salmonella* in swine in the latium region (central Italy) from 1980 to 1989: A retrospective study. *Veterniray Quarterly* 14:62-65.

Dixon, J.M.S. 1965. Effect of antibiotic treatment on duration of excretion of *Salmonella* Typhimurium by children. *Br Med J* 2:1343-1345.

- Drouin, P., Rose, N., Toux, J.Y., Colin, P.** 1998. La surveillance de *Salmonella* Enteritidis dans les filières avicoles de types *Gallus*. Congrès de l'Ordre des Médecins Vétérinaires du Québec.
- Duhamel, G.E., Fedorka-Cray, P.J., Bernard, R.J., Erickson, E.D., Hygnstrom, S.E.** 1992. House mice as biological vectors of salmonellosis on swine farms in Nebraska. In Proceedings 12th International Symposium New Emerging Infect Dis, p.381.
- Dziejak, J.D.** 1987. Rapid methods for microbiological analysis of food. Food Technology 41:56-73.
- Eisenstein, T.K.** 1975. Evidence for O antigens as the antigenic determinant in « ribosomal » vaccines prepared from *Salmonella*. Infect Immun 12:364-377.
- Eisenstein, T.K., Sultzer, B.M.** 1983. Immunity to *Salmonella* infection. In host defences to intracellular pathogens. Eisenstein T.K., Actor, P., Friedman, H. eds., Plenum press, New York, pp.261-296.
- Emoto, M., Emoto, Y., Kaufmann, S.H.** 1997. Bacille Calmette Guerin and interleukin-12 down modulate interleukin-4-producing CD4+ NK1+ T lymphocytes. Eur J Immunol 27:183-188.

- Ensgraber, M., Loos, M.** 1992. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella* Typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* 60:3072-8.
- Ernst, R.K., Guina, T., Miller, S.I.** 1999. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J Infect Dis* 179:S326-330.
- Ernst, R.K., Dombroski, D.M., Merrick, J.M.** 1990. Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of Hep-2 cells by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 58:2014-2016.
- Euzéby, J.P.** 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nom., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:927-930.
- Ewing, W.H.** 1986. Isolation and preliminary identification. In Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae 4th edition. Elsevier Science publishing Co. pp.27-45.

- Falkow, S., Mekalanos, J.** 1990. The enteric bacilli and vibrios in Microbiology. Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. eds. 4th edition. pp.576-579.
- Fang, F.C.** 1999. Virulent *Salmonella* Typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. Proc Natl Acad Sci USA 96:7502-7507.
- Fedorka-Cray, P.J., Kelly, L.C., Stabel, T.J., Gray, J.T., Laufer, J.A.** 1995. Alternate routes may affect the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. Infect Immun 63:2658-2664.
- Fedorka-Cray, P.J., Bailey, J.S., Stern, N.J., Cox, N.A.** 1997. Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. In Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Denmark. pp.164-166.
- Fedorka-Cray, P.J., Bugh, E.** 1996. Results of 1995 NAHMS Swine survey in grower/finisher swine. In Proceedings 100th USAHA meeting. Little Rock. Ark.
- Fedorka-Cray, P.J., Whipp, S.C., Isaacson, R.E., Nord, N., Lager, K.** 1994. Transmission of *S. Typhimurium* to swine. Vet Microbiol 41 :333-344.
- Feng, J., Li, Y., Hashad, M., Schurr, E., Gros, P., Adams, L.G., Templeton, J.W.** 1996. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. Genome Res 6:956-964.

- Ferris, K., Frerichs, W.** 1990. *Salmonella* serotypes from animals and related sources. In Proceedings 94th Annual Meeting US Anim Health Assoc. pp.538.
- Ferris, K., Frerichs, W.** 1996. Summary of *Salmonella* isolated from swine. Ames, Iowa: Nat Vet Services Laboratories.
- Ferris, K., Thomas, L.A.** 1994. *Salmonella* serotypes from animals and related sources reported during July 1993-June 1994. In Proceedings 98th Annual Meeting US Anim Health Assoc. pp.443.
- Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G., Heffron, F.** 1986. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci USA 83:5189-5193.
- Finlay, B.B., Brumell, J.H.** 2000. *Salmonella* interactions with host cells: *in vitro* to *in vivo*. Phil Trans R Soc Lond B 355:623-631.
- Finlay, B.B., Falkow, S.** 1988. Virulence factors associated with *Salmonella* species. Microbiol Sci 11:324-28.
- Fluckiger, U., Jones, K.F., Fishetti, V.A.** 1998. Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. Infect Immun 66:974-979.

- Foulaki, K., Gruber, W., Schlecht, S.** 1989. Isolation and immunological characterization of a 55-kilodalton surface protein from *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 57 : 1399-1404.
- Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., Falkow, S.** 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature (Lond.)* 364 :639-642.
- Francisco, C.J.** 1999. Competitive exclusion and microflora management strategy for the swine industry. In: American Association of Swine Practitioners 1999: 229-232.
- Freter, R., Brickner, H., Botney, M., Cleven D., Aranki, A.** 1983. Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun* 39 :676-85.
- Fuller, R.** 1989. A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378.
- Fuller, R., Gibson, G.R.** 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 32 :28-31.
- Funk, J.A., Davies, P.R., Nichols, M.A.** 1999. Longitudinal study of *Salmonella* shedding in 2 three-site swine production systems. In Proceedings 3th International

- Symposium on Epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Washginton. pp. 131-136.
- Fukushima H., Hoshina, K., Nakamura, R., Ito, Y.** 1987. Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens* : A comparative study. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 184:60-70.
- Galan, J.E., Curtiss, R. III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 86:6383-6387.
- Galan, J.E., Curtiss, R. III.** 1990. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes is regulated by changes in DNA supercoiling. Infect Immun 58:1879-85.
- Galan, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P.** 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of InvA to members of a new protein family. J Bacteriol 174:4338-49.
- Galan, J.E., Pace, J., Hayman, J.** 1992. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella* Typhimurium. Nature 357:588-89.
- Galyov, E.E., Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Watson, P.R., Hedges, S.**

