

Université de Montréal

Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de *Salmonella* Typhimurium
provenant de porcs sains ou septicémiques

par

Nadia Bergeron

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril 2009

© Nadia Bergeron, 2009

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée

Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de *Salmonella* Typhimurium
provenant de porcs sains ou septicémiques

présentée par

Nadia Bergeron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Martine Boulianne, présidente-rapporteuse

Sylvain Quessy, directeur de recherche

France Daigle, codirectrice

John M. Fairbrother, membre du jury

François Malouin, examinateur externe

Serge Messier, représentant du doyen

RÉSUMÉ

Les infections à *Salmonella* Typhimurium constituent un problème de taille pour l'industrie porcine et la santé publique car cet animal est un réservoir pour les infections chez l'homme. De plus, on observe, chez des souches appartenant au lysotype (LT) 104, des résistances multiples aux antimicrobiens associées à des septicémies chez les porcs en engraissement, ce qui peut contribuer à la contamination des carcasses. Il faut donc contrôler l'infection au niveau du troupeau. Pour ce faire, il importe donc de mieux caractériser ces souches, comprendre la pathogénie de l'infection et identifier des facteurs de virulence.

L'objectif principal de cette étude était de caractériser des isolats de *S.* Typhimurium provenant de porcs septicémiques et de les comparer avec ceux de porcs sains.

Une banque d'isolats provenant de porcs septicémiques (ASC) et de porcs sains à l'abattoir (SSC) était constituée. Le lysotype des isolats a été identifié et ceux-ci ont été caractérisés selon le profil de résistance aux antimicrobiens, le SDS-PAGE et l'immunobuvardage et le PFGE. Chez les isolats ASC, LT 104 représentait 36.4% des isolats et chez les isolats SSC la proportion était de 51.5%. Les isolats pouvaient être résistants jusqu'à douze antimicrobiens, peu importe leur origine. Il n'a toutefois pas été possible d'associer une protéine spécifique au groupe d'isolats ASC. Parmi les souches LT 104, plusieurs groupes génétiques ont été identifiés.

Les différentes étapes de la pathogénie de *Salmonella* ont ensuite été évaluées, dont l'adhésion et l'invasion des isolats des deux banques sur des cellules intestinales humaines. Nos résultats ont démontré que les isolats ASC avaient un pouvoir accru d'invasion comparés aux isolats SSC ($P=0.003$). Pour un sous-groupe d'isolats sélectionnés selon leur taux d'invasion, des tests de phagocytose, d'apoptose et d'adhésion au mucus intestinal ont été effectués en utilisant la cytométrie en flux. La survie des bactéries après la phagocytose a aussi été évaluée et la méthode MATS a

été utilisée pour évaluer l'adhésion aux solvants. Les pourcentages de phagocytose chez les isolats SSC par les monocytes porcins étaient plus élevés que chez les isolats ASC à 15 minutes ($P=0.02$). Nous n'avons trouvé aucune différence significative pour les autres méthodes utilisées.

Nous avons ensuite comparé le génome d'un isolat ASC (#36) à celui d'un isolat SSC (#1) par le SSH pour identifier des facteurs de virulence potentiels. Des clones correspondant à des gènes retrouvés sur le chromosome ainsi que sur des plasmides ont été identifiés. Ces résultats nous ont dirigés vers l'analyse des profils plasmidiques de tous les isolats. Les différents profils étaient retrouvés autant chez les isolats ASC que chez les isolats SSC. Deux profils (PL14 et PL20) étaient observés plus fréquemment chez les isolats LT 104 que chez les isolats d'autres lysotypes ($P=0.01$ et $P=0.01$, respectivement). Le séquençage d'un des plasmides de l'isolat ASC, démontrait la présence d'informations génétiques codant pour la réplication et une bêta-galactosidase- α . Il serait intéressant de préciser le rôle exact de ces gènes dans l'infection.

