

2m11.3035.6

Université de Montréal

Caractérisation de souches de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium  
associées à des septicémies chez le porc

par

Jonathan Corriveau

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Avril 2002

©Jonathan Corriveau, 2002



SF

607

154

2002

N. 021

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de souches de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium  
associées à des septicémies chez le porc

présenté par

Jonathan Corriveau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Martine Boulianne, présidente-rapporteuse

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Serge Messier, membre du jury

## SOMMAIRE

*Salmonella enterica* sérovar Typhimurium est l'un des sérovars les plus fréquemment isolés chez le porc au Québec. Auparavant, cette bactérie ne causait que rarement des signes cliniques chez cette espèce animale. Or, depuis quelques années, la maladie causée par ce sérovar se présente régulièrement sous la forme d'une infection soudaine pouvant mener à la mort de sujets qui semblaient sains dans les jours précédents. En effet, des cas de salmonellose sévère caractérisés par des diarrhées abondantes, septicémies et mortalités subites sont observés. L'objectif de cette étude était de caractériser phénotypiquement des souches associées à la forme sévère de la maladie en les comparant à des souches isolées de porcs asymptomatiques, afin d'identifier une ou plusieurs protéines immunogènes associées à la virulence dans le but éventuel de développer un vaccin ou un test de dépistage pour faciliter le diagnostic. Cette caractérisation a été basée sur l'habileté des souches de *Salmonella* à adhérer et à envahir des cellules épithéliales, et sur la comparaison de profils protéiques obtenus par la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) ainsi que par immunobuvardage (Western blot) des souches cultivées dans différentes conditions. Aucune différence n'a été observée entre ces deux groupes de souches au niveau de l'habileté à adhérer aux cellules de l'hôte. Cependant, les souches associées à des septicémies chez le porc envahissent davantage ( $P < 0,05$ ) les cellules épithéliales que les souches isolées chez des porcs sains. Il n'a pas été possible d'associer de protéines aux souches isolées de porcs septicémiques mais plusieurs protéines immunogènes communes à toutes les souches septicémiques et à la plupart des souches provenant de porcs sains ont toutefois été identifiées.

Mots clés: *Salmonella* Typhimurium, porc, septicémie, adhésion, invasion, profils protéiques.



## SUMMARY

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium is the most frequently isolated from swine in Quebec. Until recently, this serotype was not associated to generalized clinical disease in swine. However, several episodes of clinical salmonellosis, characterized by diarrhea, septicemia and sudden death, has been observed in the past few years. The objective of this study was to characterize phenotypically strains isolated from diseased animals, and to compare them to strains isolated from healthy animals, in order to identify one or several immunogenic proteins which could be associated with virulence and eventually be used as a vaccine. Embryonic intestinal epithelial cell lines were used to compare adherence and invasion of both group of strains. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blots were used to compare protein profiles of strains grown in various conditions. No significant difference was noted in the adherence to cell lines for both groups of strains while strains associated with septicemia invaded epithelial cell lines at a significantly higher rate. No protein was found to be associated with septicemic strains while several immunogenic proteins were found to be common to all septicemic strains and to most strains from healthy animals.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, swine, septicemia, adhesion, invasion, protein profiles.

## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY .....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS .....	ix
REMERCIEMENTS .....	x
Chapitre 1. INTRODUCTION.....	1
Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1 Caractéristiques générales des salmonelles .....	4
2.2 Classification .....	5
2.3 Spécificité d'hôte.....	7
2.4 Distribution des salmonelles.....	8
2.5 Survie dans l'environnement.....	8
2.6 L'état de porteur .....	9
2.7 Sources de contamination.....	10
2.8 Symptômes chez le porc.....	11
2.8.1 Salmonellose septicémique .....	12
2.8.2 Salmonellose entérique .....	13
2.9 Pathogénie des infections à <i>Salmonella</i> .....	13
2.9.1 Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte .....	15
2.9.2 Invasion des cellules épithéliales de l'hôte .....	16
2.9.3 Survie à l'intérieur des macrophages .....	17
2.9.4 Pathogénie de l'infection chez le porc .....	19
2.10 Facteurs de virulence.....	19
2.10.1 Survie dans le sérum .....	19
2.10.2 Système d'acquisition du fer .....	20
2.10.3 Rôle du plasmide de virulence .....	22

2.10.4	Rôle des toxines .....	23
2.10.5	Régulation de l'expression des protéines flagellaires par inversion d'ADN.....	25
2.10.6	Îlots de pathogénicité .....	25
2.10.7	Systèmes de sécrétion de type III.....	27
2.11	Modèles d'étude de la pathogénie des salmonelles.....	27
2.11.1	Modèles d'étude <i>in vivo</i> .....	28
2.11.2	Modèles d'étude <i>in vitro</i> .....	31
Chapitre 3.	Characterization of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates associated with septicemia in swine .....	34
Chapitre 4.	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	58
4.1	Construction d'une banque de souches .....	59
4.2	Comparaison de l'habileté des deux types de souches à adhérer et à envahir les cellules de l'hôte .....	60
4.3	Comparaison des profils protéiques .....	62
Chapitre 5.	CONCLUSIONS .....	65
	BIBLIOGRAPHIE .....	67

**LISTE DES TABLEAUX**

Table I. Adherence to and invasion of Int-407 cells by <i>Salmonella</i> serovar Typhimurium isolates recovered from swine .....	54
--	----

## LISTE DES FIGURES

- Fig. 1. Comparison of Western blot profiles of proteinaceous antigens from serovar Typhimurium strain HP-01 when grown in different culture conditions..... 56
- Fig. 2. Comparison of Western blot profiles of antigens from serovar Typhimurium strains HP-04, HP-05, CS-19 and CS-21 grown *in vivo* in diffusion chambers implanted in peritoneal cavities of pigs..... 57

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine-triphosphate
DT:	Type définitif; definitive type
ELISA:	Méthode immuno-enzymatique; enzyme-linked immunoassay
IVET:	Technique d'expression <i>in vivo</i> ; <i>in vivo</i> expression technology
LPS:	Lipopolysaccharide
MOI:	Multiplicité de l'infection; multiplicity of infection
PCR:	Réaction de polymérisation en chaîne; polymerase chain reaction
PMN:	Polymorphonucléaire
PT:	Type phagique; phage type
SPI:	Îlot de pathogénicité de <i>Salmonella</i> ; <i>Salmonella</i> pathogenicity island
STM:	Mutagénèse par étiquette signature; signature- tagged mutagenesis
UFC:	Unité formant colonie

## REMERCIEMENTS

J'aimerais consacrer quelques lignes aux personnes qui, par leur aide, ont permis la réalisation de ce projet:

Mon directeur, le Dr Sylvain Quessy pour la supervision exemplaire de mon projet. Sa confiance, sa rigueur intellectuelle et ses grandes qualités humaines ont contribué à créer une ambiance de travail agréable et stimulante. Je le remercie de m'avoir initié à la recherche.

Aux Drs Robert Higgins, France Daigle, John Morris Fairbrother, Ann Letellier et Nancy Rheault pour leur contribution à mon projet.

Le personnel du Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire (LHVA) de St-Hyacinthe pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Tous les étudiants à la maîtrise et au doctorat sous la supervision du Dr Sylvain Quessy pour m'avoir grandement aidé dans mon projet.

Ma famille: mes parents, mes sœurs et mon frère pour leur encouragement tout au long de mes études.

Mes ami(e)s: Marie-Michèle B-R., Dominique B., Carole B., Marjolaine B-R. et Christian B. qui étaient toujours présents lorsque venait le temps de penser à autre chose que la recherche!

**Chapitre 1.**  
**INTRODUCTION**



*Salmonella enterica* sérovar Typhimurium est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est le principal agent causal de la salmonellose, une maladie entérique présente à travers le monde transmise à l'humain par des aliments tels la volaille, les œufs, la viande, le poisson et les produits laitiers. Au Québec, *S. Typhimurium* est présente depuis fort longtemps. Toutefois, la maladie qu'elle provoque chez le porc se présente, depuis quelques années, sous une forme différente. Alors que par le passé la bactérie ne causait que de la diarrhée et parfois du dépérissement, il lui arrive maintenant de frapper de façon foudroyante et de tuer rapidement plusieurs sujets qui, dans les jours précédents, semblaient tout à fait sains. Ceci est d'autant plus préjudiciable que les pertes surviennent souvent quand les porcs ont atteint le poids du marché. Chez les animaux atteints, l'organisme peut être isolé de plusieurs organes, indiquant qu'il s'agit bien d'une septicémie et non d'une infection limitée au système digestif. Aucune étude n'a été publiée jusqu'à maintenant sur les souches de *S. Typhimurium* associées à des septicémies chez le porc. L'objectif principal de cette étude consistait donc à caractériser phénotypiquement ces souches afin de pouvoir identifier des protéines immunogènes associées à la virulence. Les résultats obtenus aideront à la compréhension de la pathophysiologie et de l'épidémiologie de ces infections et à la mise au point éventuelle d'un vaccin ou d'un test de dépistage facilitant le diagnostic.

**Chapitre 2.**  
**RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## 2.1 Caractéristiques générales des salmonelles

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* (LeMinor, 1984). Les membres de cette famille sont souvent nommés entérobactéries ou bactéries entériques (du grec *enterikos*, appartenant à l'intestin) (Prescott *et al.*, 1995). Ces bactéries sont des bacilles à Gram négatif mobiles non sporulants et anaérobie facultatifs ayant 0,7-1,5 x 2,0-5,0  $\mu\text{m}$  de dimension (LeMinor, 1984). Bien que la plupart des salmonelles soient mobiles grâce à des flagelles péritriches, des mutants non mobiles peuvent être rencontrés et deux sérovars, les sérovars Pullorum et Gallinarum, sont toujours non mobiles (LeMinor, 1984). Ces bactéries forment généralement de larges colonies (2-4 mm de diamètre), mais certaines peuvent former de petites colonies atypiques (~1 mm de diamètre) (LeMinor, 1984). Les *Salmonella* spp. sont des bactéries qui causent chez l'homme et les mammifères des maladies variant d'une légère gastroentérite à des infections systémiques (Miroid *et al.*, 2001). Le type et la sévérité des lésions sont déterminés tant par les caractéristiques de virulence des souches de *Salmonella* que par l'espèce hôte (Miroid *et al.*, 2001).

Les infections causées par *Salmonella* spp. représentent un problème de santé publique majeur à travers le monde, avec un nombre de cas estimés à 1,3 milliard chaque année (Pang *et al.*, 1995). La salmonellose est, avec la campylobactériose, l'une des plus importantes maladies entériques humaines à travers le monde (Santos *et al.*, 2001). Il s'agit de l'infection alimentaire ayant la plus forte prévalence aux Etats-Unis après les infections à *Campylobacter*, où le nombre d'infection est estimé à 1 412 498 annuellement (Mead *et al.*, 1999). Elle se déclare après une période d'incubation parfois inférieure à huit heures (Prescott *et al.*, 1995). Le terme salmonellose est habituellement utilisé pour désigner les infections causées par les sérovars de salmonelles autres que Typhi et Paratyphi puisque ces derniers sont associés aux infections systémiques. Dans les pays industrialisés, la fièvre typhoïde a virtuellement disparue, mais les salmonelloses humaines sont observées en nombre croissant (Sansonetti, 1992). Les principaux facteurs contribuant à cette augmentation de cas seraient associés au développement de l'industrie agro-

alimentaire, en particulier à la production en masse de volailles, d'aliments à base d'œufs, de viandes, de poissons et de produits laitiers (Prescott *et al.*, 1995; Sansonetti, 1992). Dans une étude portant sur les maladies d'origine alimentaire de 1977 à 1984, Bryan (1988) a observé que le porc était responsable de 11% des épidémies à *Salmonella* attribuable à la viande. De plus, Bean et Griffin (1990) ont rapporté qu'entre 1973 et 1987, le porc avait été à la source de 25 épidémies d'origine alimentaire.

## 2.2 Classification

Les *Salmonella* spp. ont divergé du genre *Escherichia* il y a environ 100 à 160 millions d'années (Doolittle *et al.*, 1996; Ochman *et al.*, 1987) et les différentes lignées de salmonelles ont divergé entre elles il y a environ 50 millions d'années (Lawrence et Ochman, 1997). Des résultats obtenus avec la technique d'hybridation d'ADN indiquent que les *Salmonella* spp. hébergent un fragment d'ADN de 400 à 800 kb qui est absent du génome d'*E. coli* (Riley et Anilionis, 1978). La plupart de cet ADN additionnel a joué un rôle dans l'évolution de *Salmonella* en tant que pathogène (Miroid *et al.*, 2001). Récemment, le génome de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium ainsi que celui de *Salmonella enterica* sérovar Typhi ont été complètement séquencés (McClelland *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2001).

Deux espèces sont actuellement reconnues dans le genre *Salmonella*: *Salmonella enterica*, qui est composé de six sous-espèces (*S. enterica* subsp. *enterica* [désignée sous-espèce I], *S. enterica* subsp. *salamae* [sous-espèce II], *S. enterica* subsp. *arizonae* [sous-espèce IIIa], *S. enterica* subsp. *diarizonae* [sous-espèce IIIb], *S. enterica* subsp. *houtenae* [sous-espèce IV], *S. enterica* subsp. *indica* [sous-espèce VI], et *Salmonella bongori* (autrefois sous-espèce V). L'espèce type est *S. enterica* subsp. *enterica* (Farmer, 1999). Les souches de la sous-espèce I sont habituellement isolées chez l'humain et chez les animaux à sang chaud. Les souches des sous-espèces II, IIIa, IIIb, IV, VI et *S. bongori* sont quant à elles isolées d'animaux à sang froid et de l'environnement (rarement chez l'humain).

Actuellement, 2435 sérovars de *Salmonella* sont connus. La plupart, incluant *Salmonella* sérovar Typhi et *Salmonella* sérovar Typhimurium, appartiennent à la sous-espèce I (1435 sérotypes reconnus) et sont retrouvés dans les groupes d'antigène O suivants: A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3, et E4. Les deux sérovars les plus communément isolés aux États-Unis sont Typhimurium et Enteritidis (Farmer, 1999).

Il existe plusieurs façons de nommer les membres du genre *Salmonella*, mais aucune n'est complètement acceptée par la communauté scientifique. Le «World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*», localisé à l'Institut Pasteur à Paris, en France, a désigné les sérovars appartenant à la sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica* ou sous-espèces I avec un nom qui se rapporte à l'endroit (géographique) où le sérovar a été isolé en premier. Le nom du sérovar est écrit en lettre romaine (non en italique) et la première lettre est en majuscule (par exemple, *Salmonella* sérotype [ser.] Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium). Les sérovars appartenant à d'autres sous-espèces sont désignés par leur formule antigénique suivi par le nom de la sous-espèce (par exemple, *S. enterica* subsp. *salamae* ser. 50:z:e,n,x ou *Salmonella* sérovar II 50:z:e,n,x). «The National *Salmonella* Reference Laboratory» du «Center for Disease Control» (CDC) utilise cette nomenclature avec comme variante le terme «sérotipe» à la place de «sérovar». Ils encouragent fortement cet usage parce que cela communique les liens taxonomiques appropriés de plus de 2400 membres distincts des deux espèces (Farmer, 1999).

Le schéma de Kauffmann-White, dans lequel les organismes sont représentés par des nombres et des lettres attribués aux différents antigènes O (somatiques), Vi (capsulaires) et H (flagellaires) permet de subdiviser les salmonelles en sérovars (LeMinor, 1984). L'antigène O correspond à une séquence particulière de sucres composant le LPS (Guthrie, 1992). Dans le cas de l'antigène flagellaire H, deux types sont possibles et sont désignés phase 1 et phase 2 (Guthrie, 1992; LeMinor, 1984). En plus des antigènes O et H, certains sérovars, notamment les sérovars

Typhi, Paratyphi A et Paratyphi C, possèdent l'antigène Vi. Cet antigène capsulaire est aussi désigné antigène K (Guthrie, 1992). La formule antigénique résume l'unique combinaison des antigènes associés avec un sérovar. Par exemple, la formule antigénique du sérovar Typhimurium – 1,4,5,12 : i : 1,2 – est établie à partir des antigènes O et H (LeMinor, 1984). Par la suite, il est possible d'utiliser la lysotypie afin de préciser l'identification. Cette méthode est basée sur la susceptibilité de souches de *Salmonella* à une série de bactériophages. Il est alors possible de distinguer deux souches appartenant au même sérovar. Par exemple, *Salmonella* Typhimurium DT104 et *Salmonella* Typhimurium DT193.