1997. A secreted effector protein of *Salmonella* Dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25:903-912.
- Garcia, V.E., Soncini, F.C., Groisman, E.A.** 1996. Mg^{2+} as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84:165-174.
- Garcia del Portillo, F., Zwick, M.B., Leung, K.Y., Finlay, B.B.** 1993. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10544-10548.
- Garcia-del Portillo, F., Finlay, B.B.** 1995. Targeting of *Salmonella* Typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 129:81-97.
- Germanier, R., Furer, E.** 1971. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of *galE* mutants of *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 4:663-673.
- Gedek, B.** 1989. Intestinal flora and bioregulation. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 8:417-433.
- Giannella, R.A., Formal, S.B., Dammin, G.J.** 1973. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit

ileum. *J Clin Invest* 52:441.

Govoni, G., Gros, P. 1998. Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 47:277-2284.

Govoni, G., Gauthier, S., Billia, F., Iscove, NN., Gros, P. 1997. Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 62:277-286.

Grasmick, A. 1992. Processing and interpretation of bacterial fecal cultures. P.1.10.1-1.10.25. In H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J. 1996. Salmonellosis in swine: A review of significant areas affecting the carrier state. In: *Proceeding of the First International Symposium on Ecology of Salmonella in Pork Production*. pp.80-103.

Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J. 1995. Update on *Salmonella Choleraesuis* in swine. In *Proceedings Livestock Conservation Institute*, April 5-7, Kansas City, MO, pp.215-218.

Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J. 1995. Influence of inoculation route on the carrier state of *Salmonella Choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* 47:43-59.

- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., Stabel, T.J., Kramer, T.T.** 1995. Transmission of *Salmonella Choleraesuis* in swine. *Applied Environ Microbiol* 62:141-146.
- Griffith, R.W., Kramer, T.T.** 1983. Sensitivity of smooth *Salmonella Choleraesuis* var *kunzendorf* field strains to antibody complement under various conditions. *Am J Vet Res* 43:1413-1417.
- Groisman, E.A., Fields, P.I., Heffron, F.** 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis, in Sokatch J.R., Nicholas O.L. (eds): *The Bacteria: A Treatise on structure and function*. San Diego, Academic Press. pp.251-271.
- Groisman, E.A., Ochman, H.** 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5:343-349.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., Gros, P.** 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 185:717-730.
- Guilloteau, L.A., Wallis, T.S., Gautier, A.V., MacIntyre, S., Platt, D.J., Lax, A.J.** 1996. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect Immun* 64:3385-3393.
- Gulig, P.A., Curtiss, R. III.** 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella Typhimurium*. *Infect Immun* 55:2891-2901.

- Gulig, P.A.** 1990. Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other salmonellae. *Micro Pathog* 8:3-11.
- Gulig, P.A.** 1996. Pathogenesis of systemic disease, in: *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Cellular and molecular biology, (F.C. Neidhardt, R.I. Curtiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Schaechter, and E.H. Umbarger, eds) ASM Press, Washington, D.C. pp. 2774-2787.
- Guo, L., Lim, K.B., Gunn, J.S.** 1997. Regulation of lipid A modification by *Salmonella* Typhimurium virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* 276:250-253.
- Guthrie, R.K.** 1992. *Salmonella*. Boca Raton, Fl, CRC Press. pp.219.
- Gutzmann, F., Layton, H., Simins, K., Jorolmen, H.** 1976. Influence of antibiotic supplemented feed on the occurrence and persistence of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected swine. *Am J Vet Res.* 37:649-655.
- Habasha, F.** 1981. Cell-mediated immunity in calves vaccinated with *Salmonella* Typhimurium. PhD dis. University of California, Davis.
- Hale, T.L., Formal, S.B.** 1988. Virulence mechanisms of enteroinvasive pathogens. In virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth, J.A. ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp.61-72.

- Hanna, J., McCracken, R., O'Brien, J.J.** 1979. Evaluation of a live *Salmonella* Choleraesuis vaccine by intranasal challenge. *Res Vet Sci* 26:216-219.
- Hardman, P.M., Wathes C.M., Wray, C.** 1991. Transmission of salmonellae among calves penned individually. *Vet Rec* 129:327-329.
- Hardt, W.D. , Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., Galan, J.E.** 1998. *S.* Typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93:815-826.
- Harris, I.T., Fedorka-Cray, P.J., Gray, J.T., Thomas, L.A., Ferris, K.** 1997. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *J Am Vet Med Assoc* 210:382-385.
- Hassan, J.O., Curtiss, R. III.** 1990. Control of colonization by virulent *Salmonella* Typhimurium by oral immunization of chickens with avirulent *cya/crp* *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol* 141:839-850.
- Hassen, A., Jedidi, N., Saidi, N., Kallali, H., Boudabous, A., Ennabli, M.** 1996. Isolation of *Salmonella* in wastewaters and study of indicator bacteria survival in soils. *Arch Inst Pasteur Tunis* 73:173-177.
- Hassett, D.J., Cohen, M.S.** 1989. Bacterial adaption to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB J* 3 :2574-2582.