Nos travaux suggèrent que les isolats de *S. Typhimurium* provenant de porcs septicémiques se distinguent par un pouvoir d'invasion accru ainsi que par des taux de phagocytose plus faibles dans les phases initiales de l'infection. Cette étude aura donc permis d'accroître les connaissances sur la pathogénie des infections à *S. Typhimurium* chez le porc.

Mots-clés : *Salmonella* Typhimurium; porc; septicémie; caractérisation; invasion; phagocytose; plasmide.

SUMMARY

Salmonella Typhimurium infections represent an important threat both to the swine industry and public health since pig is also a reservoir for human infections. Multiresistance to antimicrobial agents is often associated with *S. Typhimurium* belonging to phage type (PT) 104, and these isolates can cause septicemia in fattening pigs. It is thus necessary to control the infection at the herd level to avoid meat contamination by these isolates. However, in order to develop more efficacious control measures, it is important to characterize isolates, better understand the pathogenesis of infection and identify virulence factors.

The main objective of this study was to characterize isolates of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine and to compare them to isolates recovered from healthy pigs.

Isolates of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine (CS) were compared to isolates recovered from healthy animals at slaughterhouses (WCS). The phage type of each isolate was identified and these isolates were characterized by antimicrobial resistance, SDS-PAGE and immunoblotting, and PFGE. Among the CS isolates, PT 104 represented 36.4% of isolates while it represented 51.5% of WCS isolates. Resistance to as many as twelve antimicrobial agents was found in isolates from CS and WCS. However, it was not possible to associate any particular protein to septicemic isolates. Multiple genetic profiles were identified among the isolates of PT 104.

Different steps of the pathogenesis of *Salmonella* infection were evaluated, in particular the ability to adhere to and invade intestinal epithelial cell lines by CS and WCS isolates. The isolates recovered from diseased animals invaded intestinal epithelial cell lines at a higher rate than isolates from healthy pigs ($P=0.003$). Some isolates were selected according to their invasion rate and some analysis, using flow cytometry were done to evaluate phagocytosis, induction of apoptosis, and adhesion

to intestinal mucus. The survival in monocytes was evaluated and the MATS method was used to evaluate the bacterial surface properties, measuring interactions with solvents. Isolates from WCS were more phagocytized than isolates from CS at 15 minutes ($P=0.02$). We found no significant difference for the other methods used.

Using SSH, we also compared the genome of a CS isolate (#36) to that of a WCS isolate (#1), for the identification of putative virulence factors. Clones with chromosome and plasmids homology were obtained. It was therefore decided to analyze the plasmid profiles of all isolates. Two profiles (PL14 and PL20) were more frequently observed in the PT 104 isolates than in the isolates belonging to other phage types ($P=0.01$ and $P=0.01$, respectively). Various profiles were found in both isolates from septicemic pigs and those from healthy pigs. An interesting plasmid of the CS isolate was sequenced. This plasmid possesses genetic information for replication as well as a beta-galactosidase- α . It would be needed to characterize the role of these putative virulence factors in the future.

Our work suggests that isolates from septicemic pigs may be distinguished from isolates from healthy pigs by their better ability to invade intestinal cells as well as by a lower rate of phagocytosis in the early steps of infection. This study increased our knowledge on the pathogeny of *S. Typhimurium* infection in pigs.