### 2.3 Spécificité d'hôte

Certains sérovars sont spécifiques à un hôte. Ces derniers se sont adaptés pendant leur évolution à certains animaux, ce qui a coïncidé avec un changement de certaines propriétés physiologiques. Le genre *Salmonella* peut être divisé en trois groupes basés sur leur association avec l'humain ou l'animal comme hôte (Clarke et Gyles, 1993). Le premier groupe a l'humain comme hôte spécifique. Les membres de ce groupe sont *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Schottmuelleri*, *S. Hirschfeldii* et *S. Sendai*. *S. Typhi*, *S. Paratyphi* et *S. Hirschfeldii* montrent une adaptation stricte pour l'humain mais *S. Schottmuelleri* est occasionnellement retrouvé chez les animaux. Le deuxième groupe consiste en des organismes qui sont plus ou moins adaptés à un hôte animal spécifique. Par exemple, *S. Dublin* s'est adapté aux bovins, *S. Pullorum* et *S. Gallinarum* se sont adaptés à l'espèce aviaire, *S. Abortusovis* aux moutons, *S. Abortusequi* aux chevaux et *S. Typhisuis* et *S. Choleraesuis* aux porcs (Clarke et Gyles, 1993; Schwartz, 1999). Le dernier groupe est composé des sérovars de *Salmonella* qui n'ont pas d'hôte spécifique. Ces derniers causent des pathogénies chez les humains et chez une variété d'animaux. La plupart des salmonelles appartiennent à ce groupe, mais un petit nombre de sérovars, incluant *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*, tendent à être impliqués dans la plupart des cas de maladie chez les hommes et les animaux (Clarke et Gyles, 1993).

## 2.4 Distribution des salmonelles

Les salmonelles sont très répandues dans la nature. Ces microorganismes sont des habitants naturels du tractus intestinal des animaux de consommation, incluant les bovins, les porcs, les moutons, les poulets, les dindes et les canards. Les animaux domestiques notamment le chien, le chat et les tortues hébergent aussi des salmonelles ainsi que plusieurs espèces d'animaux sauvages (pigeons, reptiles, souris, rats) de même que des insectes (Guthrie, 1992). Comme il habite le tractus intestinal de plusieurs espèces animales, *Salmonella* spp. est excrété par les animaux infectés via les matières fécales. L'environnement devient donc contaminé par les bactéries et ces dernières peuvent croître dans la nourriture, l'eau et sur des objets inanimés. Parfois, elles viennent en contact avec d'autres animaux susceptibles et une nouvelle infection débute (Guthrie, 1992).

## 2.5 Survie dans l'environnement

Les salmonelles sont des bactéries mésophiles; elles se développent à une température optimale de 37°C, ont une température de croissance minimale de 10°C et leur température de croissance maximale se situe à 45°C (Prescott *et al.*, 1995). Les salmonelles supportent une gamme de pH allant de 4 à 9 (Guthrie, 1992). Elles sont sensibles à la chaleur et leur viabilité est affectée aux environs de 60°C. Toutefois, si elles sont dans un milieu avec une haute teneur en gras et une basse teneur en humidité, tel le chocolat, elles peuvent survivre jusqu'à 70°C (Guthrie, 1992). Ces bactéries résistent à la dessiccation et se développent assez bien en conditions humides (valeurs d'activité de l'eau ( $A_w$ ) de 0,945 à 0,999) (Guthrie, 1992). L'addition de sel à la nourriture a été longtemps utilisée comme méthode de préservation mais cette méthode n'a que peu d'effet sur *Salmonella* puisque certaines d'entre elles peuvent survivre pendant des semaines dans un environnement contenant 20% de sel (Guthrie, 1992). Les salmonelles ont donc la capacité de survivre dans différentes conditions environnementales.

## 2.6 L'état de porteur

Bien que les salmonelles puissent survivre pendant de longues périodes dans l'environnement, ce sont les animaux porteurs qui sont la source principale d'infection pour les animaux et l'homme. L'état de porteur est caractérisé par l'absence de maladie évidente chez l'animal. Cependant, l'animal porteur est capable de transmettre l'infection à des individus susceptibles. Il peut répandre un nombre élevé de salmonelles (jusqu'à  $10^5$ /g) dans les fèces. L'état de porteur est tributaire de l'interaction de plusieurs facteurs comme le sérovar, l'âge de l'animal et le nombre de bactéries ingérées (Clarke et Gyles, 1993).

Certains sérovars semblent plus adaptés pour induire l'état de porteur que d'autres. Les jeunes animaux excrètent souvent des salmonelles seulement durant la convalescence, alors que les adultes semblent plus adaptés à devenir des porteurs chroniques (Clarke et Gyles, 1993). Une faible dose de salmonelles, insuffisante pour causer la maladie, peut résulter en un état de porteur (Clarke et Gyles, 1993).

Plusieurs types de porteurs ont été identifiés. Le porteur actif excrète des salmonelles pendant des mois ou même des années. Les porteurs passifs sont, pour leur part, des animaux qui ingèrent des salmonelles qui transitent par les intestins jusque dans les fèces sans aucune ou une faible invasion des nœuds lymphatiques mésentériques. Ces animaux cessent de répandre des salmonelles rapidement après avoir été retirés d'un environnement contaminé (Clarke et Gyles, 1993).

Il a été démontré que certains facteurs de stress pouvaient promouvoir l'excrétion de salmonelles par les porteurs asymptomatiques et mener à l'activation ou à la réactivation de la maladie chez les animaux porteurs. Le transport des animaux, le surpeuplement, l'administration de corticostéroïdes, la parturition et les infections simultanées virales ou causées par des protozoaires sont tous reliés à une augmentation de la susceptibilité de l'animal à la maladie (Clarke et Gyles, 1993).



Chez l'humain, des porteurs actifs peuvent aussi être présents dans la population et il est possible que les personnes infectées puissent représenter un danger en santé publique. Un exemple de ceci est représenté par l'histoire de Mary Mallon. Entre 1896 et 1906, cette dame a été cuisinière dans sept familles de la ville de New York. Vingt-huit cas de fièvre typhoïde sont apparus pendant qu'elle y travaillait. En conséquence, le département de la santé de la ville avait arrêté Mary et l'avait placé dans un hôpital pour patients infectieux. L'examen des selles de Mary avait montré qu'elle excrétaient un grand nombre de bactéries de la typhoïde malgré le fait qu'elle n'avait aucun symptôme de la maladie. Un article publié en 1908 dans le *Journal of the American Medical Association* fait référence à «Mary typhoïde». Porteuse tout au long de sa vie, Mary Mallon a été tenue responsable de 10 épisodes de fièvre typhoïde, 53 cas et 3 décès (Prescott *et al.*, 1995).

## 2.7 Sources de contamination

Comme *Salmonella* habite le tractus intestinal des vertébrés, les déjections de ces derniers peuvent entraîner une contamination de l'eau, de la nourriture et de l'environnement. Les engrais et la nourriture contenant des produits d'origine animale sont parfois une source d'infection pour les animaux. La salmonellose est une importante zoonose et, bien que la transmission humain à humain se produise, les animaux et leurs sous-produits constituent la plus importante source de ces organismes pour l'humain (Clarke et Gyles, 1993).

Il a été rapporté que les porcs peuvent être infectés par de la nourriture contaminée, des animaux porteurs chroniques introduits dans le troupeau, les rongeurs, ou les gens qui ont visité une ferme contaminée avant d'accéder à l'unité de production (Buxton et Fraser, 1988; Schwartz, 1999). À l'abattoir, la source initiale de contamination de l'environnement et des animaux est le porc porteur. La transmission peut survenir par des contacts directs (porc-porc) ou par une exposition à un environnement contaminé (Newell et Williams, 1971). Wood et Rose (1992) ont

démontré que *Salmonella* Typhimurium persiste chez le porc en petite quantité pendant au moins 28 semaines après une infection expérimentale.

Bien que *Salmonella* puisse pénétrer à l'intérieur du corps par le pharynx, le tractus respiratoire, ou la conjonctive, ces microorganismes ont habituellement l'accès à l'hôte par la voie orale et rejoignent alors l'intestin, où ils envahissent les entérocytes. Les facteurs de l'hôte reliés à l'immunité non spécifique et qui affectent l'habileté des microorganismes à s'établir incluent l'acidité gastrique, le péristaltisme, la muqueuse intestinale, les lysozymes présents dans les sécrétions, la lactoferrine dans le tractus gastrointestinal et finalement la flore intestinale. Il semble qu'un nombre élevé d'organismes soit requis pour initier la pathogénie. Par conséquent, les maladies expérimentales et naturelles sont toutes deux facilitées par l'élévation du pH gastrique, par un affaiblissement du péristaltisme et une interférence avec la flore normale de l'intestin (Clarke et Gyles, 1993).

Les méthodes de détection des porcs porteurs de salmonelles sont limitées, la plus courante étant la culture et l'identification du microorganisme à partir des fèces. Cependant, une technique sérologique plus récente est disponible et une étude a été réalisée afin de comparer la méthode de culture conventionnelle à la méthode sérologique utilisant un test ELISA. Dans cette récente étude, les auteurs ont conclu que l'ELISA était utile pour détecter *S. Typhimurium* et *S. Brandenburg* dans les troupeaux mais que cette technique était d'une valeur limitée pour démontrer la présence d'anticorps dans le sérum dirigés contre les sérovars Livingstone, Goldcoast et Panama (van Winsen *et al.*, 2001).

## **2.8 Symptômes chez le porc**

Les signes cliniques de la salmonellose porcine sont associés à la forme septicémique ou à la forme entérique de la maladie.

### 2.8.1 Salmonellose septicémique

Cette forme de maladie, causée habituellement par le sérovar Choleraesuis, se produit surtout chez les porcs en sevrage qui sont âgés de moins de 5 mois mais peut aussi être rencontrée occasionnellement chez les porcs prêts pour le marché, les porcelets en allaitement, ou les porcs destinés à l'élevage (Schwartz, 1999; Whiteman et Schwartz, 1998). Ce sérovar est toutefois très rare au Canada où on observe de plus en plus de cas de septicémies reliés au sérovar Typhimurium (Letellier *et al.*, 1999).

#### Signes cliniques

Les porcs infectés par le sérovar Choleraesuis présentent une perte d'appétit, un état léthargique et fébrile, une augmentation de la température corporelle à 40,5-41,6°C et peuvent avoir une toux humide superficielle avec une légère dyspnée. Le premier signe évident de la maladie peut être le fait d'observer des porcs prostrés dans le coin d'un enclos, ou même mort, avec une cyanose aux extrémités et à l'abdomen. La diarrhée n'est pas toujours une caractéristique de la salmonellose septicémique avant le 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour de maladie, lorsque des fèces aqueuses jaunâtres peuvent être observées. Dans la plupart des épisodes, la mortalité est élevée et la morbidité est variable mais habituellement inférieure à 10%. La durée de la maladie chez les porcs est imprévisible mais sera prolongée sans intervention médicale. La maladie se dissémine par ingestion de fèces contaminées ou par sécrétions du nasopharynx, avec une période d'incubation allant de 2 jours à plusieurs semaines. Les porcs qui survivent peuvent demeurer porteurs et peuvent excréter des salmonelles dans leurs fèces pour aux moins 12 semaines (Schwartz, 1999; Whiteman et Schwartz, 1998). Les cas associés à *Salmonella* Typhimurium présentent une image clinique similaire à l'exclusion de la cyanose des extrémités (Desrosiers, 1999).

### 2.8.2 Salmonellose entérique

La salmonellose entérique est plus fréquente chez les porcs à partir de l'âge du sevrage jusqu'à l'âge d'environ 4 mois. La maladie peut être aiguë ou chronique et est souvent attribuée au sérovar Typhimurium (incluant la variété *copenhagen*) ou, moins fréquemment, au sérovar Choleraesuis. Bien que l'isolement de d'autres sérovares de salmonelles chez des porcs ayant une diarrhée se produit rarement, l'implication de sérovares autres que Choleraesuis, Typhimurium et peut-être Heidelberg comme pathogène primaire doit aussi être pris en considération car la maladie n'est pas restreinte à ces trois sérovares (Schwartz, 1999; Whiteman et Schwartz, 1998).

#### Signes cliniques

Le signe clinique initial est une diarrhée aqueuse jaunâtre, initialement sans sang ou mucus. La maladie peut s'étendre rapidement et toucher la plupart des porcs d'un même enclos à l'intérieur de quelques jours. La diarrhée initiale chez un porc dure habituellement de 3 à 7 jours, mais peut réapparaître 2 à 3 fois, donnant l'impression d'une diarrhée qui dure plusieurs semaines. Du sang peut apparaître sporadiquement dans les fèces. Les porcs infectés sont fébriles, anorexiques et déshydratés. La mortalité est habituellement faible et se produit seulement après plusieurs jours de diarrhée. La plupart des porcs ont un rétablissement complet mais une portion peut demeurer porteur et excréter des salmonelles de façon intermittente pendant au moins 5 mois (Schwartz, 1999; Whiteman et Schwartz, 1998).

### 2.9 Pathogénie des infections à *Salmonella*

Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* vivent à l'intérieur du tractus gastrointestinal. Une fois ingérées, ces bactéries se déplacent vers l'estomac (pH acide), passent à travers le petit intestin (environnement microaérophile, relativement stérile et à pH neutre) et se rendent jusqu'au gros intestin (riche en

bactéries, anaérobie) (Rakeman et Miller, 1999). Dans le cas de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, la phase de colonisation se produit au niveau du petit intestin et les bactéries s'y multiplient. Le caecum, lieu de multiplication, semble être le site d'une étape importante dans l'infection (Contag *et al.*, 1995). Dans l'intestin, il y a une interaction entre la face apicale des cellules épithéliales et les bactéries, qui résulte en la formation d'appendices appelés invasomes (Ginocchio *et al.*, 1994). Ceci provoque alors une dégénérescence des microvillosités et de la bordure en brosse et ce phénomène induit des ondulations membranaires des cellules épithéliales (Gahring *et al.*, 1990). Cet effet que provoquent les bactéries sur les cellules hôtes est appelé «ruffling» à cause d'une apparence de ride sur la membrane déformée des cellules de l'hôte (Salyers et Whitt, 1994).

À ce stade, les salmonelles sont observées dans les vacuoles des cellules épithéliales et la bordure en brosse se régénère alors. Il est à remarquer que les bactéries s'associent préférentiellement aux cellules M des plaques de Peyer (Clark *et al.*, 1994). Ceci constitue un avantage pour *Salmonella* car les cellules M possèdent une activité d'endocytose élevée, ce qui favorise l'entrée des salmonelles. Après l'internalisation, la destruction des cellules M survient rapidement (Lee *et al.*, 1996). Après une période de latence de plusieurs heures et une multiplication intracellulaire intense d'une durée de 12-24 h, la plupart des cellules épithéliales contiennent de larges vacuoles remplies de salmonelles (Finlay *et al.*, 1988b). Par la suite, les phagocytes de la lamina propria les internalisent. Les bactéries phagocytées demeurent en vie et se retrouvent véhiculées jusqu'aux nœuds lymphatiques régionaux et jusque dans le foie et la rate, organes pour lesquels les salmonelles possèdent un tropisme particulier (Dunlap *et al.*, 1992; Nnalue *et al.*, 1992). Les salmonelles peuvent se multiplier dans ces organes avant d'être disséminées par voie sanguine (Finlay et Falkow, 1988). *Salmonella* passe donc, pendant les principales étapes de la pathogénie, la majorité du temps à l'abri du système immunitaire, à l'intérieur des cellules de l'hôte. C'est pourquoi on le qualifie de parasite intracellulaire facultatif. Ce terme a été originalement inventé par Suter (1956) pour référer aux organismes capables de survivre et/ou de se répliquer à l'intérieur des

cellules de l'hôte. Plus tard, Moulder (1985) raffinait la description de ce terme pour inclure les pathogènes spécifiquement capable de survivre à l'intérieur des cellules phagocytaires professionnelles. Cela les distingue des pathogènes intracellulaires obligatoires, qui se répliquent à l'intérieur des cellules non-phagocytaires.

Les sérovars responsables de gastroentérites, dont Typhimurium, ne pénètrent généralement pas au-delà de la membrane basale de l'épithélium intestinal. Lors de salmonellose entérique, les symptômes sont liés en partie à la sécrétion d'entérotoxines, mais surtout à la destruction des villosités avec perturbation des fonctions d'absorption, et à une inflammation importante augmentant les sécrétions (Finlay et Falkow, 1988). Par contre, lors de maladies septicémiques, l'endotoxine libérée lors de la lyse des bactéries est responsable du choc septique (Salyers et Whitt, 1994).