- 5
- Heard, T.W., Linton, A.H.** 1966. An epidemiologic study of *Salmonella* in a closed pig herd. *J Hyg Camb* 64:411-417.
- Henry, D.P., Frost, A.J., Samuel, J.L., O'Boyle, D.A., Thomson, R.H.** 1983. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *J Appl Bacteriol* 55:89-95.
- Hensel, M.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 36:1015-1023.
- Hohmann, A., Schmidt, G., Rowley, D.** 1979. Intestinal and serum antibody responses in mice after oral immunization with *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Salmonella-Escherichia coli* hybrid strains. *Infect Immun* 25:27-33.
- Hoiseth, S.K., Stocker, B.A.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-239.
- Holt, G. J., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. 9th ed. Baltimore, U.S.A. 787 p.
- Hone, D., Morona, R., Attridge, S., Hackett, J.** 1987. Construction of defined *galE* mutants of *Salmonella* for use as vaccines. *Nature* 291:238-239.
- 6

- Hook, E.W.** 1990. *Salmonella* species (including typhoid fever), In Principles and practices of infectious disease. Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennet, J.E. eds., Churchill Livingston, New York. pp. 1700-1722.
- Howard, M.D., Gordon, D.T., Pace, L.W., Garleb, K.A., Kerley, M.S.** 1995. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J Pediatr Gastroenterol* 21:297-303.
- Hu, J.** 1996. Structural organization, sequence, and expression of the chicken NRAMP1 gene encoding the natural resistance-associated macrophage protein 1. *DNA Cell Biol* 15:113-123.
- Isaacson R.E., Weigel, R.M., Firkins, L.D., Bahnson, P.** 1999. The effect of feed withdrawal on the shedding of *Salmonella* Typhimurium by swine. In Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washington, D.C. pp.296-298.
- Jacks, T.M., Frazier, E., Judith, F., Olson, G.** 1988. Effect of ofromycin in feed on the quantity, duration, and prevalence of shedding and antibacterial susceptibility of *Salmonella* Typhimurium in experimentally infected swine. *Am J Vet Res* 49:1832-1835.
- Jacks, T.M., Welter, C.J., Fitzgerald, G.R.** 1981. Cephamycin C treatment of induced

swine salmonellosis. *Antimicrobial Agents Chemother* 19:562-566.

Jimenez-Lucho, V.E., Leive, L.L. 1990. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide in *Salmonella* in protection against complement action. In J.R. Sokatch and L. Nicholas Ornston (eds). *The Bacteria: A treatise on structure and function*. Academic Press Inc., San Diego. pp. 339-354.

Jones B.D., Lee, C.A., Falkow, S. 1992. Invasion of *Salmonella* Typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* 60:2475-80.

Jones, B.D., Ghori, N., Falkow, S. 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180:15-23.

Jones, B.D., Falkow, S. 1996. Salmonellosis: Host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14:533-561.

Jones, P.W., Dougan, G., Hayward, C., Mackenzie, N., Collins, P., Chatfield, S.N. 1991. Oral vaccination of calves against experimental salmonellosis using a double *aro* mutant of *Salmonella* Typhimurium. *Vaccine* 9:29-34.

Jones, G.W., Rabert, D.K., Svinarich, D.M., Whitfield, H.J. 1982. Association of adhesive, invasive, virulent phenotypes of *Salmonella* Typhimurium with autonomous 60-megadalton plasmids. *J Gen Microbiol* 127:351-360.

- Kailam, M., Isolauri, E., Soppi, E.** 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human lactobacillus strain. *Pediatr Res* 32:141-144.
- Kantele, A., Kantele, J.M., Arvilommi, H., Makela, P.H.** 1991. Active immunity is seen as a reduction in the cell response to oral live vaccine. *Vaccine* 9:428-443.
- Kaye, D.** 1996. *Salmonella* infections other than typhoid fever. In *Cecil Textbook of Medicine*, edited by Bennett, J.C. and Plum, F. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p.1644-1647.
- Kayser, R., Boll, R., Muller, H.E.** 1987. Quantitative studies of the elimination of *Salmonellae* by biological wastewater treatment. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 184:195-205.
- Kelly, S. M., Bosecker, B.A., Curtiss, R.D.** 1992. Characterization and protective properties of attenuated mutants of *Salmonella Choleraesuis*. *Infect Immun* 60:4881-4890.
- Kennedy, M.J., Yancey, J. R., Sanchez, M.S., Rzepkowski, R.A., Kelly, S.M., Curtiss III, R.** 1999. Attenuation and immunogenicity of $\Delta cya \Delta crp$ derivatives of *Salmonella Choleraesuis* in pigs. *Infect Immun* 67:4628-4636.

- Khalil, K., Lindblom, G.B., Mazhar, K. and Kaijser, B.** 1994. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* 113:435-444.
- Kincy-Cain, T., Clements, J.D., Bost, K.L.** 1996. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella* Dublin. *Infect Immun* 64:1437-1440.
- Kingsley, R.A., Bäumlner, A.J.** 2000. *Subcellular Biochemistry*, volume 33 : Bacterial Invasion into eucaryotic cells, edited by Oelschlaeger and Hacker. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp. 321-342.
- Kinsey, M., Dammin, G., Formal, S., Gianala, R.** 1976. The role of altered intestinal permeability on the pathogenesis of *Salmonella*-diarrhea in the rhesus monkey. *Gastroenterology* 71:429-434.
- Klein, J.** 1989. *Immunology*. Blackwell Scientific Publications pp. 376-382.
- Kramer, T.T., Rhiner, J., Beran, W.** 1995. *Salmonella* carrier detection at slaughter. Ames, IA, Iowa State University Extension.

- Kramer, T.T., Roof, M.B., Matheson, R.R.** 1992. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella* Choleraesuis for vaccination of swine. *Am J Vet Res* 53:444-448.
- Lalmanach, A.C., Lanthier, F.** 1999. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. *Microb Infect* 1:719-726.
- Lammerding, A.M., Gracia, M.M., Mann, E.D., Robinson, Y., Dorward, W.J., Truscott, R.B., Tittiger, F.** 1988. Prevalence of *Salmonella*, and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. *J Food Prot.* 51:47-52.
- Lawson, G., Dow, C.** 1966. Porcine salmonellosis. *J Comp Path* 76:363-371.
- Lee, C.A., Falkow, S.** 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4304-08.
- LeMinor, L.** 1984. Facultative anaerobic gram-negative rods, In *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Krieg, N.R., Holt, J.G. eds., Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 427-457.
- Letellier, A., Messier, S., Quessy, S.** 1997. Control of *Salmonella* in swine by use of probiotics. In *Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork. Denmark.* pp.160-163.