Keywords : *Salmonella* Typhimurium; swine; septicemia; characterization; invasion; phagocytosis; plasmid.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------|
| IDENTIFICATION DU JURY..... | ii |
| RÉSUMÉ | iii |
| SUMMARY..... | v |
| TABLE DES MATIÈRES..... | vii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xi |
| LISTE DES FIGURES..... | xii |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS..... | xiv |
| DÉDICACE..... | xvii |
| REMERCIEMENTS..... | xviii |
| CHAPITRE 1. INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE..... | 5 |
| 2.1 Revue générale de <i>Salmonella</i> | 6 |
| 2.1.1 Historique..... | 6 |
| 2.1.2 Caractéristiques générales des salmonelles..... | 6 |
| 2.1.2.1 Taxonomie et nomenclature..... | 7 |
| 2.1.2.2 Classification..... | 8 |
| 2.1.2.3 Spécificité d'hôte..... | 9 |
| 2.1.2.3.1 Principaux sérovars chez le porc..... | 10 |
| 2.1.2.3.2 Principaux sérovars chez l'humain..... | 11 |
| 2.1.2.3.3 Principaux sérovars dans le monde..... | 12 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2.4 Les lysotypes chez <i>S. Typhimurium</i> | 13 |
| 2.1.2.4.1 Principaux lysotypes chez le porc..... | 14 |
| 2.1.2.4.2 Principaux lysotypes chez l'humain..... | 15 |
| 2.1.2.5 Survie dans l'environnement..... | 15 |
| 2.2 Importance des infections à <i>Salmonella</i> en santé publique..... | 15 |
| 2.3 Les signes cliniques chez le porc..... | 18 |
| 2.3.1 La forme septicémique..... | 18 |
| 2.3.2 La forme entérique et les animaux porteurs..... | 18 |
| 2.3.2.1 Les lésions macroscopiques..... | 21 |
| 2.3.2.2 Les lésions microscopiques..... | 21 |
| 2.4 Les signes cliniques chez l'humain..... | 22 |
| 2.5 La transmission de <i>Salmonella</i> | 23 |
| 2.5.1 Sources d'infection chez le porc..... | 23 |
| 2.5.2 Sources d'infection chez l'humain..... | 24 |
| 2.5.3 Transmission et excrétion des salmonelles..... | 24 |
| 2.6 Méthodes de caractérisation phénotypiques et génotypiques des isolats de <i>Salmonella</i> | 26 |
| 2.7 Le transfert horizontal de gènes..... | 28 |
| 2.7.1 Les éléments génétiques impliqués dans le transfert horizontal..... | 28 |
| 2.7.1.1 Les transposons et les intégrons..... | 28 |
| 2.7.1.2 Les plasmides..... | 30 |
| 2.7.1.2.1 Les plasmides de haut poids moléculaire..... | 31 |
| 2.7.1.2.2 Le plasmide de virulence..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 2.7.1.2.3 Les plasmides de faible poids moléculaire..... | 32 |
| 2.7.2 Les mécanismes impliqués dans le transfert horizontal..... | 34 |
| 2.8 Les îlots de pathogénicité..... | 36 |
| 2.9 Multirésistance aux antimicrobiens et mécanismes de résistance..... | 38 |
| 2.9.1 Résistance antimicrobienne chez les <i>S. Typhimurium</i> LT 104..... | 42 |
| 2.9.2 La résistance aux fluoroquinolones..... | 43 |
| 2.10 Pathogénie des infections à <i>Salmonella</i> | 46 |
| 2.10.1 Phase intestinale de l'infection..... | 46 |
| 2.10.1.1 Ingestion de <i>Salmonella</i> | 46 |
| 2.10.1.2 Colonisation et adhésion au tractus intestinal inférieur..... | 48 |
| 2.10.1.3 Invasion des cellules épithéliales de l'hôte..... | 51 |
| 2.10.1.4 Le mécanisme de la diarrhée..... | 54 |
| 2.10.2 Phase septicémique de l'infection..... | 59 |
| 2.11 La résistance génétique chez le porc..... | 61 |
| 2.12 Diagnostic de la salmonellose porcine..... | 62 |
| 2.13 Traitement de la salmonellose chez le porc..... | 63 |
| 2.14 Les vaccins..... | 63 |
| 2.14.1 Les vaccins tués..... | 64 |
| 2.14.2 Les vaccins vivants modifiés..... | 65 |
| 2.14.3 Les vaccins oraux..... | 65 |
| 2.14.3.1 Les vaccins oraux de <i>S. Choleraesuis</i> | 66 |
| 2.15 Résumé de la problématique..... | 67 |