Beaucoup de travaux se sont déroulés ces dernières années concernant chacune des étapes de la pathogénie des infections à *Salmonella*. On connaît à ce jour plusieurs des mécanismes qu'utilise cette bactérie pour arriver à ses fins. Il est donc nécessaire d'exposer séparément chaque étape et de regarder dans le détail ce qui se produit.

### 2.9.1 Adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte

Deux étapes distinctes, mais complémentaires l'une à l'autre, sont nécessaires à l'adhésion des salmonelles aux cellules épithéliales. La première est réversible et est réalisée par le biais des fimbriae, également appelés pili. Le mot fimbriae est un terme plus approprié que pili car ce dernier est normalement réservé pour la structure plus longue et plus flexible impliquée lors de la conjugaison (Salyers et Whitt, 1994). Les fimbriae sont des appendices flexibles ou rigides exprimés à la surface de plusieurs espèces bactériennes. Une même bactérie peut en exprimer simultanément plusieurs types (Bäumer et Heffron, 1995). Ainsi, avant d'envahir n'importe quel type cellulaire, les bactéries doivent rencontrer et s'attacher à un ou à plusieurs types

de cellule retrouvés dans l'intestin. Un tel tropisme de *S. Typhimurium* peut impliquer plusieurs types de fimbriae et quatre d'entre eux ont été génétiquement caractérisés: le fimbriae Fim (fimbriae de type 1), le fimbriae PE (pour «plasmid-encoded fimbriae»), le fimbriae LP (pour «long polar fimbriae») et le fimbriae de type curli («thin aggregative fimbriae») (Darwin et Miller, 1999). Bien qu'un certain nombre d'études *in vitro* utilisant différentes lignées cellulaires ont montré que les fimbriae interviennent dans l'adhésion des salmonelles et contribuent à l'invasion des cellules, leur rôle dans l'infection est encore controversé. La deuxième étape implique des protéines bactériennes indispensables à l'adhésion irréversible et à l'invasion. C'est suite à l'interaction bactérie-cellule hôte que la synthèse d'ARN et de protéines bactériennes est induite (Finlay *et al.*, 1989b).

### 2.9.2 Invasion des cellules épithéliales de l'hôte

En plus d'exprimer différentes protéines selon l'environnement dans lequel elle se trouve, *Salmonella* semble induire, via un système de sécrétion de type III, des signaux variés lors de l'invasion de différents types cellulaires (Finlay *et al.*, 1989a; Galan et Ginocchio, 1994). Ces signaux sont nécessaires à l'entrée de la bactérie dans la cellule car ils impliquent une cascade d'événements. Tout d'abord se produit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, signal qui active les enzymes de dépolymérisation de l'actine (Salyers et Whitt, 1994). Une réorganisation des filaments d'actine provoque alors des ondulations membranaires (en anglais «ruffling») à cause de l'agrégation des protéines de surface (Garcia-del Portillo *et al.*, 1994). Ceci permet finalement l'internalisation de la bactérie.

Une fois à l'intérieur de la cellule, les bactéries se retrouvent dans une vacuole et de l'actine polymérisée, alors que la tropomyosine et la tubuline s'accumulent auprès de cette vésicule (Finlay *et al.*, 1991). Les vacuoles contenant des salmonelles migrent ensuite vers le pôle apical des cellules et les bactéries sont expulsées vers la lamina propria. L'invasion bactérienne est un processus qui requiert de l'énergie puisqu'un grand nombre de protéines sont synthétisées chez la bactérie. De plus, des

cellules hôtes viables sont indispensables à cette étape de la pathogénie (Kusters *et al.*, 1993).

### 2.9.3 Survie à l'intérieur des macrophages

Suite à la réaction inflammatoire survenue conséquemment à la multiplication des salmonelles à l'intérieur des vacuoles, les macrophages de la lamina propria phagocytent les bactéries qui s'y trouvent. Ces dernières sont alors véhiculées par ces macrophages circulants, puis sont retrouvées dans les macrophages spléniques et hépatiques. Après la formation du phagolysosome (fusion du phagosome et du lysosome), les bactéries font face à une collection d'enzymes hydrolytiques et d'autres peptides du lysosome. Ces mécanismes antimicrobiens des phagocytes ont été classifiés comme étant dépendants ou indépendants de l'oxygène. Les mécanismes dépendants de l'oxygène génèrent des molécules réactives à l'intérieur du phagosome, comme des anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, des molécules d'hypochlorite et des radicaux hydroxyl. Les mécanismes indépendants de l'oxygène incluent l'acidification du phagosome, l'activité d'enzymes de dégradation déposées dans le phagosome lors de la fusion avec le lysosome et l'activité antibiotique de petits peptides cationiques appelés défensines retrouvés dans les macrophages et les polymorphonucléaires de plusieurs espèces (Abshire et Neidhardt, 1993).

Il existe une controverse dans la littérature quant à savoir si les salmonelles inhibent ou non la fusion du phagosome et du lysosome. Par exemple, Buchmeier et Heffron (1991) ont fourni l'évidence que *S. Typhimurium* possède l'habileté d'inhiber la fusion phagosome-lysosome. Ils ont montré qu'environ la moitié des phagosomes dans lesquels *S. Typhimurium* résidait n'étaient pas fusionnés avec des lysosomes. De plus, ils ont démontré que seuls les phagosomes dans lesquels les bactéries étaient dans un processus de division cellulaire n'étaient pas fusionnées à un lysosome. Il est possible que *S. Typhimurium* puisse survivre d'une part en inhibant la fusion phagosome-lysosome et d'autre part en s'adaptant aux conditions dans les



phagolysosomes (Abshire et Neidhardt, 1993). D'autres auteurs affirment que les salmonelles n'inhibent pas la fusion phagosome-lysosome et que ce phénomène survient rapidement (Oh *et al.*, 1996).

Un nombre impressionnant de gènes sont nécessaires à la survie de *Salmonella* dans les macrophages. Le criblage de mutants de *S. Typhimurium* générés au hasard par transposition-insertion a permis d'identifier plusieurs loci qui sont essentiels pour la survie des bactéries dans les phagocytes. Cependant, jusqu'à maintenant, seulement quelques uns ont été caractérisés. D'après la fréquence avec laquelle de tels mutants peuvent être isolés, il a été estimé que pas moins de 200 gènes pouvaient être impliqués (Salyers et Whitt, 1994). Clairement, *S. Typhimurium* a développé une réponse complexe à l'ingestion par les phagocytes. La complexité de cette réponse est aussi révélée par la comparaison de gels de profils protéiques, par électrophorèse à deux dimensions, de bactéries à l'intérieur de lignées cellulaires semblable aux macrophages («macrophagelike cell lines») à ceux de bactéries dont la croissance s'est effectuée dans des milieux de culture. On a montré une augmentation de l'expression d'approximativement 40 protéines en réponse à l'ingestion par les phagocytes alors que l'expression d'environ 100 protéines était réprimée (Abshire et Neidhardt, 1993). Ces changements ne sont pas associés avec la seule réponse au stress mais semblent refléter une réponse à un certain nombre d'environnements différents, incluant le pH acide et les formes réactives de l'oxygène (Salyers et Whitt, 1994).

Les salmonelles sont toxiques pour les macrophages. Ce mécanisme de virulence de *S. Typhimurium* suggère que la mort des macrophages, suivie par la fuite des salmonelles, constituent aussi des étapes importantes de la pathogénie (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997; Lindgren *et al.*, 1996). La survie à l'intérieur des macrophages est donc une étape clé dans la virulence des salmonelles.

#### 2.9.4 Pathogénie de l'infection chez le porc

Même si des différences sont notées au niveau des signes cliniques, plusieurs parallèles peuvent être faits entre *S. Choleraesuis* et *S. Typhimurium* en ce qui concerne la pathogénie chez le porc. À ce jour, le nombre d'études sur les infections à salmonelles chez l'espèce porcine est limité. Cependant, certains aspects de la pathogénie sont connus. On sait entre autre que des doses élevées (supérieures à  $10^7$  UFC) sont requises pour induire la maladie expérimentalement (Schwartz, 1999). Dans le cas de faibles doses provenant d'aliments ou d'eau contaminée, une répllication intraluminaire des salmonelles permet de causer l'infection chez l'animal. Avec *S. Typhimurium*, une répllication permettant d'atteindre une dose d'environ  $10^7$  UFC/g de contenu intestinal est requise pour initier la maladie chez le porc (Schwartz, 1999). Par contre, une infection avec le sérovar *Choleraesuis* ne requiert pas une dose aussi massive comme condition préalable à la maladie puisque ce sérovar possède une plus grande habileté à envahir les cellules de l'hôte (Schwartz, 1999).

Certaines études *in vivo* ont généré des résultats intéressants sur la pathogénie des infections à salmonelles chez le porc. Ainsi, une étude utilisant des porcs inoculés par voie orale et utilisant un modèle d'anses ligaturées a montré que la dissémination des salmonelles dans les nœuds lymphatiques mésentériques survient rapidement. Dans le modèle d'anses ligaturées, la dissémination dans les nœuds lymphatiques mésentériques se produit 2 heures post-inoculation alors qu'elle se produit après 24 heures par voie orale (Reed *et al.*, 1986).

### 2.10 Facteurs de virulence

#### 2.10.1 Survie dans le sérum

Lorsque que les *Salmonella* envahissent le corps, elles rencontrent le système du complément. Par conséquent, un facteur de virulence important est l'habileté à

résister à cette attaque. Une des principales cibles du complément est la couche de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif. Un aspect qui contribue à la résistance au complément est la longueur de la chaîne des antigènes O des LPS. De longues chaînes de l'antigène O entraînent la formation du complément assez loin pour prévenir son interaction avec la membrane externe de la bactérie (Salyers et Whitt, 1994). Un autre aspect qui contribue à la résistance au complément est la production d'une protéine sur la membrane externe, nommée Rck (pour «resistance to complement killing»). Rck est codée par un gène qui se trouve sur le plasmide de virulence de *S. Typhimurium*. Cette protéine agit en prévenant la formation et l'insertion des complexes tubulaires C9 polymérisés (la dernière étape dans la formation du complément) à l'intérieur de la membrane externe (Salyers et Whitt, 1994).

#### 2.10.2 Système d'acquisition du fer

L'acquisition de fer est un besoin essentiel pour tous les microorganismes à l'exception de certains lactobacilles et de *Borrelia burgdorferi* (Posey et Gherardini, 2000). Cependant, les concentrations en fer disponibles dans la nature sont généralement plutôt faibles. Chez les mammifères, ce métal est lié à des protéines eucaryotes comme l'hémoglobine, la ferritine, la lactoferrine, et la transferrine, ce qui maintient un niveau de fer libre extrêmement bas ( $10^{-18}$  M), insuffisant pour maintenir la croissance bactérienne. En réponse à une infection, la disponibilité du fer libre dans les fluides corporels est réduite en déplaçant le fer de la transferrine à la lactoferrine dans le foie (Carniel, 2001). Ce phénomène est appelé hypoferrémie induite et fait parti de la réponse immune non-spécifique. Pour les pathogènes bactériens, le succès de l'établissement de la maladie dépend de l'habileté du microorganisme à acquérir le fer. Il doit donc s'adapter aux milieux faibles en fer retrouvés *in vivo* et développer des systèmes de transport du fer de haute affinité. Un de ces systèmes pour acquérir ce métal essentiel est la synthèse et la sécrétion de composés de faible poids moléculaire qui chélatent les ions  $Fe^{3+}$ , appelés sidérophores, et qui peuvent être désignés comme facteur de virulence (Carniel,

2001). À cause de leur haute affinité pour le fer, les sidérophores peuvent chélater le métal lié aux protéines de l'hôte et le transporter à la bactérie. Le complexe sidérophore-Fe<sup>3+</sup> reconnaît un récepteur spécifique situé sur la membrane externe de la bactérie et est transloqué dans le cytosol avec l'aide de protéines localisées dans le périplasme et dans la membrane interne de la paroi cellulaire. Dans le cytosol bactérien, le fer est clivé du sidérophore et utilisé pour différentes voies métaboliques (Salyers et Whitt, 1994; Carniel, 2001).

Bien qu'il ait été montré que l'acquisition de fer basée sur les sidérophores contribuait à la virulence de quelques bactéries pathogènes, les mutations qui éliminent la production du sidérophore ne diminuent pas toujours cette virulence (Salyers et Whitt, 1994). Ceci peut être expliqué par le fait que les bactéries possèdent souvent plus d'un système d'acquisition du fer et un mutant déficient dans un des systèmes peut être encore capable de survivre en comptant sur le ou les systèmes qui restent. Il est aussi possible que les systèmes d'acquisition du fer basés sur les sidérophores soient adaptés principalement à la survie des bactéries à l'extérieur du corps, dans le sol et l'eau, alors que d'autres stratégies d'acquisition du fer soient plus importantes dans le corps humain (Salyers et Whitt, 1994).

*S. Typhimurium* peut synthétiser l'entérochéline (ou entérobactine), un sidérophore de la famille des phénolates. Des auteurs ont montré que ce sidérophore favorise la croissance dans le sérum murin mais n'est pas indispensable à la virulence chez la souris (Benjamin *et al.*, 1985). La localisation intracellulaire de *Salmonella* permettrait à la bactérie de conserver sa virulence en absence de sidérophores.

Une autre stratégie possible d'acquisition du fer par les bactéries pathogènes est la production de facteurs toxiques qui tuent les cellules hôtes. Les exotoxines sont produites seulement lorsque le niveau de fer est faible. Puisque ces protéines toxiques tuent les cellules hôtes, elles peuvent faire partie d'une stratégie d'acquisition du fer dans laquelle les cellules hôtes tuées par la toxine libèrent leurs provisions de fer (principalement la ferritine ou l'hémine), qui peuvent être captées

par la bactérie via des protéines liant la ferritine ou liant l'hémine (Salyers et Whitt, 1994).

Il a été récemment démontré que le SPI1 de *S. Typhimurium* porte des gènes (*sitABCD*) formant un nouveau système d'acquisition du fer (Janakiraman et Slauch, 2000; Zhou *et al.*, 1999). Ce système appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), transporteurs membranaires qui utilisent l'ATP comme source d'énergie, et est homologue à l'opéron *yfe* de *Yersinia pestis* qui code aussi pour un transporteur ABC de fer. Cet opéron est largement distribué parmi les sérovars de *S. enterica*. Un mutant de *S. Typhimurium* portant une délétion au niveau de *sitBCD* est virulent dans un modèle expérimental chez la souris après une infection par voie orale (Zhou *et al.*, 1999), mais un mutant déficient au niveau de *sitA* montre une virulence atténuée (Janakiraman et Slauch, 2000) dans ce même modèle.

### 2.10.3 Rôle du plasmide de virulence

Certains sérovars de *Salmonella*, dont *Typhimurium*, hébergent de grands plasmides variant en taille de 50 à 90 kb appelés plasmide de virulence (Gulig, 1990). Le rôle des déterminants de virulence codés sur le plasmide n'est pas clair à cause de rapports contradictoires (Gulig *et al.*, 1993). Cependant, il est généralement accepté que le plasmide de virulence de *S. Typhimurium* est important pour causer une infection systémique après inoculation expérimentale par voie orale (Gulig *et al.*, 1992). Plusieurs loci de virulence ont été clonés et identifiés sur le plasmide de virulence, incluant les gènes *spv* (pour «*Salmonella* plasmid virulence») (Gulig *et al.*, 1992) et *rck* (pour «resistance to complement killing») (Hackett *et al.*, 1987). La perte de ce plasmide réduit la capacité de la bactérie à provoquer une infection systémique chez la souris. Cependant, la région *spv* (8 kb) est suffisante pour restaurer l'habileté des souches de *S. Typhimurium* sans plasmide à causer de telles infections chez la souris. Cette région, qui est retrouvée sur tous les plasmides de virulence étudiés jusqu'à maintenant, contient cinq gènes qui ont été désignés *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* et *spvD* (Salyers et Whitt, 1994). Le plasmide n'a aucun effet sur

l'invasion de cellules en culture et il n'est pas nécessaire à l'invasion des organes profonds. En revanche, il augmente le taux de croissance des salmonelles dans le foie et la rate (Gulig et Doyle, 1993). Les plasmides de *S. Dublin* et de *S. Choleraesuis* jouent un rôle dans les formes septicémiques chez les veaux et les porcelets, respectivement (Danbara *et al.*, 1992; Wallis *et al.*, 1995).