- Levine, M.M., Ferreccio, C., Black, R.E., Tacket, C.O., Germanier, R.** 1989. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis* 11:S552-S567.
- Li, X., Boubjellab, N., Zhao, X.** 2000. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 56:167-177.
- Libby, S.J., Goebel, W., Muir, S., Songer, G., Heffron, F.** 1990. Cloning and characterization of a cytotoxin gene from *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol* 141:775-83.
- Liles, W.C., VanVoorhis, W.C.** 1995. Review : nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* 172 :1573-1580.
- Lindberg, A.A., Robertsson, J.A.** 1983. *Salmonella* Typhimurium infection in calves : Cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect Immun* 41:751-757.
- Linton, A.H., Heard, T.W., Grimshaw, J.J., Pollard, P.** 1970. Computer-based analysis of epidemiological data arising from salmonellosis in pigs. *Res Vet Sci* 11:523-532.

- Lockman, H.A., Curtiss, R.I.** 1992. Virulence of non-type 1-fimbriated and nonfimbriated nonflagellated *Salmonella* Typhimurium mutants in murine typhoid fever. *Infect Immun* 60:491-496.
- Lucas, R.L., Lee, C.A.** 2000. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 36:1024-1033.
- Lundberg, B.E., Wolf Jr R.E., Dinauer, M.C., Xu, Y., Fang, F.C.** 1999. Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella* Typhimurium virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Infect Immun* 67:436-438.
- Mafu, A.A., Higgins R., Nadeau, M., Cousineau, G.** 1989. The incidence of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Yersinia enterocolitica* in swine carcasses and the slaughterhouse environment. *J Food Prot* 52:642-645.
- Malo, D. Vogan, K., Hu, J. Cellier, M., Schurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K., Gros, P.** 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 23:51-61.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands : big virulence in small packages. *Microb Infect* 2:145-156.

- Matsui, K., Arai, T.** 1992. The comparison of cell-mediated immunity induced by immunization with porin, viable cells and killed cells of *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Immunol* 36:269-278.
- McChesney, D.G., Kaplan, G., Gardner, P.** 1996. FDA Survey Determines *Salmonella* contamination. *Feedstuffs* 13:20-23.
- McDonough, P.L., Jacobson, R.H., Timoney, J.F.** 1989. Virulence determinants of *Salmonella* Typhimurium from animal sources. *Am J Vet Res* 5:662-670.
- McFarland, W.C., Stocker, B.A.** 1987. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella* Dublin and of two strains of *Salmonella* Typhimurium. *Micro Pathog* 3:129-141.
- McNeil, A., Dunstan, S.J., Clark, S., Strugnell, R.A.** 1995. *Salmonella* Typhimurium displays normal invasion of mice with defective epidermal growth factor receptors. *Infect Immun* 63:2770-2772.
- Means, T.K., Golenbock, D.T., Fenton, M.J.** 2000. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:219-232.
- Mellman, I.** 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575-625.

- Mestecky, J.** 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 7:265-276.
- Méresse, S., Steele-Mortimer, O., Finlay, B.B., Gorvel, J.P.** 1999. The rab7 GTPase controls the maturation of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 18:4394-4403.
- Metchnikoff, E.** 1908. *The prolongation of life.*, 1st ed. New York : Putnam Sons.
- Michalek, S.M., Childers, N.K., Dertzbaugh, M.T.** 1995. Vaccination strategies for mucosal pathogens. In virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth, J.A., Boli, C.A., Brogden, K.A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J., eds. American Society for Microbiology. pp.269-301.
- Miller, S.I., Kukral, A.M.** 1989. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella* Typhimurium virulence. *Proc Natl Acad USA* 93:9833-9838.
- Miller, S.I., Hohmann, E.L., Pegues, D.A.** 1995. *Salmonella* (including *Salmonella* Typhi), in Principles and practice of infectious disease. G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, eds) Churchill Livingstone, New York, pp. 2013-2033.
- Mills, S.D., Finlay, B.B.** 1994. Comparison of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Micro Pathog* 17:409-423.

- Mills, S.D., Finlay, B.B. 1998. Isolation and characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded. *Eur J Cell Biol* 77:35-47.
- Michetti, P., Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., Neutra, M.R. 1992. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 60:1786-1792.
- Michetti, P., Porta, N., Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., Blum, A.L., Kraehenbuhl, J.P., Neutra, M.R. 1994. Monoclonal secretory immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cells monolayers by *Salmonella* Typhimurium. *Gastroenterology* 107:915-923.
- Mold, C. 1999. Role of complement in host defense against bacterial infection. *Microbes Infect* 1:633-638.
- Morgan, I.R., Krautil, F.L., Craven, J.A. 1987. Effect of time in lairage on caecal and carcass *Salmonella* contamination of slaughter pigs. *Epidmiol Infect* 98:323-330.
- Morse, E.V., Duncan, M.A. 1974. Salmonellosis-an environment health problem. *J Am Vet Med Assoc* 165:1015-1019.

- Mousing, J., Thode Jensen, P., Bager, F., Feld, N., Nielsen, B., Nielsen, J.P., Bech-Nielsen, S.** 1997. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29:247-261.
- Moulder, J.W.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 49:298-337.
- Muirhead, S.** 1993. House mice linked to persistence of salmonellosis on pig farms. *Feedstuffs* 65:11.
- Nap, W.F., Murphy, C.** 1971. Recovery of salmonellae in feed mills, using terminally heated and regularly processed animal protein. *J Am Vet Med Assoc* 159:1569-1572.
- Ness, D., Smith, J., Talcott, A., Grumet, F.C.** 1976. T cell requirements for the expression of the lipopolysaccharide adjuvant effect in vivo: evidence for a T-dependant and a T-independant mode of action. *Eur J Immunol* 6:650-654.
- Nicolas, P., Mor, A.** 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol* 49:277-304.
- Nielsen, B., Bagessen, D., Bager, F., Haugegaard, J. Lind, P.** 1995. The serological response to *Salmonella* sérovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet Micro* 47:205-218.