| | |
|--|-----|
| CHAPITRE 3. ARTICLE 1 | |
| Characterization of <i>Salmonella</i> Typhimurium isolates associated with septicemia in swine..... | 69 |
| CHAPITRE 4. ARTICLE 2 | |
| Interaction between host cells and septicemic <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates from pigs..... | 104 |
| CHAPITRE 5. ARTICLE 3 | |
| Genetic characterization of <i>Salmonella</i> Typhimurium isolates from septicemic and healthy pigs..... | 145 |
| CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 181 |
| 6.1 Choix des isolats..... | 183 |
| 6.2 Protéines immunogènes et vaccination..... | 185 |
| 6.3 Caractérisation des isolats..... | 187 |
| 6.4 Pathogénie des infections à <i>Salmonella</i> | 190 |
| 6.5 Le porc comme modèle d'infection pour l'humain..... | 195 |
| 6.6 Étude du génome à l'aide du SSH..... | 196 |
| 6.7 Les plasmides comme facteurs de virulence..... | 199 |
| CHAPITRE 7. CONCLUSIONS..... | 203 |
| CHAPITRE 8. BIBLIOGRAPHIE..... | 206 |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I

| | |
|--|----|
| Répartition mondiale de <i>S. Enteritidis</i> et <i>S. Typhimurium</i> chez les isolats humains..... | 13 |
|--|----|

Tableau II

| | |
|--|----|
| Mécanismes de résistance aux antimicrobiens..... | 41 |
|--|----|

Article 1

Table I

| | |
|--|-----|
| Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of <i>S. Typhimurium</i> PT 104 isolates from diseased and healthy pigs..... | 101 |
|--|-----|

Table II

| | |
|--|-----|
| Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of <i>S. Typhimurium</i> isolates belonging to phage types other than PT 104 from diseased and healthy pigs..... | 102 |
|--|-----|

Article 3

Table 1

| | |
|---|-----|
| Description of specific primers used in the sequencing of SSH derived clone inserts of <i>S. Typhimurium</i> isolate (#36) or plasmid (pST36-4-b5)..... | 173 |
|---|-----|

Table 2

| | |
|--|-----|
| SSH insert clones identified in CS isolate but not in WCS isolate of <i>S. Typhimurium</i> | 175 |
|--|-----|

Table 3

| | |
|---|-----|
| Plasmid profiles, number and description of each plasmid profile from <i>S. Typhimurium</i> isolates from pigs..... | 177 |
|---|-----|

LISTE DES FIGURES

Article 2

Figure 1

Mean percentages of adhesion to and invasion into intestinal cell line Int-407 by *Salmonella* isolates from diseased and healthy animal..... 138

Figure 2

Mean percentages of phagocytosis of *Salmonella* isolates from diseased and healthy animals by porcine and human monocytes at 15 min..... 139

Figure 3

Number of *Salmonella* organisms surviving in porcine blood at 6 h after the beginning of the phagocytosis. 140

Figure 4

Mean percentages of bacteria at different times in the process of apoptosis for isolates from diseased and healthy animals at 6 h after beginning of phagocytosis. 141

Figure 5

Invasion by isolate #4 induces apoptosis in porcine blood. Staining with annexin V-APC (FL4) and 7-AAD (FL3) determined phospholipid phosphatidylserin exposure and membrane integrity, respectively. (A) Two hours after the beginning of phagocytosis; (B) 6 h after the beginning of phagocytosis..... 142

Figure 6

Percentages of fluorescence that adhere to the swine intestinal mucus..... 143

Figure 7

Percentages of affinity to various solvents of selected WCS and CS *Salmonella* isolates, positive control (Cont+) (SL1344), and negative control (Cont-) (*E.coli* 862B)..... 144

Article 3**Figure 1**

(A) Plasmid profiles of CS isolates without the virulence plasmid and (B) different plasmid profiles of WCS isolates on 0.8% agarose gel..... 179