#### 2.10.4 Rôle des toxines

##### Endotoxine

La plupart des bactéries à Gram négatif ont, dans la membrane externe de leur paroi, un lipopolysaccharides (LPS) qui est toxique pour des hôtes spécifiques. Ce LPS s'appelle une endotoxine parce qu'il est fixé à la bactérie. Les LPS sont de grandes molécules complexes contenant à la fois des lipides et des glucides; elles sont formées de trois parties: 1) le lipide A, 2) le polysaccharide central (aussi appelé core oligosaccharidique), et 3) la chaîne latérale O. Le LPS de *Salmonella* sérovar Typhimurium a été le plus étudié. La région du lipide A contient deux dérivés de glucosamine, chacun avec trois acides gras et des phosphates ou des pyrophosphates attachés. Le lipide A est enfoui dans la membrane externe tandis que le reste de la molécule de LPS est projeté vers l'extérieur. Chez *Salmonella*, le polysaccharide central est constitué de 10 sucres, dont plusieurs ont une structure inhabituelle. La chaîne latérale O (aussi appelé antigène O) est une chaîne polysaccharidique courte s'étendant au delà du polysaccharide central. La chaîne latérale O est constituée de quelques sucres et sa composition varie selon les souches bactériennes (Prescott *et al.*, 1995). Le lipide A est toxique; ses effets sont liés à l'activation de phénomènes inflammatoires importants. Il est de plus responsable de la plupart des symptômes de la fièvre typhoïde et du choc septicémique consécutif à une bactériémie. Étant donné que le lipide A est ancré dans la membrane externe, il exerce son effet seulement lorsque la bactérie est lysée (Salyers et Whitt, 1994).

## Entérotoxines

Le terme entérotoxine désigne une exotoxine qui cause la diarrhée ou le vomissement (c'est-à-dire des symptômes entériques) (Salyers et Whitt, 1994). Plusieurs exotoxines bactériennes sont excrétées dans le milieu lorsque les bactéries croissent. La plus étudiée de ces toxines chez les salmonelles est Stn de *S. Typhimurium*. Le gène qui code pour Stn (*stn*) a été cloné et on a montré qu'il codait pour une protéine de 29 kDa ayant des similarités de séquence avec la sous-unité A de la toxine du choléra de *Vibrio cholerae* et avec la toxine labile à la chaleur de *Escherichia coli* (Chopra *et al.*, 1987; Chopra *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1992). Une autre entérotoxine, de 100 kDa, thermolabile et non reliée à la toxine cholérique, active sur cellules CHO et sur anses iléales ligaturées de lapin, a été décrite chez *S. Typhimurium* (Rahman *et al.*, 1994).

## Autres toxines

Un autre type d'exotoxine, les cytotoxines, sont produites par *S. Typhimurium*. Les cytotoxines sont des exotoxines qui attaquent spécifiquement un type cellulaire donné (Salyers et Whitt, 1994). On en dénombre au moins deux chez *S. Typhimurium*: une de 26 kDa codée par *cyx* et toxique pour de nombreuses lignées cellulaires (Libby *et al.*, 1990) et une de 32 kDa active sur des macrophages (Kita *et al.*, 1993). Une cytolysine codée par *slyA* (salmolysine) qui favorise la survie dans les macrophages murins péritonéaux et qui est impliquée dans la virulence chez la souris a aussi été décrite (Libby *et al.*, 1994). Cette dernière est une toxine de la famille RTX, des cytolysines des bactéries à Gram négatif provoquant la formation de pores dans la membrane plasmique. Son rôle dans la destruction des cellules M et la survie intracellulaire a été par la suite démontré (Daniels *et al.*, 1996).

### 2.10.5 Régulation de l'expression des protéines flagellaires par inversion d'ADN

Chez *S. enterica* sérovar Typhimurium, l'expression des flagelles est contrôlée par un phénomène appelé variation de phase, un mécanisme par lequel l'organisme exprime alternativement deux types différents de sous-unités protéiques, FljB et FliC (Ikeda *et al.*, 2001). La variation de phase des flagelles a été décrite en premier chez *Salmonella* par Andrewes (1922) il y a environ 80 ans. Depuis ce temps, plusieurs études se sont concentrées sur le mécanisme moléculaire de la variation de phase des flagelles et un modèle a été généré. Ce processus implique l'inversion d'approximativement 1 kb d'ADN portant le promoteur de *fljB*. Dans une orientation, le promoteur est situé directement en amont de l'opéron *fljBfljA* (Osuna *et al.*, 1995). Dans cette position (position ON), la transcription de *fljB* et de *fljA* peut se faire, et la transcription de *fljC*, localisé ailleurs sur le chromosome, est réprimé par le produit du gène *fljA* (Ikeda *et al.*, 2001). Dans l'orientation opposée (position OFF), *fljB* et *fljA* ne sont pas transcrits, ce qui interrompt la répression de *fljC*. Une salmonelle n'exprime donc jamais qu'une variété de protéine flagellaire, mais au cours de la prolifération d'un clone, certaines cellules modifient spontanément l'expression de leur protéine flagellaire vers l'autre variété. Il y a alors toujours une faible proportion (environ 1/1000) de salmonelles qui ne sont pas attaquées par le système immunitaire car elles expriment l'autre variété de protéine flagellaire (Lodish *et al.*, 1997).

### 2.10.6 Îlots de pathogénicité

Les îlots de pathogénicité sont des groupes de gènes de virulence acquis par transfert horizontal et présents chez les organismes pathogènes mais absents des bactéries non pathogènes apparentées (Groisman et Ochman, 1996; Hacker *et al.*, 1997). Les îlots de pathogénicité sont importants dans l'évolution des pathogènes bactériens puisque leur acquisition détermine souvent les propriétés de virulence d'un microorganisme. Par exemple, les souches de *Escherichia coli* entéropathogéniques hébergent un îlot de pathogénicité de 35 kb, nommé LEE, qui code pour l'habileté à



former des lésions d'attachement et d'effacement dans les cellules épithéliales intestinales (McDaniel *et al.*, 1995). De plus, l'introduction de LEE dans une souche de *E. coli* bénigne lui confère la capacité de produire ces lésions (McDaniel et Kaper, 1997).

Par contre, *Salmonella* sérovar Typhimurium possède un cycle de vie complexe chez les animaux infectés et requiert un grand nombre de gènes de virulence afin de survivre à l'intérieur de l'hôte. Bien que plusieurs de ces déterminants de virulence sont aussi présents chez les espèces non pathogènes, plusieurs autres sont codés dans des régions du chromosome qui sont spécifiques à *Salmonella* (Groisman et Ochman, 1994). Par exemple, la vaste majorité des gènes qui confèrent l'habileté d'envahir les cellules épithéliales résident dans le SPI-1 (pour «*Salmonella* Pathogenicity Island 1»), un îlot de pathogénicité de 40 kb situé au niveau du centisome 63 sur le chromosome de *S. Typhimurium* (Ehrbar *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 1995; Galan, 1996). Des mutations dans plusieurs gènes du SPI-1 rendent les bactéries non cytotoxiques pour les macrophages (Chen *et al.*, 1996; Monack *et al.*, 1996). Un deuxième îlot de pathogénicité, SPI-2, héberge des gènes qui sont indispensables pour la survie et la réplication à l'intérieur des macrophages et pour causer des maladies systémiques (Hensel *et al.*, 1998; Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). De plus, des mutations dans SPI-2 rendent *Salmonella* moins cytotoxique pour les macrophages en culture et moins invasif pour les cellules Hep-2 (Hensel *et al.*, 1997). Jusqu'à maintenant, cinq îlots de pathogénicité ont été identifiés et il est intéressant de remarquer que tous ces SPI sont directement ou indirectement impliqués dans la survie à l'intérieur des macrophages ou dans la cytotoxicité des macrophages. Le SPI-3 est requis pour la survie à l'intérieur des macrophages et contribue à la survie dans un environnement ayant une carence en magnésium (Baumler *et al.*, 1994). Le rôle putatif du SPI-4 serait, comme le SPI-2 et le SPI-3, relié à la survie à l'intérieur des macrophages (Wong *et al.*, 1998). Finalement, le SPI-5 serait impliqué dans la migration des polymorphonucléaires neutrophiles (Lucas et Lee, 2000).

### 2.10.7 Systèmes de sécrétion de type III

L'habileté à envahir les cellules épithéliales de l'hôte constitue une étape essentielle dans le cycle de vie du pathogène entérique *Salmonella enterica*. Le processus d'invasion est médié par un système de sécrétion contact-dépendant qui permet à ce pathogène d'injecter ses protéines effectrices dans le cytosol des cellules hôtes. Ce système, communément appelé système de sécrétion de type III, est retrouvé chez plusieurs pathogènes des animaux et, remarquablement, il est aussi présent chez un certain nombre de bactéries pathogènes des plantes. Le fait que l'infection des cellules des animaux et des plantes peut être facilité par le même mécanisme de virulence démontre la versatilité de ce système de sécrétion.

Chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, on retrouve au moins deux de ces systèmes de sécrétion qui semblent exercer leurs fonctions à différentes étapes du processus d'infection. Un des deux systèmes de sécrétion de type III est situé dans un îlot de pathogénicité au niveau du centisome 31 (SPI-2) et semble exercer ses fonctions durant le cours de l'infection systémique (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996). L'autre système est situé au niveau du centisome 63 (SPI-1) et est impliqué dans une phase précédente dans le processus d'infection (Galan et Curtiss, 1989). Plus précisément, ce dernier système est requis pour l'entrée dans les cellules épithéliales médiée par le cytosquelette d'actine, pour l'induction de réponses menant à la production de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales intestinales et pour l'initiation de la mort programmée dans les macrophages (Galan, 1999).

## 2.11 Modèles d'étude de la pathogénie des salmonelles

Les modèles d'étude de la pathogénie des bactéries permettent d'analyser l'évolution de l'infection chez un hôte ou un aspect du processus infectieux. Les connaissances acquises à partir d'études sur l'animal ou sur cellules sont précieuses

pour mieux comprendre la pathogénie, et peuvent ensuite déboucher sur des stratégies de lutte contre ces infections, dont la vaccination.

#### 2.11.1 Modèles d'étude *in vivo*

Les modèles animaux sont onéreux et peu commodes à utiliser. Cependant, leur utilisation est indispensable pour rechercher les organes cibles, pour tester le rôle d'un facteur de virulence pour l'espèce animale considérée, ou pour mettre au point des stratégies vaccinales efficaces. De plus, ces modèles sont indispensables à la validation d'études effectuées *in vitro*.

##### Modèles d'étude chez la souris

Le modèle d'étude de la typhoïde humaine est la typhoïde murine à *S. Typhimurium*. Largement utilisé, il a permis de montrer l'importance des gènes de virulence plasmidiques *spv* (Gulig et Doyle, 1993), et de gènes chromosomiques *inv* intervenant dans l'invasion (Galan et Curtiss, 1989) ou du gène *pagC* favorisant la survie dans les macrophages (Gunn *et al.*, 1995). Il a été également utilisé pour l'étude de la spécificité d'hôte (Pascopella *et al.*, 1995).

##### Modèles d'étude chez la volaille

Différents modèles ont été développés pour étudier la virulence de souches de salmonelles pour le poulet (Bumstead et Barrow, 1988; Gast et Benson, 1995), la poule pondeuse (Baskerville *et al.*, 1992; Lindell *et al.*, 1994) ou le canard (Buchholz et Fairbrother, 1992). Ces études ont permis de préciser la pathogénie de l'infection des volailles par les salmonelles (Baskerville *et al.*, 1992), de comparer la virulence de différentes souches de salmonelles (Gast et Benson, 1995; Poppe *et al.*, 1993), d'étudier la spécificité d'hôte (Barrow *et al.*, 1994) et la résistance génétique aux salmonelles chez les volailles (Guillot *et al.*, 1995; Lindell *et al.*, 1994).

## Modèles d'étude chez le porc

Chez le porc, les modèles d'étude de la pathogénie des salmonelles ont permis de déterminer le taux de transmission de *S. Typhimurium* chez des porcs exposés à des fèces contaminées ou à des porcs initialement exempts de salmonelles en contact avec d'autres porcs excréant  $2,69 \log_{10}$  UFC/g de fèces (Fedorka-Cray *et al.*, 1994). D'autres études ont permis de démontrer la distribution dans les organes et l'excrétion de *S. Typhimurium* chez des porcs infectés par voie orale (Wood et Rose, 1992; Wood *et al.*, 1989).

## Autres modèles d'étude *in vivo*

Les techniques *in vitro* ont été énormément utiles et continuent de fournir beaucoup d'informations sur les mécanismes des pathogènes bactériens, mais il est évident qu'elles ne peuvent reproduire tous les aspects des interactions hôte-pathogène. Conséquemment, un gène qui semble important dans les études *in vitro* n'est pas nécessairement aussi important dans les études *in vivo* et les gènes qui apparaissent inutiles *in vitro* peuvent jouer un rôle critique durant une infection naturelle. Récemment, différentes méthodes qui simplifient grandement les analyses *in vivo* utilisant un nombre élevé de souches bactériennes ont été développées. Deux de ces méthodes sont la technique IVET (*In vivo* expression technology) et la mutagénèse par étiquette signature (Signature-tagged mutagenesis: STM).

La technique IVET originale (Mahan *et al.*, 1993) est réalisée en créant des fusions transcriptionnelles de fragments pris au hasard sur le chromosome de *S. Typhimurium* avec un gène *purA* sans promoteur (Chiang *et al.*, 1999). Ce gène est par la suite introduit dans le chromosome d'une souche de *S. Typhimurium*  $\Delta purA$  (auxotrophe pour la purine) par recombinaison homologue. Puisque la purine est essentielle pour la croissance de *S. Typhimurium* chez la souris, seuls les souches exprimant *purA* issu de promoteurs fusionnés vont survivre. La population bactérienne représentant l'ensemble des fusions chromosomiques sont alors injectées

par voie intrapéritoniale chez des souris BALB/c. Les bactéries survivantes sont récupérées après 3 jours et criblées sur milieu de culture afin de retrouver les clones ayant une faible activité du promoteur. On obtient donc des clones ayant introduits un promoteur exprimé *in vivo* et inactif *in vitro*.

Une approche différente afin d'étudier les pathogènes bactériens *in vivo* est la mutagenèse par étiquette signature (Chiang *et al.*, 1999). Il s'agit d'une technique d'hybridation comparative qui utilise une collection de transposons, chacun d'eux étant modifiés par incorporation de séquences différentes d'ADN (appelées tags). Les tags sont de courts segments d'ADN qui contiennent une région centrale variable de 40 pb flanquée par des bras invariants qui facilitent l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Lorsque les transposons sont utilisés pour obtenir des mutants, chaque mutant individuel peut, en théorie, être distingué des autres par les différents tags portés par les transposons à l'intérieur de son génome. Dans cette technique, les mutants sont sujets à un processus sélectif comme l'infection d'un animal et le PCR est utilisé pour préparer les sondes correspondantes aux tags présents dans l'ensemble des mutants de présélection et de postsélection. L'hybridation des tags provenant de l'ensemble des mutants de la présélection et de la postsélection permet l'identification des mutants qui sont capables de survivre au processus de sélection puisque les tags portés par ces mutants ne seront pas présents chez les mutants de la postsélection. Ces mutants peuvent alors être retrouvés à partir de la présélection et la séquence nucléotidique de l'ADN flanquant l'insertion du transposon peut être déterminée. La mutagenèse par étiquette signature permet donc l'identification de gènes codant pour des protéines essentielles à la survie *in vivo*.

Une façon ingénieuse de permettre aux bactéries de rencontrer les conditions *in vivo* sans avoir recours aux outils de la biologie moléculaire est l'utilisation de chambres de diffusion. Ces chambres de diffusion sont conçues de sorte que les bactéries demeurent emprisonnées à l'intérieur d'une chambre, entre deux filtres de 0,22 µm. Les bactéries présentes dans les chambres de diffusion sont donc en contact avec l'environnement présent chez l'hôte. Elles peuvent alors être déposées à

l'intérieur de l'hôte (au niveau intrapéritonéal par exemple) et être retirées après incubation. Les chambres de diffusion ont d'abord été utilisées chez le rat afin de caractériser la membrane externe et les porines de *Serratia marcescens* (Malouin *et al.*, 1990), mais il est possible de les utiliser chez d'autres espèces animales, dont le porc.