- Nikaido, H., Vaara, M.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49:1-32.
- Nisbet, D.N., Anderson, R.C., Buckley, S.A., Fedorka-Cray, P.J., Stanker, L.H.** 1996. Effect of competitive exclusion on *Salmonella* shedding in swine. In Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Demark. pp-176-177.
- Nnalue, N.A, Stocker, B.A.D.** 1986. Some *galE* mutants of *Salmonella Choleraesuis* retain virulence. *Infect Immun* 54:635-640.
- Nnalue, N.A, Stocker, B.A.D.** 1987. Test of the virulence and live-vaccine efficacy of auxotrophic and *galE* derivatives of *Salmonella Choleraesuis*. *Infect Immun* 55:955-962.
- Nnalue, N.A., Lindberg, A.A.** 1990. *Salmonella Choleraesuis* strains deficient in O antigen remain fully virulent for mice by parenteral inoculation but are avirulent by oral administration. *Infect Immun* 58:2493-501.
- Nolan, L.K., Giddings, C.W., Boland, E.W., Steffen, D.J., Brown, J., Misek, A.** 1995. Detection and characterization of *Salmonella* Typhimurium from a dairy herd in North Dakota. *Vet Res Comm* 19:3-8.

Ochman, H., Groisman, E.A. 1996. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 64:5410-5412.

O'Callaghan, D., Maskell, D., Liew, F.Y., Easmon C.S., Dougan, G. 1988. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella* Typhimurium : attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 56:419-423.

Ogra, P.L., Karzon, D.T. 1969. Distribution of poliovirus antibody in serum nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. *J Immunol* 102:1423-1430.

O.M.S. Organisation mondiale de la santé. 1988. Lutte contre les salmonelloses : le rôle de l'hygiène appliquée aux animaux et aux produits- Rapport d'un comité d'experts de l'O.M.S, Genève, O.M.S. 774

Owen, W. 1990. Food animal disease monitoring in Iowa. In Proceedings 94th Annual Meeting US Anim Health Assoc p.23.

Oyarzabal, O.A., Conner, D.E. 1996. Application of direct-fed microbial bacteria and fructooligosaccharides for *Salmonella* control in broilers during feed withdrawal. *Poult Sci* 75:186-190.

Pace, J. Hayman, M.J., Galan, J.E. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. Typhimurium*. *Cell* 72:505-514.

Parker, R.B. 1974. Probiotics; the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* 29:4-8.

Parraga, M.E., Sharon, J.S., Thurmond, M., Hirsh, D. 1997. A clinical trial of probiotic administration for prevention of *Salmonella* shedding in the postoperative in horses with colic. *J Vet Int Med* 11:36-41.

Pascopella, L., Raupach, B., Ghori, N., Monack, D., Falkow, S., Small, P.L. 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun* 63:4329-4435.

Perdigon, G., Alvarez S. 1992. Probiotics and the immune state. In: Fuller, R. editor. *Probiotics. The scientific basis*. London: Chapman & Hall. pp. 145-80.

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 78:1597-1606.

Perdigon, G., Rachid, M., De Budeguer, M.V., Valdez, J.C. 1994. Effect of yogurt feeding on the small and large intestine associated lymphoid cells in mice. *J Dairy Res* 1994 61:553-62.

Pie, S., Matsiota-Bernard, P., Truffa-Bachi, P., Nauciel, C. 1996. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during early phase of *Salmonella* Typhimurium infection. *Infect Immun* 64:849-854.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Lui, MY, Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : mutations in TLR4 gene. *Science* 282 :2085-2088.

Portnoy, D.A., Smith, G.A. 1992. Devious devices of *Salmonella*. *Nature* 357:536-37.

Pospischil, A., Wood R.L., Anderson T.D. 1990. Peroxidase-antiperoxidase and immunogold labeling of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kuzendorf in tissues of experimentally infected swine. *Am J Vet Res* 51:619-624.

Prasad, R., Chopra, A.K., Charry, P., Peterson, J.W. 1992. Expression and characterization of the cloned *Salmonella* Typhimurium enterotoxin. *Microbiol Pathog* 13:109-21.

Prasad, R., Chopra, A.K., Peterson, J.W., Pericas, R. 1990. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol Pathog* 9:315-29.

Quessy, S., Scovil, C. 1999. Development and implementation of an HACCP-based on farm quality assurance program for swine in Canada. In Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washginton. pp. 373-374.

Quresni, ST., Gros, P., Malo, D. 1999. The locus LPS : genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm Res* 48 :613-620.

Ramarathinam, L., Shaban, R.A., Nielsel, D.W., Klimpel, G.R. 1991. IFN- γ production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *S. Typhimurium* challenge. *Microb Pathogen* 11:347-356.

Reed, W.M., Olander, H.J., Thacker, H.L. 1986. Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kunzendorf infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* 47:75-83.

Reitmeyer, J.C., Peterson, J.W., Wilson, K.J. 1986. *Salmonella* cytotoxin: A component of the bacterial outer membrane. *Microbial Pathog* 1:503-10.

Reynolds, I.M., Miner, P.W., Smith, R.E. 1967. *Salmonella* Enteritidis from porcine meningitis: A case report. *Cornell Vet* 58:180-185.

Rheault, N., Quessy, S. 1999. Sampling of environment and carcasses for the detection of *Salmonella* in swine abattoirs. In Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washington, D.C. pp. 280-281.

Richardson, A. 1973. Transmission of *Salmonella* Dublin to calves from adult carrier cows. Vet Rec 92:112-115.