Figure 2

Map of the *S. Typhimurium* plasmid pST36-4-b5 from CS isolate..... 180

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------------|---|
| A : | Absorbance |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| ASC : | Avec signes cliniques |
| bp: | <i>Base pair</i> ; Paire de bases |
| °C : | Degré Celsius |
| Ca ²⁺ : | Calcium |
| CFU : | <i>Colony forming unit</i> ; Unité formatrice de colonies |
| CS : | <i>With clinical signs</i> |
| cm : | Centimètre |
| DAP: | <i>2,6-diaminopimelic acid</i> |
| DNA : | <i>Desoxyribonucleic acid</i> |
| D-PBS : | <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered saline</i> |
| DT : | <i>Definitive type</i> ; Type définitif |
| EFSA : | Autorité Européenne de Sécurité des Aliments |
| FITC : | <i>Fluorochrome fluorescein isothiocyanate</i> |
| FSC : | <i>Forward scatter</i> |
| GALT: | <i>Gut-associated lymphoid tissu</i> ; Système lymphoïde du tube digestif |
| h : | Heure |
| HH : | <i>HEPES-Hanks buffer</i> |
| HMWP : | <i>High molecular weight plasmid</i> |
| Ig: | Immunoglobuline |
| IL: | Interleukine |
| Int-407 : | <i>Human Caucasian embryonic intestine cell line</i> |
| kb : | Kilobase |
| kDa: | Kilodalton |
| LB : | <i>Luria-Bertani</i> |
| LMHP : | <i>Low molecular weight plasmid</i> |
| LPS : | Lypopolysaccharide |
| LT : | Lysotype |

| | |
|--------------------|---|
| M: | Molaire |
| MATS : | <i>Microbial adhesion to solvents</i> |
| MEM : | <i>Minimal essential medium</i> |
| Mg ²⁺ : | Magnésium |
| mg : | Microgramme |
| min : | Minute |
| ml : | Millilitre |
| MLST : | <i>Multilocus sequence typing</i> |
| mm : | Millimètre |
| mM : | Millimolaire |
| MOI : | <i>Multiplicity of infection</i> ; Multiplicité d'infection |
| NaCl : | Chlorure de sodium |
| NB : | <i>Nutrient broth</i> |
| nm : | Nanomètre |
| OD : | <i>Optical density</i> ; Densité optique |
| ORF : | <i>Open reading frame</i> |
| PCR: | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PFGE : | <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> |
| PMN : | Polymorphonucléaire |
| pH: | <i>Potential hydrogen</i> |
| PT : | <i>Phage type</i> ; Type phagique |
| RNA : | <i>Ribonucleic acid</i> |
| SDS-PAGE : | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SGI : | <i>Salmonella genomic island</i> ; Îlot génomique de <i>Salmonella</i> |
| SPI : | <i>Salmonella pathogenicity island</i> ; Îlot de pathogénicité de <i>Salmonella</i> |
| SSC : | Sans signe clinique |
| SSC : | <i>Side scatter</i> |
| SSH : | <i>Suppression subtractive hybridization</i> |
| SST3 : | Système de sécrétion de type III |
| µm : | Micromètre |
| µM : | Micromolaire |

| | |
|------------------|--|
| μg : | Microgramme |
| UV : | Ultraviolet |
| V : | Volt |
| v/v ou vol/vol : | <i>Volume to volume</i> |
| WCS : | <i>Without clinical signs</i> |
| w/v ou wt/vol : | <i>Weight/volume percentage solution</i> |

À vous deux,
pour votre amour et votre confiance.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé ou contribué de près ou de loin à ce projet et je vous remercie également pour tous les encouragements reçus. Je remercie de façon particulière les personnes suivantes.

Mon directeur de recherche, le Dr Sylvain Quessy pour m'avoir acceptée comme étudiante, ses précieux conseils, son appui, ses encouragements et sa confiance. Merci aussi pour ta disponibilité, malgré tes nombreuses occupations, tu arrivais à trouver du temps pour une rencontre.

Ma codirectrice, la Dre France Daigle pour son appui, sa très grande disponibilité et ses précieux conseils. Merci d'avoir ouvert la porte de ton laboratoire à une novice en biologie moléculaire et celle de ton bureau pour toutes mes interrogations.