#### 2.11.2 Modèles d'étude *in vitro*

Différents tests *in vitro* ont été développés comme méthodes alternatives pour l'étude de facteurs de virulence de souches bactériennes. Ces méthodes sont plus souples d'utilisation et permettent une meilleure standardisation des conditions expérimentales.

##### Monocouches de cellules épithéliales

Le modèle *in vitro* le plus répandu d'étude de bactéries entéropathogènes utilise des monocouches de cellules épithéliales. L'invasion bactérienne est quantifiée grâce à l'utilisation de la gentamicine, qui élimine les bactéries extracellulaires. Les bactéries intracellulaires viables sont ensuite dénombrées pour déterminer l'efficacité de l'invasion, souvent exprimée en pourcentage de l'inoculum bactérien initial (Tang *et al.*, 1993). De nombreuses lignées cellulaires ont été employées: cellules HeLa, Hep-2, Henle-407 et Vero. Les tests d'invasion peuvent permettre l'exploration fine de mécanismes impliqués: la fonction du cytosquelette (Finlay *et al.*, 1991; Garcia-del Portillo *et al.*, 1994; Mills et Finlay, 1994) ou l'induction des voies de communication avec la cellule hôte (Lee *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1993).

##### Monocouches épithéliales polarisées

Quelques lignées cellulaires épithéliales peuvent être cultivées sur des membranes poreuses formant alors des monocouches épithéliales polarisées.

L'avantage de tels systèmes est, notamment, l'utilisation de structures en bordure en brosses. La lignée Mardin-Darby canine kidney (MDCK) et trois lignées cellulaires humaines adénocarcinomateuses, Caco-2, HT-29 et T84 ont été utilisées dans un tel système (Tang *et al.*, 1993). Les monocouches ont des jonctions serrées fonctionnelles et sont imperméables aux ions. La mesure de la résistance électrique transépithéliale permet d'évaluer l'intégrité de l'épithélium (Finlay *et al.*, 1988a). L'adhésion des bactéries aux surfaces apicale et basolatérale, l'invasion, et la pénétration au travers de la monocouche peuvent être mesurées, par exemple avec des bactéries marquées par un radioisotope (Finlay *et al.*, 1988b). La pénétration des bactéries au travers de la monocouche, appelée transcytose, peut être quantifiée, en prélevant à différents moments des échantillons du milieu opposé à celui où les bactéries ont été ajoutées (Finlay *et al.*, 1988a). Là aussi, des microorganismes marqués peuvent être utilisés avec mesure de la radioactivité présente dans les deux milieux (apical et basolatéral), ainsi que dans la monocouche épithéliale (Finlay *et al.*, 1989a). Des observations de telles structures ont été effectuées en microscopie électronique (Garcia-del Portillo *et al.*, 1994; Mills et Finlay, 1994). L'addition de cellules mobiles immunitaires (comme les polymorphonucléaires: PMN) à de tels systèmes permet de mimer encore mieux des conditions rencontrées *in vivo*. Ceci permet par exemple l'analyse des signaux bactériens responsables de la migration des PMN avec *S. Typhimurium* (McCormick *et al.*, 1995).

### Macrophages en culture

Tel que mentionné précédemment, la survie à l'intérieur des macrophages constitue une étape clé dans la virulence de *Salmonella* et de nombreux gènes semblent être impliqués. L'étude de ces gènes contribuant à la survie et à la croissance dans un environnement intracellulaire peut être réalisée en utilisant des macrophages en culture. Des macrophages de souris, isolés de la moelle osseuse, de la rate ou d'un liquide d'ascite (Buchmeier et Heffron, 1989; Riikonen *et al.*, 1992) ont été utilisés ainsi que plusieurs lignées de macrophages murins et/ou aviaires comme J774, U937 et C3H/HeJ (Abshire et Neidhardt, 1993; Gahring *et al.*, 1990;

Kita *et al.*, 1993). La survie et la multiplication intracellulaire dans les macrophages peuvent être évaluées dans un modèle d'invasion proche de celui décrit pour les cellules épithéliales. Le taux de croissance bactérien intracellulaire dans les macrophages est variable selon leur origine, mais *S. Typhimurium* peut se multiplier dans des macrophages d'origines très différentes (Buchmeier et Heffron, 1989).



**Chapitre 3.**  
**Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**  
**isolates associated with septicemia in swine**

**Article soumis pour publication**  
**dans la revue**  
**Veterinary Microbiology**

Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  
isolates associated with septicemia in swine

J. Corriveau, S. Quessy

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc, Département de  
microbiologie et pathologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,  
C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6.

Address for correspondence and reprint request to Dr. S. Quessy, tel.: 450-773-8521  
X8242, fax: 450-778-8113, e-mail: [sylvain.quessy@umontreal.ca](mailto:sylvain.quessy@umontreal.ca).

*Keywords:* *Salmonella* Typhimurium; swine; septicemia; adhesion; invasion; protein  
profiles.

## Abstract

The aim of this study was to characterize isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium associated with septicemia in swine and to compare them to isolates recovered from clinically healthy carrier pigs. We were particularly interested in comparing both groups of isolates in regard to (i) their ability to invade host cells, (ii) their ability to adhere to host cells and (iii) their protein profiles when grown under different conditions, as seen by Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot. No significant difference was detected in adherence to embryonic intestinal epithelial cell lines, with the exception that isolates recovered from diseased animals invaded epithelial cell lines at a higher ratio. Although it was impossible to associate one particular protein to septicemic isolates, some immunogenic proteins present in all virulent isolates and in most isolates from clinically healthy carrier animals were identified.

## Introduction

*Salmonella* species are Gram-negative, facultative anaerobes, motile bacteria that cause diseases in humans ranging from a mild gastroenteritis (*Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis) to a systemic disease that can result in death (*Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi) (Darwin and Miller, 1999).

In pigs, *Salmonella* infections are associated with significant animal suffering and economic losses and pigs may be a reservoir of infection for humans (Berends et al., 1997). Natural infection of pigs with serovar Choleraesuis is usually associated with systemic disease, whereas infection with serovar Typhimurium is associated with enteric disease (reviewed by Schwartz, 1999). However, an increasing number of septicemic episodes of *Salmonella* Typhimurium, associated with severe clinical signs and sudden death have been observed in the past few years (Desrosiers, 1999; Letellier et al., 1999a). In these animals, the serovar Typhimurium can be isolated from multiple organs. This serovar is also one of the most frequently isolated serovars from apparently healthy pigs in Canada (Letellier et al., 1999b).

The aim of this study was to characterize isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium associated with septicemia in swine and to compare them to isolates recovered from clinically healthy carrier pigs. We were particularly interested in comparing both groups of isolates in regard to (i) their ability to invade host cells, (ii) their ability to adhere to host cells and (iii) their protein profiles when grown under different conditions, as seen by Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot.

## Materials and methods

### Bacterial strains

The *S. enterica* serovar Typhimurium strain SL1344 previously described as highly invasive in *in vitro* invasion assays and fully virulent for mice (Hoiseh and Stocker, 1981; Kusters et al., 1993) was kindly provided by Dr. F. Daigle, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC. The nonadhesive, noninvasive *Escherichia coli* strain 862B (kindly provided by Dr. J. M. Fairbrother, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC) was used as negative control in invasion and adhesion assays. This strain was isolated from the intestinal contents of a pig and is considered as non virulent (Fairbrother et al., 1989; Ngeleka et al., 1993). *Salmonella* isolates recovered from extra-intestinal organs from diarrheic and/or septicemic pigs and submitted to necropsy were obtained from Dr. R. Higgins (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC), while those from clinically healthy pigs originated from previous studies in our laboratory (Letellier et al., 1999a; Rheault and Quessy, 2001). All strains and isolates used in this study were sensitive to colistin (polymyxin E, 150 µg/mL; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO). Unless noted otherwise, bacterial cultures were carried out at 37°C in Luria-Bertani (LB) Miller Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) or on LB containing 1.5% (w/v) agar. Isolates were stored at -70°C in LB supplemented with 35% (v/v) glycerol. All isolates were sent to Health Canada Laboratory in Guelph (Ontario) for serotyping and phagotyping under the supervision of Dr. Ann Muckle.

### Cell cultures

The human embryonic intestinal epithelial cell line Intestine 407 (Int-407; ATCC CCL-6; American Type Culture Collection, Rockville, MD) (also known as Henle 407) was used in this study. Cells were routinely grown and maintained in minimal essential medium (MEM; Gibco BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg,

MD) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL), 2 mM L-glutamin (Gibco BRL), 1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL), 100 U of penicillin (Gibco BRL) per mL and 100 µg of streptomycin (Gibco BRL) per mL. Working stocks were passaged every 3 to 4 days for up to 15 passages. For invasion and adhesion assays,  $10^5$  cells/1.5 mL/dish were seeded and allowed to grow to confluency (approximately  $5.5 \times 10^5$  cells/dish) in 24-well plates.

### **Growth and preparation of bacteria for invasion and adhesion assays**

LB agar plates were first inoculated with bacteria from frozen glycerol stocks and incubated for 18 h at 37°C. Late logarithmic-phase cultures of bacteria (optical density at 600 nm (O.D.<sub>600</sub>) of 0.660 were prepared by inoculating LB with single colonies and incubating them (200 rpm, with shaking) for 20 h at 37°C. An optical density at 600 nm of  $0.290 \pm 0,1$  ( $5.5 \times 10^8$  CFU/mL) was obtained by diluting a sample of the late logarithmic-phase cultures with fresh LB broth. From this suspension, dilutions of 1:100 into cool MEM (4°C) were prepared, resulting in a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell in 1 mL of inoculum.

### **Invasion assay**

Confluent monolayers of Int-407 cells were rinsed once with 1 mL of prewarmed Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Gibco BRL). The bacterial inoculum (1 mL per well in MEM) was added, and infected cells were incubated at 37°C for 1 h in an atmosphere of 95% air - 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed three times with 1.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS, pH7.3) (Oxoid; Unipath, Nepean, ON) to remove the nonadherent bacteria and subsequently incubated for an additional 2 h with fresh MEM containing 150 µg of colistin per mL. Colistin was used rather than the commonly used gentamicin since some isolates belonging to serovar Typhimurium are resistant to that antibiotic. Kuster et al. (1993) validated the use of colistin for killing extracellular bacteria. Subsequently, cells were overlaid with PBS containing 0.1% (w/v) sodium deoxycholate (0.5 mL per dish) and incubated for 5

min at room temperature to release bacteria from cells. Bacteria were resuspended in this solution, diluted, and plated on LB agar to determine number of CFU.

### **Adhesion Assay**

Confluent monolayers of Int-407 cells were washed and the bacterial inoculum (1 mL per dish) was added to cells as described above for the invasion assay. Infected cells were incubated at 37°C for 30 min in an atmosphere of 95% air - 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed three times with 1.5 mL of PBS and subsequently, they were overlaid with 0.1% sodium deoxycholate in PBS (0.5 mL per dish) and incubated for 5 min at room temperature. The cell lysate was then diluted and plated on LB agar to determine viable bacterial counts. Invasion and adhesion rates were calculated as follow: percent invasion or adhesion = 100 x (number of bacteria recovered/total number of bacteria added). Calculation of these values was based on the average of at least three experiments.

### **Growth conditions for SDS-PAGE and western blotting**

Aerobic growth conditions for bacterial cultures were provided by vigorous agitation (200 rpm) of tubes. Anaerobic conditions were provided by static incubation in an anaerobe jar equipped with a pressure gauge (Oxoid) and supplied with a gas generator envelope and a resazurin strip (Oxoid), the gauge and strip serving to confirm establishment of an anaerobic environment. Effect of high osmolarity (0.3 M NaCl) (Leclerc et al., 1998) was examined with use of LB or nutrient broth (NB; Difco Laboratories) supplemented with NaCl. Iron effect was tested by supplementing NB with 40 μM FeSO<sub>4</sub> and depleting iron with 100 μM 2,2'-dipyridyl (Sigma) (Badger and Kim, 1998). To analyze pH effect, strains were grown in NB buffered with 0.1 M MES (2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid) (Sigma) at pH 5.0 or 6.5 (Leclerc et al., 1998).

## **SDS-PAGE**

LB agar plates were first inoculated with bacteria from frozen glycerol stocks and incubated at 37°C overnight. Fifty mL of one of the medium described above was inoculated with single colonies and incubated for 20 h at 37°C. Optical density of 0,600 at 600 nm were obtained. Bacterial suspensions were centrifuged (10 min at 2000 x g), resuspended in 1.5 mL of PBS and sonicated twice, for 2 min each time, on ice (Sonics Material Inc., Danbury, Connecticut, USA). Suspension was centrifuged again (12 000 x g) for 20 min at 4°C. Proteins present in the supernatant were harvested, mixed with an equal volume of solubilization buffer and boiled 5 min and subjected to SDS-PAGE in 12.5% polyacrylamide vertical slab gel with 4.5% stacking gel (Laemmli, 1970). Gels were stained with Coomassie brilliant blue strain (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA).

## **Production of antisera**

Pigs were injected intramuscularly once a week for six weeks with 1 mL of a formalin-killed (0.5% v/v, 18 h) suspension of 10<sup>9</sup> CFU/mL of a field isolate serovar Typhimurium (obtained from a septicemic pig) grown overnight in NB. Pigs were euthanized one week later and their blood collected. All procedures using animals were done in accordance with guidelines of the Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care.

## **Western blotting**

Following SDS-PAGE, material was transferred to the nitrocellulose membrane (Bio-Rad) by electroblotting in a transblot apparatus (Bio-Rad) with methanol-Tris-glycine buffer (Towbin et al., 1979) for 1 h at 100 volts. Casein (2%, w/v) in Tris-buffered saline was used to block unreacted sites and the nitrocellulose membrane was incubated overnight with 1:400 (v/v) dilutions of the pig antisera raised against whole cell antigen (see above). After washing in Tris-NaCl, the



membrane was incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-swine IgG (heavy + light chains) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 60 min at a dilution of 1:2000 in 2% casein in Tris-NaCl. After repeated washings, presence of bound antigens was visualized by reacting the nitrocellulose membrane with 0.06% 4-chloro-1-naphthol (Sigma) in cold (-20°C) methanol mixed to 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-NaCl. Apparent molecular weights were calculated by comparison with standards of known molecular weight (Bio-Rad).

### **Diffusion chambers and *in vivo* growth conditions**

Nine strains of serovar Typhimurium were grown in diffusion chambers implanted in the peritoneal cavity of pigs for 24 h as described by Malouin et al. (1990). Diffusion chambers (15x10 mm) were constructed from 3-mL polypropylene syringe barrels. Millipore MF 0.22 µm pore size filters (Millipore Products Division, Bedford, MA) were cut to the diameter of the syringe barrels and attached by melting the chambers to affix the filter. Chambers were autoclaved. Cultures of bacteria (O.D.<sub>600</sub> of 0.600) in LB broth were injected through a needle hole melted through the side of the barrels. The hole was subsequently closed using a hot glass rod. Chamber volume was approximately 500 µL. Pigs were anaesthetized with Thiopental injected intravenously. Twenty chambers were placed in the peritoneal cavity through a small longitudinal incision on the abdomen. Animals were euthanized using T-61 given intravenously before chambers were removed. Pigs had free access to food and water. Bacterial cells were removed from the chambers, collected by centrifugation, washed twice with PBS and used for SDS-PAGE and immunoblots as previously described.

## Results

### **Serotyping and phagetyping of isolates associated with septicemia**

A total of 23 isolates of *S. Typhimurium*, the only serovar identified in this study, were recovered from septicemic pigs. When isolates were phagetyped, it was found that 52% (12/23) belonged to DT104 while the others belonged to nine different phage types. Only four isolates could not be phagetyped. For the 30 isolates from clinically healthy carrier pigs, proportion belonging to DT104 was similar (15/30) (Table I).

### **Ability to invade Int-407 cells**

When *S. Typhimurium* isolates from septicemic animals were compared to isolates from non septicemic pigs, significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed between the two groups of isolates. Septicemic isolates (mean of  $32.0\% \pm 18.3$ ) invaded at higher rates than isolates from clinically healthy pigs (mean of  $20.6\% \pm 9.4$ ) (Table I). Furthermore, invasion rates appeared to be independent from the phage type.

### **Ability to adhere Int-407 cells**

It was not possible to detect any significant difference between both groups of isolates in their ability to adhere to Int-407 cells (Table I).