Riley, M.G. I. 1970. The incidence of salmonellosis in normal slaughtered pigs in Australia. Aust Vet J 46:40-43.

Robbins, J.B., Chu, C., Sneerson, R. 1992. Hypothesis for vaccine development : Protective immunity to enteric diseases caused by nontyphoidal *Salmonellae* may be conferred by serum IgG antibodies to the O-specific polysaccharide of their lipopolysaccharides. Clin Infect Dis 15:346-61.

Roberts, D., Boag, K., Hall, M.L.M., Shipp, C.R. 1975. The isolation of *Salmonella* from British pork sausage and sausage meat. J Hyg (Camb) 75:173-184.

Robertson, J.A., Lindberg, A.A., Hoiseth, S., Stocker, B.A.D. 1983. *Salmonella* Typhimurium infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. Infect Immun 41:742-750.

Roof, M.B., Doitchinoff, D.D. 1995. Safety, efficacy, and duration of immunity induced in swine by use of an avirulent live *Salmonella* Choleraesuis-containing vaccine. Am J Vet Res 56:39-44.

Roof, M.B., Kramer, T.T. 1989. Porcine neutrophil function in the presence of virulent and avirulent *Salmonella* Choleraesuis. Vet Immunol Immunopathol 23:365-376.

Roof, M.B., Kramer, T.T., Roth, J.A., Minion, F.C. 1992. Characterization of a *Salmonella* Choleraesuis isolate after repeated neutrophil exposure. Am J Vet Res 53:1328-1332.

Royal, W.A., Robinson, R.A., Duganzich, D.M. 1968. Colostral immunity against *Salmonella* infection in calves. N Z Vet J 16:141-145.

Rubin, R.H., Weinskin, L. 1977. Salmonellosis. New York: Stratton Intercontinental Medical Book Corp., p.25.

Salama, N.R., Falkow, S. 1999. Genomic clues for defining bacterial pathogenicity. Microb Infect 1:615-619.

Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek 70:347-358.

Salyers, A.A., and Dixie D. Whitt. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Washington D.C. pp.229-243.

Sanford, S.E., Tilker, A.M.E. 1994. Isolations of *Salmonella Choleraesuis* var *kunzendorf* from swine herds in southwestern Ontario (1980-1993). Can Vet J 35:303.

Sansonetti, P.J. 1992. Physiopathologie de l'infection intestinale par les salmonelles. Rev Prat 42:2263-2267.

Savage, D.C. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annual Review of Microbiology 31:107-133.

Savage, D.C. 1987. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. Food Technology 41:82-87.

Saxen, H. Reima, I., Makela, P.H. 1987. Alternative complement pathway activation by *Salmonella* O polysaccharide as a virulence determinant in the mouse. Microbial Pathog 2:15-28.

Saxen, H., Nurminen, M., Kuusi, N., Svenson, S.B., Makela, P.H. 1986. Evidence for the importance of O antigen specific antibodies in mouse-protective *Salmonella* outer membrane protein (porin) antisera. Microbial Pathog 1:433-441.

Schelcher, F., Valarcher, J.F. 1997. Physiopathologie des salmonelloses bovines. Bull GTV 2:25-30.

Schwartz, K.J. 1990. Salmonellosis in midwestern swine. In Proceedings 94th Annual Meeting US Animal Health Assoc. p. 318.

Schwartz, K.J. 1991. Salmonellosis in swine. Compend Contin Educ 13:139-148.

Schwartz, K.J. 1999. Salmonellosis. In Diseases of swine. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.E., D'Allaire S., Taylor D.J. eds 8th ed. Ames, Iowa State University Press. pp.535-551.

Searle, S., Bright, N.A., Roach, T.I., Barton, C.H., Meloen, R.H., Blackwell, J.M. 1998. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. J Cell Sci 111:2855-2866.

Seat-Wan Tang, Abubakar, S., Devi, S., Puthucheary, S., Pang T. 1997. Induction and characterization of heat shock proteins of *Salmonella* Typhi and their reactivity with sera from patients with typhoid fever. Infect Immun 65:2983-2986.

Selander, R. K., Li, J., Nelson, K. 1996. Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology (F.C. Neidhardt, R.I. Curtiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B.

Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Schaechter, and E.H. Umbarger, ed.) ASM Press, Washington D.C., pp. 2691-2707.

Sell, S. 1987. Immunology, Immunopathology, and Immunity. Elsevier, New York. pp. 1-317.

Skovgaard, N., Christensen, S.G., Culistani, A.W. 1985. *Salmonellas* in Danish pigs: A comparison of three isolation methods. J Hyg (Lond) 95:69-75.

Slauch, J.M., Mahan, M.J., Mekalanos, J.J. 1994. *In vivo* expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues. Method Enzymol 235:481-492.

Smith, H.W. 1952. J Hyg (Lond) 50:21.

Smith, B.P. 1996. Salmonellosis in ruminants. In: Large Animal internal Medicine, edited by Smith, B.P. Saint-Louis: Mosby-Year Book. pp. 894-899.

Smith, B.P., Reina-Guerra, M., Hoiseth, S.K., Stocker, B.A.D., Habasha, F., Johnson, E., Merritt, F. 1984. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium as modified live vaccines for calves. Am J Vet Res 45:59-66.

Smith, H., Jones, J. 1967. Observations on experimental oral infection with *Salmonella* Dublin in calves and *S. Choleraesuis* in pigs. J Path 93:141-156.