Les membres de la CRSV pour l'aide technique ou bureaucratique, leurs conseils, les discussions et leur écoute. Merci à tous les étudiants et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces années. Vous êtes une équipe agréable à travailler. Merci pour les activités de divertissement qui nous permettaient de décompresser un peu. Je remercie en particulier les personnes suivantes : Ann Letellier, Louise Lessard, Annie DesRosiers, Hélène Bergeron, Sophie Lachambre, Lucie Verdon, Valérie Normand, Karine Giguère et Bénédicte Bouchet pour leur aide et leur amitié.

Les membres du laboratoire de la Dre France Daigle qui m'ont intégrée dans leur laboratoire et qui m'ont prodigué de nombreux conseils.

La Dre Judith Bossé et Mme Sylvie Desmarchais, directrices du LSTH pour m'avoir permis de travailler dans leurs locaux, ainsi que tout le personnel du laboratoire pour avoir partagé avec moi leurs équipements, mais aussi leurs expériences de travail.

Jonathan Corriveau pour avoir débuté le projet avec grand soin. Il a été agréable de relire ton cahier de laboratoire.

Les membres du GREMIP pour les activités scientifiques et sociales que nous avons eues au cours de mes études.

Je remercie les professeurs qui m'ont demandé de l'aide dans différents cours et qui m'ont permis de découvrir l'enseignement.

Je remercie les membres du jury lors de l'examen pré-doctoral et les membres du jury qui vont prendre le temps de lire ma thèse.

Les organismes suivants pour leur soutien et leur appui financier : le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, la Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes, la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal, le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine, la compagnie Vétoquinol, l'Association Scientifique de la Viande et Newly Weds Foods-Division UFL.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

Salmonella est une bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* dont la niche écologique est le tractus intestinal des animaux et de l'homme. La salmonellose est la deuxième maladie entérique la plus importante mondialement; c'est une zoonose sérieuse pour l'homme dont on estime à 1.3 milliard le nombre de cas par année dans le monde (175). Dans les pays industrialisés, 5 à 30% des cas diagnostiqués de salmonellose chez l'humain sont associés à la viande de porc (19). Les infections à *Salmonella* Typhimurium représentent un problème de taille pour l'industrie porcine et la santé publique. Celui-ci étant un sérovar important qui peut infecter l'humain et qui cause une gastro-entérite qui peut être sévère ou non selon l'immunité de la personne atteinte (52).

Habituellement, les infections chez le porc avec le sérovar Choleraesuis sont associées avec une maladie septicémique alors que le sérovar Typhimurium est associé avec une maladie entérique. Cependant, depuis quelques années, une augmentation des épisodes septicémiques causés par *S. Typhimurium* et associés à des signes cliniques sévères et de la mortalité est observée (57, 141). Les infections à *Salmonella* amènent des pertes économiques importantes. De façon générale, il existe relativement peu de cas de salmonellose clinique dans les élevages porcins, mais il y a beaucoup de sujets sains qui hébergent la bactérie qui n'est pas considérée comme un habitant de la flore normale de l'intestin. C'est principalement la présence de ces porteurs asymptomatiques qui suscitent une problématique dans les élevages porcins. Au Québec, 50% des élevages porcins sont porteurs de *Salmonella* et 20.6% des porcs sont infectés (185), ce qui en fait le plus important pathogène alimentaire à contrôler pour l'industrie porcine. Ces porcs peuvent excréter *Salmonella* dans les

heures suivant un stress (93). Ce stress peut avoir lieu autant à la ferme, que pendant le transport ou à l'abattoir.

Il n'y a pas de traitement disponible présentement pour contrôler efficacement les porteurs asymptomatiques. Par contre, lors de salmonellose clinique, le but de l'utilisation d'antimicrobiens est de minimiser les signes cliniques, de prévenir la dissémination et la récurrence de la maladie dans le troupeau. Malheureusement, on observe de plus en plus des résistances multiples aux antimicrobiens pour *S. Typhimurium*. En effet, des souches de *S. Typhimurium* présentant des résistances multiples aux antimicrobiens et appartenant aux lysotypes (LT) 104 et 108 causent des septicémies chez les porcs en engraissement. De plus, celle-ci étant une bactérie intracellulaire, plusieurs antimicrobiens ne peuvent atteindre la bactérie. Il est donc important de trouver une alternative afin d'éviter l'état de porteur.