### **Protein profiles by SDS-PAGE and western blotting**

In order to reflect various environmental conditions encountered by *Salmonella* during colonization and invasion of the host, different growth conditions were evaluated to study protein profiles of the two groups of isolates. For a given environmental growth conditions, protein profiles of isolates associated with

septicemia and those isolated from clinically healthy pigs were similar (data not shown). It was impossible to associate any protein to septicemic isolates. However, several different patterns were expressed when a given isolate was grown in different environmental conditions (Fig. 1). For example, when grown in iron restricted media, expression of a 33 kDa protein was observed on Western blots for all isolates in both groups of pigs.

Since significant differences ( $P < 0.05$ ) in invasiveness were noted between the two groups of *S. Typhimurium* isolates, it was important to recreate growth conditions encountered during *Salmonella* process of invasion. Conditions known to better reflect *Salmonella* invasion include anaerobiosis (Ernst et al., 1990; Lee and Falkow, 1990; Jones and Falkow, 1994; Schiemann and Shope, 1991), high osmolarity (Galan and Curtiss III, 1990), late-log-phase growth (Ernst et al., 1990; Lee and Falkow, 1990) and neutral pH (Bajaj et al., 1996). We selected six isolates with the highest invasiveness capability and eight isolates with the lowest invasiveness. They were grown in LB with 0.3 M NaCl and neutral pH to late-log-phase growth in anaerobic conditions. Under these growth conditions, no protein was found to be associated to isolates with the highest invasiveness capability by SDS-PAGE and Western blots (data not shown).

Finally, we examined protein profiles of five septicemic isolates and four isolates from clinically healthy pigs after growth in diffusion chambers implanted in the peritoneal cavity of pigs for 24 h. Compared to the profile of the same isolates grown *in vitro* (LB broth, 37°C, O.D.<sub>600</sub> of 0.600, 200 rpm), differences in protein profiles were observed (Fig. 2). For example, isolates grown *in vivo* weakly expressed a 54 kDa protein compared to the same isolates grown *in vitro*. Furthermore, a 43 kDa protein was present only in cells grown *in vivo*. No protein associated with septicemic isolates was identified, but many proteins, strongly recognized by swine antisera, were found in both type of isolates. In particular, a 37 kDa protein was found to be present in all septicemic isolates as well as in most isolates from clinically healthy animals (Fig. 2).

## Discussion

In this study, different procedures were used in order to discriminate *S. Typhimurium* isolates recovered from septicemic and from clinically healthy pigs. The use of cell cultures as a model for *Salmonella* invasion was first proposed in 1973 by Giannella et al., who reported that only strains which were capable of invading rabbit mucosae were able to invade HeLa cells. Many parameters can influence results and interpretation of this type of assay. For example, most studies on serovar Typhimurium adhesion and invasion expressed the adhesion and invasion rates as a fraction of the total number of bacteria added often without reference to the MOI (Ernst et al., 1990; Lee and Falkow, 1990; Weinstein et al., 1998). Kusters et al. (1993) and Huang et al. (1998) showed that the MOI has a clear effect on the fraction of the inoculum adhering to (or invading) the cell. Other authors used a low-speed centrifugation step to promote the invasion (Ernst et al., 1990; Weinstein et al., 1998; Iyoda et al., 2001).

In this study, we used the same control (serovar Typhimurium SL1344) as Galan and Curtiss III (1989) and Nickerson and Curtiss III (1997) with similar parameters (MOI, cell line, growth conditions) and found significant differences in invasion rates among septicemic and non septicemic strains but not in adhesion rates. However, a significant number of strains isolated from clinically healthy animals possessed high invasiveness rates, suggesting that healthy animals may carry potentially pathogenic strains. This situation may explain why it was difficult to associate a particular protein to septicemic isolates in this study. Since pigs may carry *Salmonella* for prolonged period after onset of diarrhea, it is likely that some septicemic isolates could have been detected in a significant number of clinically healthy animals.

More than 50% of isolates from septicemic animals belonged to phage type 104. The severity of clinical illness in *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 outbreaks in human has led to the suggestion that some strains possess enhanced

virulence (Poppe et al., 1998; Allen et al., 2001). In our study, using invasion assays, we did not observe any increase in invasiveness for DT104 isolates. This is in accordance with the study of Allen et al. (2001) who failed to demonstrate that *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 isolates are more virulent than *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028s using *in vitro* and *in vivo* experiments.

Bacteria obtained from patients or infected animals are routinely examined for the presence of putative virulence determinants by SDS-PAGE and immunoblotting (Smith, 1998). Differences in protein profiles were observed when strains were grown in different environmental growth conditions but it was not possible to associate one particular protein to septicemic strains. In this study, we observed the production of a 33 kDa protein when isolates were grown under iron-limiting conditions. Expression of protein of a similar molecular weight, named SitA, under iron-limiting conditions was also reported by Zhou et al. (1999). These authors identified an iron transport system, encoded within the centisome 63 pathogenicity island of *Salmonella* serovar Typhimurium. As observed in this study, the induction of *sit* gene expression was prevented by the addition of Fe<sup>2+</sup> to the growth medium. Furthermore, Janakiraman and Slauch (2000) demonstrated that the putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Even when isolates were grown in diffusion chambers implanted in the peritoneal cavity of pigs, it was not possible to detect any protein related to septicemic isolates. On the other hand, a 43 kDa protein was observed only when isolates were grown *in vivo*, whereas a 54 kDa protein was at the opposite mostly expressed under *in vitro* growth conditions. Further characterization of these proteins will be necessary to clarify the significance of this finding.

Although no protein was associated with septicemic isolates, many proteins that were strongly recognized by swine antisera were found in both type of isolates. In particular, a 37 kDa protein was found to be present in all septicemic isolates and

in most of isolates from clinically healthy animals and should be considered for vaccine production.

It would be interesting in the future to use methods such as signature-tagged mutagenesis (STM) (Hensel et al., 1995; Collins, 1996) or *in vivo* expression technology (IVET) (Mahan et al., 1993; Heithoff et al., 1997) for a better identification and characterization of *in vivo* expressed *Salmonella* virulence genes.

## **Acknowledgments**

We would like to thank Dr. F. Daigle, Dr. R. Higgins, Dr. J. M. Fairbrother, Dr. N. Rheault and Dr. A. Letellier for contributing strains.

## References

- Allen, C.A., Fedorka-Cray, P.J., Vazquez-Torres, A., Suyemoto, M., Altier, C., Ryder, L.R., Fang, F.C., Libby, S.J., 2001. *In vitro* and *in vivo* assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 virulence. *Infect. Immun.*, 69:4673-4677.
- Badger, J.L., Kim, K.S., 1998. Environmental growth conditions influence the ability of *Escherichia coli* K1 to invade brain microvascular endothelial cells and confer serum resistance. *Infect. Immun.*, 66:5692-5697.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., Lee, C.A., 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.*, 22:703-714.
- Berends, B.R., van Knapen, F., Snijers, 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.
- Collins, D.M., 1996. In search of tuberculosis virulence genes. *Trends Microbiol.*, 4:426-430.
- Darwin, K.H., Miller, V.L., 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:405-428.
- Desrosiers, R., 1999. Les maladies en émergence chez le porc. *Méd. Vét. Québec*, 29:185-188.



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.

Fairbrother, J.M., Broes, A., Jacques, M., Larivière, S., 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K”V165” strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, 50:1029-1036.

Galan, J.E., Curtiss III, R., 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 III, R., 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.*, 58:1879-1885.

Giannella, R.A., Washington, O., Gemski, P., Formal, S.B., 1973. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.*, 128:69-75.

Heithoff, D.M., Conner, C.P., Mahan, M.J., 1997. Dissecting the biology of a pathogen during infection. *Trends Microbiol.*, 5:509-513.

Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W., 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269:400-403.

Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature (London)*, 291:238-239.

Huang, X.Z., Tall, B., Schwan, W.R., Kopecko, D.J., 1998. Physical limitations on *Salmonella typhi* entry into cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66:2928-2937.

Iyoda, S., Tomokazu, K., Hirose, K., Kutsukake, K., Watanabe, H., 2001. A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.*, 30:81-90.

Janakiraman, A., Slauch, J.M., 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.*, 35:1146-1155.

Jones, B.D., Falkow, S., 1994. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.*, 62:3745-3752.

Kusters, J.G., Mulders-Kremers, G.A.W.M., van Doornik, C.E.M., van der Zeijst, B.A.M., 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 61:5013-5020.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Leclerc, G.J., Tartera, C., Metcalf, E.S., 1998. Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect. Immun.* 66:682-691.

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)*, 87:4304-4308.

Letellier, A., Messier, S., Paré, J., Ménard, J., Quessy, S., 1999a. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Quebec. *Vet. Microbiol.* 1999 67:299-306.

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

Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 259:686-688.

Malouin, F., Campbell, G.D., Halpenny, M., Becker, G.W., Parr, T.R., 1990. Outer membrane and porin characteristics of *Serratia marcescens* grown in vitro and in rat intraperitoneal diffusion chambers. *Infect. Immun.*, 58:1247-1253.

Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doizé, B., Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J.M., 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K<sup>-</sup>V165<sup>-</sup> mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.*, 61:836-843.

Nickerson, C.A., Curtiss III, R., 1997. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.*, 65:1814-1823.

Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., Prescott, J., 1998. *Salmonella typhimurium* DT104: A virulent and drug-resistant pathogen. *Can. Vet. J.*, 39:559-565.

Rheault, N., Quessy, S., 2001. Prevalence and resistance patterns of *Salmonella* spp. serotypes from humans and animals production. In Proceedings of the 4th International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and Other Food-borne Pathogens in Pork. Germany., pp. 403-405.

Schiemann, D.A., Shope, S.R., 1991. Anaerobic growth of *Salmonella typhimurium* results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect. Immun.*, 59:437-440.

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

Smith, H., 1998. What happens to bacterial pathogens *in vivo*? *Trends Microbiol.*, 6:239-243.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79:4350-4354.

Weinstein, D.L., O'Neill, B.L., Hone, D.M., Metcalf, E.S., 1998. Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66:2310-2318.

Zhou, D., Hardt, W.-D., Galan, J.E., 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect. Immun.*, 67:1974-1981.

Table I. Adherence to and invasion of Int-407 cells by *Salmonella* serovar Typhimurium isolates recovered from swine

Isolate	Clinical signs	Phagetype	Mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3) <sup>a</sup>	
			% Adhesion <sup>b</sup>	% Invasion <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> 862B	ND	ND	0.91 $\pm$ 0.54	0.0040 $\pm$ 0.0033
SL1344	ND	ND	4.64 $\pm$ 0.72	57.17 $\pm$ 4.11
CS-01	+	DT27	10.17 $\pm$ 1.63	53.34 $\pm$ 15.68
CS-02	+	DT27	6.38 $\pm$ 0.88	46.33 $\pm$ 2.48
CS-03	+	DT104	6.44 $\pm$ 2.19	21.18 $\pm$ 5.87
CS-04	+	DT186	7.03 $\pm$ 0.70	38.81 $\pm$ 0.78
CS-05	+	Untypable	14.94 $\pm$ 1.87	58.34 $\pm$ 7.32
CS-06	+	Untypable	16.08 $\pm$ 2.83	43.14 $\pm$ 3.42
CS-07	+	DT27	17.14 $\pm$ 2.86	45.40 $\pm$ 1.17
CS-08	+	DT104a	11.60 $\pm$ 6.01	15.98 $\pm$ 6.37
CS-09	+	DT104	3.46 $\pm$ 0.63	13.13 $\pm$ 1.80
CS-10	+	DT104	7.02 $\pm$ 1.19	26.79 $\pm$ 3.39
CS-11	+	DT104	18.37 $\pm$ 11.82	54.59 $\pm$ 28.30
CS-12	+	Untypable	15.07 $\pm$ 6.99	11.20 $\pm$ 1.39
CS-13	+	DT104a	18.56 $\pm$ 5.63	45.98 $\pm$ 4.38
CS-14	+	DT721	18.57 $\pm$ 5.00	27.35 $\pm$ 2.35
CS-15	+	U302	28.45 $\pm$ 15.39	18.06 $\pm$ 1.64
CS-16	+	DT104	21.74 $\pm$ 11.51	9.77 $\pm$ 3.35
CS-17	+	U302	9.36 $\pm$ 1.86	18.81 $\pm$ 1.43
CS-18	+	DT194	6.24 $\pm$ 3.40	11.34 $\pm$ 1.77
CS-19	+	DT104	24.30 $\pm$ 4.20	61.93 $\pm$ 14.40
CS-20	+	DT192	11.64 $\pm$ 4.40	27.11 $\pm$ 1.36
CS-21	+	DT104	25.74 $\pm$ 10.90	60.55 $\pm$ 16.43
CS-22	+	DT104a	8.79 $\pm$ 3.23	13.52 $\pm$ 2.86
CS-23	+	DT104	11.74 $\pm$ 5.49	13.62 $\pm$ 3.06
HP-01	-	DT104	17.00 $\pm$ 2.02	28.42 $\pm$ 3.18
HP-02	-	DT104	10.92 $\pm$ 3.31	23.60 $\pm$ 5.44
HP-03	-	DT193	7.60 $\pm$ 1.14	12.75 $\pm$ 0.71
HP-04	-	U302	13.09 $\pm$ 1.66	16.08 $\pm$ 2.55
HP-05	-	DT186	13.12 $\pm$ 7.43	47.46 $\pm$ 9.14
HP-06	-	DT193	21.88 $\pm$ 0.95	43.69 $\pm$ 7.11
HP-07	-	DT104	27.40 $\pm$ 1.97	23.22 $\pm$ 2.92
HP-08	-	DT104	23.55 $\pm$ 12.99	22.85 $\pm$ 7.96
HP-09	-	DT104	16.06 $\pm$ 5.25	19.31 $\pm$ 8.14
HP-10	-	DT104	13.03 $\pm$ 2.01	5.24 $\pm$ 1.52
HP-11	-	DT104	24.02 $\pm$ 6.95	17.50 $\pm$ 12.63
HP-12	-	DT104	8.84 $\pm$ 1.90	13.53 $\pm$ 1.16
HP-13	-	DT104	10.64 $\pm$ 2.31	17.56 $\pm$ 2.00

HP-14	-	DT29	9.93 ± 1.18	18.44 ± 1.94
HP-15	-	DT108	13.25 ± 4.93	29.33 ± 6.54
HP-16	-	DT193	21.16 ± 9.14	25.10 ± 5.98
HP-17	-	Untypable	25.94 ± 15.04	12.74 ± 1.92
HP-18	-	DT104	27.02 ± 9.92	12.20 ± 1.72
HP-19	-	DT104	26.98 ± 13.47	10.71 ± 0.83
HP-20	-	DT104	25.55 ± 10.98	7.65 ± 1.79
HP-21	-	DT104b	12.71 ± 3.69	18.40 ± 3.37
HP-22	-	DT193	16.52 ± 6.79	19.81 ± 6.44
HP-23	-	DT108	11.65 ± 6.62	15.31 ± 1.10
HP-24	-	DT104	17.75 ± 5.87	22.83 ± 1.33
HP-25	-	DT193	10.56 ± 4.45	19.75 ± 0.47
HP-26	-	DT193	13.94 ± 4.29	23.86 ± 2.08
HP-27	-	DT193	9.77 ± 5.14	28.11 ± 2.74
HP-28	-	DT104	8.23 ± 1.84	11.21 ± 0.76
HP-29	-	U302	10.74 ± 4.54	31.48 ± 5.78
HP-30	-	DT193	8.56 ± 3.11	18.62 ± 2.26

<sup>a</sup> Data represent averages of at least three trials. Standard errors (SD) are given.

<sup>b</sup> Percentage of inoculum adherent to cells after incubation for 30 min.

<sup>c</sup> Percentage of inoculum recovered after incubation for 2 h in colistine (150 µg/mL).