- Spika, J.S.** 1987. Chloramphenicol-resistant *Salmonella* Newport traced through hamburgers to dairy farms. *New Eng J Med* 316:565-570.
- Stabel, T.J., Mayfield, J.E., Morfitt, D.C., Wannemuehler, M.J.** 1993. Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella* Choleraesuis [cya-12 (crp-cdt)19] mutant containing a recombinant plasmid. *Infect Immun* 61:610-618.
- Stabel, T.J., Mayfield, J.E., Tabatabai, L.B., Wannemuehler, M.J.** 1990. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella* Typhimurium containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 58:2048-2055.
- Stabel, T.J., Mayfield, J.E., Tabatabai, L.B., Wannemuehler, M.J.** 1991. Swine immunity to an attenuated *Salmonella* Typhimurium mutant containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 59:2941-2947.
- Stossel, T.P.** 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 262:1086-1094.
- Sun, H.S., Wang, L., Rothschild, M.F., Tuggle, C.K.** 1998. Mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene to pig chromosome 15. *Anim Genet* 29:138-140.

- Suter, E.** 1956. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. *Bacteriological Reviews*. 20:94-132.
- Swanenburg, M., Urlings, H.A.P., Keuzenkamp, D.A., Snijders, J.M.A.** 1999. Tonsils of slaughtered pigs as marker sample for *Salmonella* positive pork. In *Proceedings 3th International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. pp. 264-265.
- Tacal, J.V., Lawrence, W.** 1980. A survey for *Salmonella* among market swine in southern California. *Calif Vet* 11:15-18.
- Takeuchi, A., Sprinz, H.** 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infections in the preconditioned guinea pig. 2. Response of the intestinal mucosa to the invasion by *Salmonella* Typhimurium. *Am J Pathol* 51:137-46.
- Tannock, G.W., Smith, J.M.B.** 1971. A *Salmonella* carrier state involving the upper respiratory tract in mice. *J Infect Dis* 123:502-506.
- Tannock, G.W.** 1988. Mini review: molecular genetics: a new tool for investigating the microbial ecology of the gastrointestinal tract? *Microbial Ecology* 15:239-256.
- Tavendale, A., Jardine, C.H.K., Old, C., Duguid, J.P.** 1983. Hemagglutinins and adhesion of *Salmonella* Typhimurium to Hep2 and HeLa cells. *J Med Microbiol* 16:371-380.

Taylor, J., McCoy, J.H. 1969. *Salmonella* and Arizona infections and intoxications. In foodborne infections and intoxications. New York: Academic Press, pp. 3-71.

Thrusfeild, M. 1986. Veterinary Epidemiology. Butterworth and Co. Ltd, Boston, pp.55.

Tielen, M.J.M., Schie Van, F.W., Wolf Van Der, P.J., Elbers, A.R.W., Koppens, J.M.C.C., Wolbers, W.B. 1997. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection in pig herds. In Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. pp. 32-35.

Todd, E.C.D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. J Food Prot 52:595-601.

Tielen, M.J.M., Schie Van, F.W., Wolf Van der, P.J., Elbers, A.R.W. 1997. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection in pig herds. In Proceedings 2th International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Denmark. pp. 32-35.

Todd, E.C.D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis. J Food Prot 52:586-594.

Todd, E.C.D. 1997. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q.* 50:30-50.

Turk, J.R., Fales, W.H., Maddox, C., Miller, M., Pace, L. Fischer, J., Kreeger, J., Johnson, G., Turnquist, S., Ramos, J.A., Gosser, H.S. 1992. Pneumonia associated with *Salmonella Choleraesuis* infection in swine: 99 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201:1615-1616.

Udhayakumar, V., Muthkkaruppan, V.R. 1987. Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella Typhimurium* in mice. *Infect Immun* 55:816-821.

Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch Anim Nutr* 40:543-567.

Vantarakis, A., Komninou, G., Venieri, D., Papapetropoulou, M. 2000. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. mussels. *Lett Appl Microbiol* 31:105-109.

VanSchie, F.W., Overgoor, G.H.A. 1987. An analysis of the possible effects of different feed upon the excretion of *Salmonella* bacteria in clinically normal groups of fattening pigs. *The Vet Quart* 9:185-188.

Vassiliadis, P., Mavromati, C., Trichopoulos, D., Kalapothaki, V., Papadakis, J.

1987. Comparison of procedures based upon Rappaport-Vassiliadis medium with those using Muller-Kauffmann medium containing Teepol for the isolation of *Salmonella* sp. *Epidemiol Infect* 99:143-147.

Verma, N.K., Ziegler, H.K., Wilson, M., Khan, M., Safley, S., Stocker, B.A.,

Schoolnik, G.K. 1995. Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* 13:142-150.

Verjans, G.M., Janssen, R., UytdeHaag, F.G., van Doornik, C.E., Tommassen, J.

1995. Intracellular processing and presentation of T cell epitopes, expressed by recombinant *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium, to human T cells. *Eur J Immunol* 25:405-410.

Vidal, S., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73:469-485.

Waldroup, A.L., Skinner, J.T., Hierholzer, R.E., Waldroup, P.W. 1993. An evaluation of fructooligosaccharide in diets for broiler chickens and effects on *Salmonellae* contamination of carcasses. *Poult Sci* 72:643-650.

Wallis, T.S., Galyov, E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* 36:997-1005.

- Wallis, T.S., Strakey, W.G., Stephen, J., Haddon, S.J., Osborne, M.P., Candy, D.C.** 1986. The nature and role of mucosal damage in relation to *Salmonella* Typhimurium-induced fluid secretion in the rabbit ileum. *J Med Microbiol* 22:39-49.
- Wathes, C.M., Zaidan, A.R., Pearson, G.R., Hinton, M., Todd, N.** 1988. Aerosol infection of calves and mice with *Salmonella* Typhimurium. *Vet Rec* 123:590-594.
- Watson, P.R., Paulin, S.M., Bland, A.P., Jones, P.W., Wallis, T.S.** 1995. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Dublin and effect of a mutation in the *invH* gene. *Infect Immun* 63:2743-2754.
- Watson, P.R., Paulin, S.M., Jones, P.W., Wallis, T.S.** 2000. Interaction of *Salmonella* serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology* 146:1639-1649.
- Wegener, H.C., Bagessen, D.L.** 1996. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella* enterica ssp enterica sérovar Infantis by pulsed field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 32:125-131.
- Wierup, M.** 1994. Control and prevention of salmonellosis in livestock farms. In Wilcock, B., Olander, H. 1978. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella* Typhimurium. *J Am Vet Med Assoc* 172:472-477.