Les porcs sont un réservoir de l'infection pour l'humain (20). L'homme peut s'infecter par les animaux, par les porcs porteurs ou la viande et ses sous-produits qui peuvent être contaminés lors du processus d'abattage. Les carcasses peuvent être contaminées parce que les bactéries persistent plusieurs jours dans les tissus des animaux atteints (49). Il faut donc contrôler l'infection au niveau du troupeau pour éviter que ces souches ne contaminent les viandes.

Présentement, il existe un vaccin commercial contre *S. Choleraesuis* qui est utilisé pour prévenir les pneumonies, les diarrhées, les septicémies et la mortalité causées par ce sérovar. Ce vaccin semble aussi efficace dans le contrôle des signes

cliniques de la maladie, mais moins dans le contrôle de l'excrétion des bactéries lors d'infection avec *S. Typhimurium*. L'identification d'un nouvel antigène protecteur serait importante dans ce contexte. Il serait donc intéressant de trouver une ou des protéines qui seraient présentes chez toutes les souches de salmonelles, autant celles qui causent des septicémies que celles présentent chez les porteurs asymptomatiques, pour utilisation dans un vaccin afin de prévenir la contamination entre les porcs, mais surtout éviter la contamination chez l'humain.

Le but de cette étude était l'identification d'un facteur de virulence potentiel pouvant être impliqué dans l'invasion des tissus par *S. Typhimurium* qui permettrait de développer un vaccin mucosal contre les infections à *S. Typhimurium* chez le porc. L'objectif de ce projet était de caractériser des isolats de *S. Typhimurium* par des méthodes phénotypiques et génotypiques provenant de porcs septicémiques et de les comparer à des isolats provenant de porcs sains.

CHAPITE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Revue générale de *Salmonella*

2.1.1 Historique

En 1880, Ebert a observé l'agent de la fièvre typhoïde et Gaffky est parvenu à cultiver ce bacille en 1884 tel que revu par Grimont et coll (95). Par la suite, en 1886, Salmon et Smith ont découvert chez des porcs un organisme qui est maintenant connu sous le nom de *Salmonella Choleraesuis* (93). Ces chercheurs pensaient alors qu'ils venaient d'isoler l'organisme causant la fièvre porcine (cholera du porc). Les salmonelles ont été nommées en l'honneur du bactériologiste et vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon. En 1896, Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de *Salmonella* à l'aide d'un nouveau test qu'il a appelé sérodiagnostique (95). Depuis, de nombreux sérovars sont identifiés.

2.1.2 Caractéristiques générales des salmonelles

Les salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et elles sont classées dans le genre *Salmonella* ayant des déterminants morphologiques et biochimiques homogènes. Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif mesurant 0.7 à 1.5 μm par 2.0 à 5.0 μm et mobiles, grâce à des flagelles péritriches (135). Toutefois, les sérovars Pullorum et Gallinarum et certains mutants ne sont pas mobiles (135). Les salmonelles sont non sporulantes, non encapsulées et poussent facilement sur des milieux usuels et en anaérobiose. Les colonies ont généralement

un diamètre de 2 à 4 mm et *Salmonella* a une croissance optimale à 37°C : c'est un pathogène intracellulaire facultatif qui infecte l'hôte par voie orale.

L'habitat des salmonelles est le tractus intestinal des humains et de la plupart des espèces animales à sang chaud et froid. *Salmonella* a souvent été nommée pathogène universel. Les signes cliniques d'une infection par des salmonelles peuvent varier d'une entérite à une infection septicémique pouvant être fatale. *Salmonella* est aussi incriminée dans des cas de toxi-infections alimentaires chez l'humain. Les animaux d'élevage peuvent être des porteurs sains et ainsi servir de réservoir pour *Salmonella*.