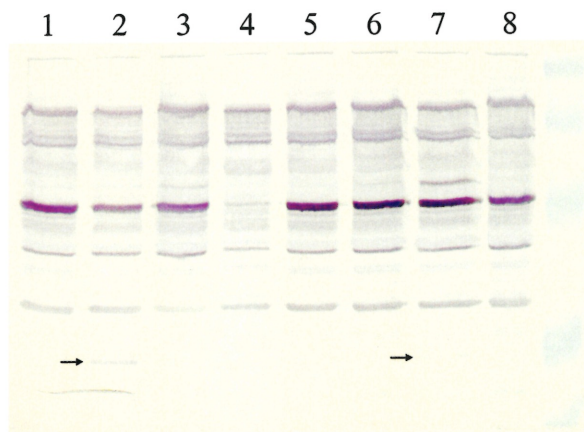


Fig. 1. Comparison of Western blots profiles of antigens from serovar Typhimurium strain HP-01 grown in NB at pH 6.5 supplemented with 0.3 M NaCl (lane 1), or in NB at pH 6.5 supplemented with 0.3 M NaCl and 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl (lane 2), or in NB at pH 6.5 (lane 3), or in NB at pH 5.0 (lane 4), or in NB supplemented with 0.3 M NaCl (lane 5), or in NB supplemented with 40  $\mu$ M FeSo<sub>4</sub> (lane 6), or in NB supplemented with 100  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl (lane 7), or in NB without additive (lane 8). Arrows denote the presence of the 33 kDa protein. Molecular weight markers: 116, 80, 51.8, 34.7 and 30 kDa.

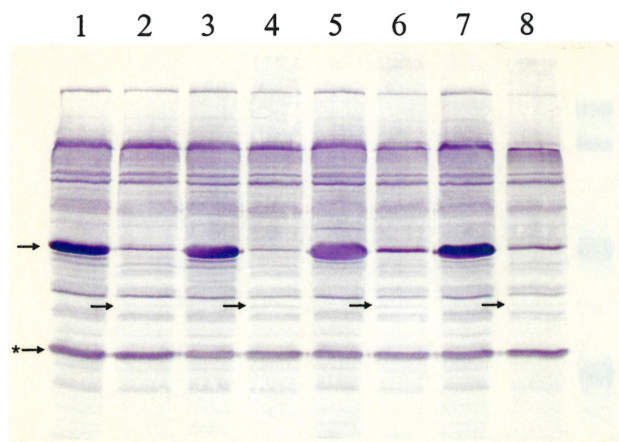


Fig. 2. Comparison of Western blots profiles of antigens from serovar Typhimurium strains HP-04 (lanes 1 and 2), HP-05 (lanes 3 and 4), CS-19 (lanes 5 and 6) and CS-21 (lanes 7 and 8) grown in LB broth with vigorous shaking until reaching late-log-phase growth (O.D.<sub>600</sub> of 0.600) (lanes 1, 3, 5 and 7) or after a 24 h growth period in diffusion chambers in pigs (lanes 2, 4, 6 and 8). Arrows denote the presence of some proteins induced by *in vitro* growth and others induced by *in vivo* growth. Arrow with asterisk denote the presence of the 37 kDa protein. Molecular weight markers: 116, 80, 51.8, 34.7 and 30 kDa.



**Chapitre 4.**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**

Afin de bien comprendre les différentes étapes de ce projet, rappelons tout d'abord la problématique, l'hypothèse et l'objectif général. Une augmentation des cas de salmonellose chez le porc avec des signes cliniques allant d'une diarrhée abondante à une septicémie avec mortalité subite a été observée au Canada ces dernières années. La caractérisation des souches qui y sont associées est donc nécessaire à la compréhension de la pathophysiologie et de l'épidémiologie de ces infections et à la mise au point d'un vaccin ou d'un test de dépistage pour faciliter le diagnostic. Notre hypothèse est que des souches de *S. Typhimurium* possèdent un ou des facteurs de virulence particuliers leur permettant de provoquer des septicémies et des signes cliniques sévères chez cet animal. L'objectif de notre étude était donc de caractériser phénotypiquement les souches de *S. enterica* sérovar Typhimurium causant des signes cliniques chez le porc afin de pouvoir identifier des protéines immunogènes associées à la virulence.

#### **4.1 Construction d'une banque de souches**

Dans un premier temps, afin de caractériser les souches de *Salmonella* associées à des signes cliniques de septicémies chez le porc, il était primordial d'obtenir un nombre suffisant de souches appartenant à ce groupe. C'est donc en collaboration avec le Laboratoire de bactériologie de la Faculté de médecine vétérinaire, dirigé alors par le Dr. R. Higgins, que ces souches ont pu être obtenues. Des rapports de bactériologie nous permettaient de connaître l'histoire des souches, c'est-à-dire les résultats obtenus suite à la nécropsie. Il était alors possible de savoir si les souches avaient été isolées en culture pure, quels organes avaient été infectés et de prendre connaissance de l'anamnèse du vétérinaire qui avait visité la ferme où les épisodes de septicémies avaient été observés. Un exemple typique d'une souche causant des signes cliniques chez le porc est le suivant: c'est une souche qui a été isolée du poumon (+++), de la rate (+++), du foie (++) et du cœur (+). Les renseignements cliniques fournis par le vétérinaire révèlent qu'il y a eu six mortalités subites.

Le sérotypage de ces souches a révélé qu'il s'agissait du sérovar Typhimurium dans tous les cas et le lysotypage a démontré qu'il y avait une grande proportion de DT104.

Dans le cas des souches de *S. Typhimurium* isolées chez des porcs sains, ils provenaient principalement d'études précédentes effectuées dans notre laboratoire. Ces projets consistaient entre autre à évaluer la prévalence de *Salmonella* et autres pathogènes chez les carcasses de porcs à l'abattoir (Letellier *et al.*, 1999; Rheault et Quessy, 1999).

Au total, notre banque comptait 23 souches isolées chez des porcs atteints de septicémie et 30 souches isolées chez des porcs sains. Environ la moitié de nos souches (52% pour les souches qui ont été isolées chez des porcs atteints de septicémie et 50% pour les souches qui ont été isolées chez des porcs sains) appartenait au lysotype 104. En comparant avec les résultats publiés par Poppe *et al.* (1998), on note que la proportion de DT104 est similaire avec 40,3% de 283 souches de *S. Typhimurium* isolées chez le porc. Ce type phagique (TP) ou type définitif (DT) est un pathogène considéré virulent par certains pour l'homme et les animaux, particulièrement les bovins. Il est isolé avec une plus forte fréquence chez les humains et chez les animaux au Royaume-Uni et dans plusieurs autres pays européens et plus récemment, aux États-Unis et au Canada. Les souches de *Salmonella Typhimurium DT104* résistent fréquemment à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et à la tétracycline (Poppe *et al.*, 1998).

#### **4.2 Comparaison de l'habileté des deux types de souches à adhérer et à envahir les cellules de l'hôte**

En utilisant une lignée cellulaire de cellules épithéliales intestinales, nous avons démontré que les souches isolées chez des porcs septicémiques envahissaient davantage que les souches qui ont été isolées chez des porcs sains. Cependant,

l'efficacité de ces deux groupes de souches à adhérer aux cellules épithéliales est similaire. De plus, nos résultats suggèrent que l'efficacité à envahir les cellules épithéliales était indépendante du type phagique. La souche qui possédait le plus haut taux d'invasion parmi les souches isolées chez des porcs septicémiques (la souche CS-19 avec 61,93%) ainsi que la souche qui possédait le plus bas pourcentage (la souche CS-16 avec 9,77%) appartenaient tous deux au lysotype 104. Plusieurs auteurs ont tenté de démontrer la plus grande virulence des souches DT104 en utilisant des tests *in vivo* et *in vitro*, mais tous ont échoué (Allen *et al.*, 2001; Carlson *et al.*, 2000). Dans ces deux études, les auteurs ont comparé l'habileté de souches DT104 à envahir les cellules épithéliales à des contrôles (souche *S. Typhimurium* ATCC 14028s et la souche SL1344 respectivement). Nos résultats sont donc en accord avec ces études; les isolats DT104 n'envahissent pas nécessairement davantage les cellules intestinales que les autres types phagiques.

Habituellement, la gentamicine est utilisée dans les essais d'invasion pour éliminer les bactéries extracellulaires. Cependant, comme une importante proportion de nos souches était résistante à cet antibiotique, il nous fallait trouver un autre agent antimicrobien pouvant être utilisé pour ces tests. Tous les antibiotiques ne peuvent pas être utilisés dans ces essais. Par exemple les  $\beta$ -lactames ne peuvent pas être utilisés puisqu'ils pénètrent les cellules épithéliales (Tang *et al.*, 1993). Dans une étude, Kusters *et al.* (1993) ont validé l'utilisation de la colistine (polymyxine E) comme agent antimicrobien dans les essais d'invasion. Nos paramètres (lignée cellulaire, multiplicité de l'infection utilisée, conditions de croissance des salmonelles) étant similaires à ceux utilisés par ces auteurs, nous avons donc utilisé la colistine puisque toutes nos souches y étaient sensibles à une concentration de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Il était difficile de comparer nos résultats d'invasion et d'adhésion avec ceux publiés dans la littérature puisque de nombreux paramètres peuvent modifier significativement les résultats et leurs interprétations. Par exemple, la plupart des études portant sur l'invasion et l'adhésion qui utilisent des souches de *S.*

Typhimurium (Ernst *et al.*, 1990; Lee and Falkow, 1990; Weinstein *et al.*, 1998) expriment leurs taux d'invasion et d'adhésion sans faire référence à la MOI utilisée. Plusieurs auteurs (Kusters *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1998) ont démontré que la MOI avait un effet significatif sur la fraction de l'inoculum qui adhérait ou qui envahissait les cellules. D'autres auteurs (Ernst *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1998; Iyoda *et al.*, 2001) ajoutent une étape de centrifugation à faible vitesse afin d'augmenter le contact entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Il fallait donc vérifier en détail la méthodologie employée afin de comparer nos résultats avec des études publiées antérieurement. Néanmoins, nous avons comparé les résultats d'invasion de notre témoin positif (la souche *S. Typhimurium* SL1344) avec ceux parus dans deux études (Galan et Curtiss III, 1989; Nickerson et Curtiss III, 1997) où les paramètres étaient similaires (MOI, lignée cellulaire, condition de croissance des bactéries) et nous n'avons pas trouvé de différence significative.

De plus, il était difficile de séparer en deux groupes de façon formelle notre banque de souches puisqu'il faut toujours garder à l'esprit que certains isolats qui ont été isolés chez des porcs sains peuvent néanmoins causer potentiellement des septicémies chez le porc. Ceci expliquerait le fait que certaines souches isolées chez des porcs sains possèdent des pourcentages d'invasion relativement élevés.

### **4.3 Comparaison des profils protéiques**

*S. enterica* sérovar Typhimurium rencontre plusieurs conditions environnementales lors des différentes étapes de l'infection. Après l'ingestion d'aliments contaminés, cette bactérie passe par le milieu acide de l'estomac, par l'environnement à pH neutre, microaérophile et pauvre en bactérie du petit intestin et parfois même jusqu'au gros intestin où le milieu est riche en bactéries et anaérobique. D'autres facteurs incluant la concentration d'osmolytes, d'ions, de sucres et d'acides aminés varient à travers le tractus gastro-intestinal (Rakeman et Miller, 1999). De plus, certains facteurs de virulence peuvent être exprimés seulement lorsque *S. Typhimurium* croît dans des conditions de croissance précises. Nous avons donc

tenté de mimer certaines conditions rencontrées *in vivo* à l'aide de milieu de culture en vérifiant l'effet du fer, du pH, de l'osmolarité ainsi que la disponibilité de l'oxygène sur les profils protéiques obtenus par des gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) ainsi que par la technique d'immunobuvardage (Western blot) en utilisant un antisérum polyclonal produit chez le porc et dirigé contre une souche de *S. Typhimurium* isolée chez un porc septicémique. Tel que mentionné précédemment, les profils protéiques (pour une condition de croissance donnée) des souches dans les deux groupes sont similaires. Cependant, une protéine de 33 kDa était présente lorsque le fer était chélaté du milieu autant chez les souches isolées chez des porcs atteints de septicémie que chez les porcs sains. Cette protéine possède plusieurs caractéristiques similaires avec la protéine SitA qui est une composante d'un transporteur de fer putatif. Le locus *sit* code pour un système d'ABC transporteur de fer possédant une homologie considérable avec l'ABC transporteur de fer de *Yersinia pestis*. Cet opéron, situé sur le SPI-1 de *Salmonella Typhimurium*, a été identifié par Zhou *et al.* (1999) et possède quatre gènes. Le gène *sitA* code pour une protéine putative liant le fer, le gène *sitB* code pour une protéine liant l'ATP et les gènes *sitC* et *sitD* codent pour deux perméases putatives. Les caractéristiques communes entre la protéine de 33 kDa présente en conditions limitantes en fer et la protéine SitA sont les suivantes: 1) la protéine SitA possède un poids moléculaire de 33 722 Da, 2) l'expression de l'opéron *sit* est augmentée 18 fois en conditions limitantes en fer et 3) cette induction est réprimée lorsqu'il y a ajout de  $Fe^{2+}$  au milieu de croissance. De plus, Janakiraman et Schlauch (2000) ont démontré que ce transporteur de fer putatif est requis pour la virulence de *S. Typhimurium*.

Puisque des différences significatives ( $P < 0,05$ ) dans l'invasion ont été notées entre les deux groupes, des conditions de croissance permettant l'expression maximale des gènes d'invasion a été utilisée. Ces conditions incluent l'anaérobiose (Ernst *et al.*, 1990; Lee et Falkow, 1990; Jones et Falkow, 1994; Schiemann et Shope, 1991), une haute osmolarité (Galan et Curtiss III, 1990), la fin de la phase exponentielle de croissance (Ernst *et al.*, 1990; Lee et Falkow, 1990) et un pH neutre (Bajaj *et al.*, 1996). En comparant les profils protéiques des souches les plus

invasives par rapport aux souches les moins invasives (les deux groupes de souches confondus), aucune protéine n'a pu être reliée aux souches les plus invasives.

Nous avons utilisé une technique utilisant des chambres de diffusion dans le but de réaliser un passage *in vivo* de nos souches et d'obtenir les conditions environnementales rencontrées au niveau de la cavité abdominale de porcs. Les gels de polyacrylamide n'ont pas permis de mettre en évidence de protéines associées aux souches qui causent des septicémies chez le porc. Toutefois, l'expression d'une protéine de 43 kDa est induite seulement après passage *in vivo* en comparaison avec les mêmes souches cultivées *in vitro*. De plus, l'expression d'une protéine de 54 kDa est augmentée *in vitro* comparativement à la croissance *in vivo*. Les protéines de 43 et de 54 kDa sont exprimées autant chez les souches septicémiques que chez les souches provenant de porcs sains. Cependant, une caractérisation plus poussée permettra d'en connaître davantage sur ces protéines et de clarifier la signification de ce phénomène.

Finalement, même s'il n'a pas été possible d'associer une protéine particulière aux souches septicémiques, il a été possible d'identifier des protéines immunogènes communes à toutes les souches septicémiques et à la plupart des souches provenant de porcs sains. En particulier, une protéine d'environ 37 kDa s'est révélée très immunogène et pourrait être considérée pour la production d'un vaccin sous-unitaire. Le fait de retrouver cette protéine chez les souches septicémiques et les souches provenant de porcs sains ne représente pas un désavantage en soi, car il devient possible d'envisager son utilisation pour prévenir à la fois les formes sous-cliniques (porteurs sains) et cliniques de la maladie.

**Chapitre 5.**  
**CONCLUSIONS**



Cette étude a permis d'accroître les connaissances en ce qui concerne les caractéristiques phénotypiques des souches de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium associées à des septicémies chez le porc. Plus précisément, les conclusions suivantes ont été tirées de cette étude:

1. Les souches de *S. Typhimurium* associées à des septicémies chez le porc n'ont pu être associées à un type phagique particulier dans cette étude.
2. Les souches isolées de porcs septicémiques envahissent davantage que les souches isolées chez des porcs sains.
3. Aucune différence n'a été notée tant qu'à l'habileté de ces deux groupes de souches à adhérer aux cellules de l'hôte.
4. Les profils protéiques obtenus par SDS-PAGE et par immunobuvardage des souches associées à des septicémies chez le porc sont similaires aux profils des souches isolées chez des porcs sains, et ce, dans différentes conditions de culture.

Des études complémentaires, comme une caractérisation génotypique de notre banque de souches, seront nécessaires afin de vérifier la présence de facteurs de virulence particuliers aux souches associées à des septicémies chez le porc.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Abshire, K.Z., Neidhardt, F.C.** 1993. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella* Typhimurium during growth within a host macrophage. J Bacteriol 175:3734-3743.

**Allen, C.A., Fedorka-Cray, P.J., Vazquez-Torres, A., Suyemoto, M., Altier, C., Ryder, L.R., Fang, F.C., Libby, S.J.** 2001. In vitro and in vivo assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 virulence. Infect. Immun., 69:4673-4677.