Wilcock, B.P., Olander, H.J. 1977. The pathogenesis of porcine rectal stricture. II. Experimental salmonellosis and rectal stricture. *Vet Pathol* 14:43-45.

Wilcock, B.P., Olander, H.J. 1978. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella* Typhimurium. *J Am Vet Med Assoc* 172:472-477.

Wilcock, B.P., Schwartz, K.J. 1992. Salmonellosis. In *Diseases of swine*. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.E., D'Allaire S., Taylor D.J. eds 7th ed. Ames, Iowa State University Press. pp.570-583.

Will, L.A., Diesch, S.L., Pomeroy, B.X. 1973. Survival of *Salmonella* Typhimurium in animal manure disposed in a model oxidation ditch. *Am J Public Health* 63:322-336.

Williams, L.P., Vaughn, J.P., Scott, A., Blanton, V. 1969. A ten-month study on *Salmonella* contamination in animal protein meals. *J Am Vet Med Assoc* 155:167-174.

Wilson, M., Seymour R., Henderson, B. 1998. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun* 66:2401-2409.

Winkler, G.C., Cheville, N.F. 1987. Postnatal colonization of porcine lung capillaries by intravascular macrophages. *Microvascular Res* 33:224-232.

Wood, R.L., Pospischil, A., Rose, R. 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* 50:1015-1021.

Wood, R.L., Rose, R. 1992. Populations of *Salmonella* Typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. *Am J Vet Res* 50:1015-1021.

Wray, C.W., Sojka, W.J. 1977. Reviews of the progress of dairy science: Bovine salmonellosis. *J Dairy Sci* 44: 383-425.

Yoshida, T., Takahashi, I., Sawada, T. 1995. Incidence and serotypes of *Salmonella* in apparently healthy swine at slaughterhouses in Japan: 1975-1989. *Nippon Saikingaru Zasshi* 50:537-545.

Zhou, D., Mooseker, M.S., Galan, J.E. 1999. Role of the *S.*Typhimurium actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283:2092-2095.

ANNEXE A : Contribution à l'avancement des connaissances.

Les travaux que nous avons effectués dans cette étude ont, d'une façon générale, contribué à l'avancement des connaissances en ce qui concerne l'épidémiologie et le contrôle des infections à *Salmonella* spp. chez l'espèce porcine. En ce qui concerne l'épidémiologie, nos travaux ont montré la distribution de ce micro-organisme dans la population porcine et dans les différents types d'élevages. De plus, ces données ont permis d'identifier le porc comme réservoir important de salmonelles.

Les travaux que nous avons effectués ont également contribué à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire de l'hôte suite à l'administration des différents traitements. La stimulation de la réponse immunitaire locale suite à l'administration du vaccin vivant avirulent jumellée à la réduction de l'état de porteur chez ces animaux a généré des données importantes pour mieux comprendre la pathogénie des infections à salmonelles et de contribuer à les contrôler chez l'espèce porcine.

De plus, les études que nous avons réalisées indiquent plusieurs avenues de recherches futures. La stimulation de la réponse immunitaire locale, incluant notamment la réponse à médiation cellulaire, via la présence de cytokines, ainsi que la présence d'immunoglobulines A semblent être des critères importants qui méritent sans doute d'être étudiés de façon plus approfondie.

L'utilisation d'une souche de *S. Choleraesuis* vivante avirulente demeure tout de même une stratégie qui comporte un certain risque de réversion à la virulence. D'autres

stratégies sont aussi à envisager afin de contrôler les infections à *Salmonella* chez le porc, notamment l'utilisation de souche bactérienne produisant des bactériocines. Ces micro-organismes colonisent l'intestin des porcelets et offrent une compétition aux agents pathogènes tels *Salmonella*. Parmi les autres stratégies possibles, le développement d'un vaccin à ADN contre *Salmonella* serait d'une grande utilité, particulièrement par sa capacité de générer simultanément l'immunité humorale et cellulaire. Ce vaccin pourrait être administré par voie parentérale afin de générer une immunité mucoale et générer une protection contre les agents pathogènes intestinaux. De plus, l'absence de réversion à la virulence, est un critère de sécurité essentiel d'un vaccin.

Finalement, cette étude soulève un point important en ce qui a trait à la résistance innée des animaux à l'infection par *Salmonella* spp. Des études supplémentaires concernant la présence de gènes liés à la résistance naturelle à l'infection par salmonelles chez l'espèce porcine seraient importantes afin de sélectionner des animaux ayant une résistance accrue aux agents pathogènes intracellulaires. En plus de l'identification de gènes de résistance, des études sur les mécanismes ou réponses immunitaires liés à ces gènes, impliquées lors de la lutte contre les infections à salmonelles seraient une avenue de recherche très intéressante pour mieux comprendre les mécanismes de résistance aux agents pathogènes intracellulaires.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- Aw : activité de l'eau
BTK : Burton's tyrosine kinase
CDC : Center of Disease Control
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
HACCP : Hazard analysis critical control points
HSP : heat-shock-proteins EGF : epidermal growth factor
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
LPS : lipopolysaccharide
MAC : complexe d'attaque membranaire
n : nombre d'échantillons
NK : natural killer
Nramp1 : natural resistance associated macrophage protein 1
PCR : polymerase chain reaction
PMN : leucocytes polymorphonucléaires
SCV : *Salmonella*-containing-vacuole
SPI : îlots de pathogénicité
SRE : système réticulo-endothéliale
SSTT : système de sécrétion de type III
TLR : Toll-like receptor
TNF : tumor necrosis factor
UFC : unité formant colonie