**Andrewes, F.W.** 1922. Studies in group-agglutination. I. The *Salmonella* group and its antigenic structure. J Pathol Bacteriol 25:505-521.

**Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., Lee, C.A.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. Mol Microbiol 22:703-714.

**Barrow, P.A., Huggins, M.B., Lovell, M.A.** 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. Infect Immun 62:4602-4610.

**Baskerville, A., Humphrey, T.J., Fitzgeorge, R.B., Cook, R.W., Chart, H., Rowe, B., Whitehead, A.** 1992. Airborne infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. Vet Rec 130:395-398.

**Bäumer, A.J., Heffron, F.** 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. J Bacteriol 177:2087-2097.

**Baumler, A.J., Kusters, J.G., Stojiljkovic, I., Heffron, F.** 1994. *Salmonella* Typhimurium loci involved in survival within macrophages. Infect Immun 62:1623-1630.

- 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.
- 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* 50:392-397.
- Bryan, F.L.** 1988. Risk of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne disease. *J Food Prot* 51:663-667.
- Buchholz, P.S., Fairbrother, A.** 1992. Pathogenicity of *Salmonella pullorum* in northern bobwhite quail and mallard ducks. *Avian Dis* 36:304-312.
- Buchmeier, N.A., Heffron, F.** 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella* Typhimurium and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect Immun* 57:1-7.
- Buchmeier, N.A., Heffron, F.** 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 59:2232-2238.
- Bumstead, N., Barrow, P.A.** 1988. Genetics of resistance to *Salmonella* Typhimurium in newly hatched chicks. *Br Poult Sci* 29:521-529.
- Buxton A., Fraser, G.** 1988. *Salmonella*. In *Animal microbiology*, Buxton A, Fraser G, eds. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp.103-115.
- Carlson, S.A., Browning, M., Ferris, K.E., Jones, B.D.** 2000. Identification of diminished tissue culture invasiveness among multiple antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Microb Pathog* 28:37-44.

- Carniel, E.** 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* 3:561-569.
- Chen, L.M., Kaniga, K., Galan, J.E.** 1996. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21:1101-1115.
- Chiang, S.L., Mekalanos, J.J., Holden, D.W.** 1999. *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. *Annu Rev Microbiol* 53:129-154.
- Chopra, A.K., Houston, C.W., Peterson, J.W., Prasad, R., Mekalanos, J.J.** 1987. Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *J Bacteriol* 169:5095-5100.
- Chopra, A.K., Peterson, J.W., Chary, P., Prasad, R.** 1994. Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella* Typhimurium. *Microb Pathog* 16:85-98.
- 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., Gyles, C.L.** 1993. *Salmonella*. In Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2<sup>nd</sup> edition. Gyles, C.L., and Thoen, C.O. eds. Iowa State University Press. pp.133-153.
- Contag, C.H., Contag, P.R., Mullins, J.I., Spilman, S.D., Stevenson, D.K., Benaron, D.A.** 1995. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol* 18:593-603.

**Danbara, H., Moriguchi, R., Suzuki, S., Tamura, Y., Kijima, M., Oishi, K., Matsui, H., Abe, A., Nakamura, M.** 1992. Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella* Choleraesuis RF-1 strain on pig septicemia. *J Vet Med Sci* 54:1175-1178.

**Daniels, J.J., Autenrieth, I.B., Ludwig, A., Goebel, W.** 1996. The gene slyA of *Salmonella* Typhimurium is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect Immun* 64:5075-5084.

**Darwin, K.H., Miller, V.L.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 12:405-428.

**Desrosiers, R.** 1999. Les maladies en émergence chez le porc. *Méd Vét Québec* 29:185-188.

**Doolittle, R.F., Feng, D.F., Tsang, S., Cho, G., Little, E.** 1996. Determining the divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* 271:470-477.

**Dunlap, N.E., Benjamin Jr, W.H., Berry, A.K., Eldridge, J.H., Briles, D.E.** 1992. A safe-site for *Salmonella* Typhimurium is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb Pathog* 13:181-190.

**Ehrbar, K., Miold, S., Friebe, A., Stender, S., Hardt, W.D.** 2002. Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium. *Int J Med Microbiol* 291:479-485.

**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.

**Farmer, J.J.** 1999. *Enterobacteraceae*: introduction and identification. In Murray P, ed. Manual of clinical microbiology. 7<sup>th</sup> edition. Washington, DC: AM Soc Microbiol Pr. pp.442-458.

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

**Finlay, B.B., Falkow, S.** 1988. Virulence factors associated with *Salmonella* species. Microbiol Sci 5:324-328.

**Finlay, B.B., Fry, J., Rock, E.P., Falkow, S.** 1989a. Passage of *Salmonella* through polarized epithelial cells: role of the host and bacterium. J Cell Sci Suppl 11:99-107.

**Finlay, B.B., Gumbiner, B., Falkow, S.** 1988a. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. J Cell Biol 107:221-230.

**Finlay, B.B., Heffron, F., Falkow, S.** 1989b. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. Science 243:940-943.

**Finlay, B.B., Rusckowski, S., Dedhar, S.** 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. J Cell Sci 99:283-296.

**Finlay, B.B., Starnbach, M.N., Francis, C.L., Stocker, B.A.D., Chatfield, S., Dougan, G., Falkow, S.** 1988b. Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. Mol Microbiol 2:757-766.

**Gahring, L.C., Heffron, F., Finlay, B.B., Falkow, S.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella* Typhimurium in animal cells. Infect Immun 58:443-448.

**Galan, J.E.** 1999. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 2:46-50.

**Galan, J.E.** 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 20:263-272.

**Galan, J.E., Curtiss III, R.** 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 III, R.** 1990. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* 58:1879-1885.

**Galan, J.E., Ginocchio, C.** 1994. The molecular genetic bases of *Salmonella* entry into mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 22:301-306.

**Garcia-del Portillo, F., Pucciarelli, M.G., Jefferies, W.A., Finlay, B.B.** 1994. *Salmonella* Typhimurium induces selective aggregation and internalization of host cell surface proteins during invasion of epithelial cells. *J Cell Sci* 107:2005-2020.

**Gast, R.K., Benson, S.T.** 1995. The comparative virulence for chicks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. *Avian Dis* 39:567-574.

**Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., Galan, J.E.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella* Typhimurium. *Cell* 76:717-724.

**Groisman, E.A., Ochman, H.** 1994. How to become a pathogen. *Trends Microbiol* 2:289-294.



**Groisman, E.A., Ochman, H.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794.

**Guillot, J.F., Beaumont, C., Bellatif, F., Mouline, C., Lantier, F., Colin, P., Protais, J.** 1995. Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella* Enteritidis. *Vet Res* 26:81-86.

**Gulig, P.A.** 1990. Virulence plasmids of *Salmonella* Typhimurium and other salmonellae. *Microb Pathog* 8:3-11.

**Gulig, P.A., Caldwell, A.L., Chiodo, V.A.** 1992. Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid. *Mol Microbiol* 6:1395-1411.

**Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F., Rhen, M.** 1993. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* 7:825-830.

**Gulig, P.A., Doyle, T.J.** 1993. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun* 61:504-511.

**Gunn, J.S., Alpuche-Aranda, C.M., Loomis, W.P., Belden, W.J., Miller, S.I.** 1995. Characterization of the *Salmonella* Typhimurium pagC/pagD chromosomal region. *J Bacteriol* 177:5040-5047.

**Guthrie, R.K.** 1992. *Salmonella*. Boca Raton, Fl, CRC Press. pp.220.

**Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23:1089-1097.

**Hackett, J., Wyk, P., Reeves, P., Mathan, V.** 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella* Typhimurium by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J Infect Dis* 155:540-549.

**Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269:400-403.

**Hensel, M., Shea, J.E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., Kubo, T., Holden, D.W.** 1997. Functional analysis of *ssaj* and the *ssak/u* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* 24:155-167.

**Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C., Holden, D.W.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30:163-174.

**Huang, X.Z., Tall, B., Schwan, W.R., Kopecko, D.J.** 1998. Physical limitations on *Salmonella typhi* entry into cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 66:2928-2937.

**Ikeda, J.S., Schmitt, C.K., Darnell, S.C., Watson, P.R., Bispham, J., Wallis, T.S., Weinstein, D.L., Metcalf, E.S., Adams, P., O'Connor, C.D., O'Brien, A.D.** 2001. Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect Immun* 69:3021-3030.

**Iyoda, S., Tomokazu, K., Hirose, K., Kutsukake, K., Watanabe, H.** 2001. A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 30:81-90.

**Janakiraman, A., Slauch, J.M.** 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 2000 35:1146-1155.

**Jones, B.D., Falkow, S.** 1994. Identification and characterization of a *Salmonella* Typhimurium oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* 62:3745-3752.

**Kita, E., Kamikaidou, N., Nakano, A., Kashiba, S.** 1993. Isolation of a cytotoxin from L-form *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 109:179-184.

**Kusters, J.G., Mulders-Kremers, G.A.W.M., Van Doornik, C.E.M., Van Der Zeijst, B.A.M.** 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* 61:5013-5020.

**Lawrence, J.G., Ochman, H.** 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* 44:383-397.

**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)* 87:4304-4308.

**Lee, M.D., Curtiss, R., Peay, T.** 1996. The effect of bacterial surface structures on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. *Avian Dis* 40:28-36.

**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.427-458.

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

**Libby, S.J., Goebel, W., Ludwig, A., Buchmeier, N., Bowe, F., Fang, F.C., Guiney, D.G., Songer, J.G., Heffron, F.** 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 91:489-493.

**Libby, S.J., Goebel, W., Muir, S., Songer, G., Heffron, F.** 1990. Cloning and characterization of a cytotoxin gene from *Salmonella* Typhimurium. Res Microbiol 141:775-783.

**Lindell, K.A., Saeed, A.M., McCabe, G.P.** 1994. Evaluation of resistance of four strains of commercial laying hens to experimental infection with *Salmonella* Enteritidis phage type eight. Poult Sci 73:757-762.

**Lindgren, S.W., Stojiljkovic, I., Heffron, F.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella* Typhimurium. Proc Natl Acad Sci USA 93:4197-201.

**Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell.** 1997. Biologie moléculaire de la cellule. 3<sup>e</sup> édition. De Boeck Université S.A., Italie. pp. 1344.

**Lucas, R.L., Lee, C.A.** 2000. Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* Typhimurium. Mol Microbiol 36:1024-1033.

**Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J.** 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259:686-688.

**Malouin, F., Campbell, G.D., Halpenny, M., Becker, G.W., Parr, T.R. Jr.** 1990. Outer membrane and porin characteristics of *Serratia marcescens* grown *in vitro* and in rat intraperitoneal diffusion chambers. *Infect Immun* 58:1247-1253.

**Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625.

**McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852-856.

**McCormick, B.A., Miller, S.I., Carnes, D., Madara, J.L.** 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 63:2302-2309.

**McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1664-1668.

**McDaniel, T.K., Kaper, J.B.** 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* 23:399-407.

**Mills, D.M., Bajaj, V., Lee, C.A.** 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15:749-759.

**Mills, S.D., Finlay, B.B.** 1994. Comparison of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb Pathog* 17:409-423.

**Miold, S., Ehrbar, K., Weissmüller, A., Prager, R., Tschape, H., Rüssmann, H., Hardt, W.-D.** 2001. *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J Bacteriol* 183:2348-2358.

**Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S.** 1996. *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9833-9838.

**Moulder, J.** 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev* 49:298-337.

**Newell, K.W., Williams, L.P.Jr.** 1971. The control of *Salmonella* affecting swine and man. *J Am Vet Med Assoc* 158:89-98.

**Nickerson, C.A., Curtiss III, R.** 1997. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella* Typhimurium infection. *Infect Immun* 65:1814-1823.

**Nnalue, N.A., Shnyra, A., Hultenby, K., Lindberg, A.A.** 1992. *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Typhimurium associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. *Infect Immun* 60:2758-2768.

**Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F., Groisman, E.A.** 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:7800-7804.

**Ochman, H., Wilson, A.C.** 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J Mol Evol 26:74-86.

**Oh, Y.K., Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S.I., Swanson, J.A.** 1996. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella* Typhimurium. Infect Immun 64:3877-3883.

**Osuna, R., Lienau, D., Hughes, K.T., Johnson, R.C.** 1995. Sequence, regulation, and functions of *fis* in *Salmonella* Typhimurium. J Bacteriol 177:2021-2032.

**Pang, T., Bhutta, Z.A., Finlay, B.B., Altwegg, M.** 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. Trends Microbiol 3:253-255.

**Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., Sebahia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature 413:848-852.

**Pascopella, L., Raupach, B., Ghori, N., Monack, D., Falkow, S., Small, PL.** 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Gallinarum. Infect Immun 63:4329-4335.

**Poppe, C., Demczuk, W., McFadden, K., Johnson, R.P.** 1993. Virulence of *Salmonella* Enteritidis phagetypes 4, 8 and 13 and other *Salmonella* spp. for day-old chicks, hens and mice. *Can J Vet Res* 57:281-287.

**Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., Prescott, J.** 1998. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* 39:559-565.

**Posey, J.E., Gherardini, F.C.** 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288:1651-1653.

**Prasad, R., Chopra, A.K., Chary, P., Peterson, J.W.** 1992. Expression and characterization of the cloned *Salmonella* Typhimurium enterotoxin. *Microb Pathog* 13:109-121.

**Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A.** 1995. *Microbiologie*. 2<sup>nd</sup> edition. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles. pp. 1014.

**Rahman, H., Singh, V.B., Sharma, V.D.** 1994. Purification and characterization of enterotoxic moiety present in cell-free culture supernatant of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol* 39:245-254.

**Rakeman, J.L., Miller, S.I.** 1999. *Salmonella* Typhimurium recognition of intestinal environments. *Trends Microbiol* 7:221-222.

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

**Rheault, N., Quessy, S.** 1999. Monitoring of microbial contamination of stick wound in swine carcasses. *Can Vet J* 40:261-264.



**Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M.J., Finlay, B.B.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186:569-580.

**Riikonen, P., Makela, P.H., Saarilahti, H., Sukupolvi, S., Taira, S., Rhen, M.** 1992. The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages. *Microb Pathog* 13:281-291.

**Riley, M., Anilionis, A.** 1978. Evolution of the bacterial genome. *Annu Rev Microbiol* 32:519-560.

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

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

**Santos, R.L., Tsolis, R.M., Bäumlér, A.J., Smith III, R., Adams, L.G.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early *sipB*-dependent and delayed *sipB*-independent mechanisms. *Infect Immun* 69:2293-2301.

**Schiemann, D.A., Shope, S.R.** 1991. Anaerobic growth of *Salmonella* Typhimurium results in increased uptake by Henle 407 epithelial and mouse peritoneal cells in vitro and repression of a major outer membrane protein. *Infect Immun* 59:437-440.

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

**Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D.W.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. Proc Natl Acad Sci USA 93:2593-2597.

**Suter, E.** 1956. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. Bacteriol Rev 20:94-132.

**Tang, P., Foubister, V., Pucciarelli, M.G., Finlay, B.B.** 1993. Methods to study bacterial invasion. J Microbiol Methods 18:227-240.

**van Winsen, R.L., van Nes, A., Keuzenkamp, D., Urlings, H.A., Lipman, L.J., Biesterveld, S., Snijders, J.M., Verheijden, J.H., van Knapen, F.** 2001. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. Vet Microbiol 80:267-274.

**Wallis, T.S., Paulin, S.M., Plested, J.S., Watson, P.R., Jones, P.W.** 1995. The *Salmonella* Dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. Infect Immun 63:2755-2761.

**Weinstein, D.L., O'Neill, B.L., Hone, D.M., Metcalf, E.S.** 1998. Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. Infect Immun 66:2310-2318.

**Whiteman, C.E., Schwartz, K.J.** 1998. Swine disease manual. 2<sup>nd</sup> edition. Minuteman Press, Fort Collins, pp. 253.

**Wong, K.K., McClelland, M., Stillwell, L.C., Sisk, E.C., Thurston, S.J., Saffer, J.D.** 1998. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Infect Immun 66:3365-3371.

**Wood, R.L., Rose, R.** 1992. Populations of *Salmonella* Typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. Am J Vet Res 53:653-658.

**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.

**Zhou, D., Hardt, W.D., Galan, J.E.** 1999. *Salmonella* Typhimurium encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. Infect Immun 67:1974-1981.