2.1.2.1 Taxonomie et nomenclature

On peut reconnaître quatre étapes dans l'évolution de la taxonomie de *Salmonella* : 1) l'évidence clinique, 2) la spécificité des antigènes, 3) les propriétés biochimiques et 4) l'hybridation de l'ADN (136). Aucune de ces propositions n'a fait l'unanimité dans la communauté scientifique. La distance génétique mesurée par l'analyse des isoenzymes (*multilocus enzyme electrophoresis*) et l'hybridation ADN-ADN ont permis de reconnaître deux espèces dans le genre *Salmonella* (136, 189). La première est *Salmonella enterica* qui se divise en six sous-espèces : *S. enterica* subsp. *enterica* (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) et *S. enterica* subsp. *indica* (sous-espèce V). La deuxième espèce est *Salmonella bongori* (anciennement sous-espèce V) (189).

Le CDC (*Center for Disease Control*, Atlanta, Georgie) et l'ASM (*American Society for Microbiology*) ont adopté les deux espèces de *Salmonella* décrites plus haut. La nomenclature suivante est utilisée par ces deux organismes. Le nom du sérovar est conservé, mais il n'est pas en italique. Le sérovar (ou sérotype) est une subdivision qui permet de distinguer les microorganismes appartenant à une sous-espèce sur la base de caractéristiques propres à leurs antigènes. La première fois qu'une *Salmonella* est citée, on la nomme de cette façon : *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium alors que *Salmonella* Typhimurium (ou *S.* Typhimurium) pourra être utilisée pour les mentions subséquentes (143).

2.1.2.2 Classification

Le schéma de Kauffman-White (127) permet de subdiviser les salmonelles en sérovars en se basant sur l'identification de trois types différents d'antigènes. L'antigène somatique (O) est associé avec la membrane cellulaire et composé de lipopolysaccharides, l'antigène flagellaire (H) est associé avec les flagelles péritriches (cet antigène est diphasique chez la majorité des *Salmonella*) (101, 135) et l'antigène capsulaire (Vi) est retrouvé seulement chez quelques sérovars de *Salmonella*, comme par exemple Typhi (101). Un sérotypage complet est laborieux et effectué seulement

dans quelques laboratoires; ceux-ci vont déterminer la nature de l'antigène O pour une identification rapide et préliminaire. Les souches d'un sérovar peuvent-être par la suite subdivisées en utilisant le biotypage, le lysotypage et la présence de plasmides.

On dénombre actuellement 2541 sérovary dans le genre *Salmonella* (179). La plupart de ces sérovary appartiennent à l'espèce *S. enterica* à l'exception de 22 qui font partis de l'espèce *S. bongori* (179). La sous-espèce I (*subsp. enterica*) regroupe la majorité des sérovary indentifiés (1504 sérovary) (179). Les isolats appartenant à ce groupe sont retrouvés chez les animaux à sang chaud. Alors que les isolats des autres sous-espèces, incluant l'espèce *S. bongori*, sont isolés chez des animaux à sang froid et dans l'environnement. Fait intéressant, les isolats de toutes les espèces et de toutes les sous-espèces de *Salmonella* peuvent être isolés chez les humains (179).

2.1.2.3 Spécificité d'hôte

Quelques sérovary se sont adaptés aux hôtes et sont spécifiques d'espèce animale. Les plus importants sont les suivants : *Salmonella* Typhi chez les humains, *Salmonella* Dublin chez les bovins, *Salmonella* Gallinarum et Pullorum chez les volailles, *Salmonella* Abortusequi chez les chevaux, *Salmonella* Abortusovis chez les moutons et *Salmonella* Arizona chez les reptiles (93, 143). Chez les porcs, les sérovary Choleraesuis et Typhisuis se sont adaptés spécifiquement à cette espèce (14, 93, 143). La majorité des sérovary de *S. enterica* ne sont pas associés avec un hôte ou une maladie en particulier. *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont souvent isolées chez

les vertébrés présentant ou non des signes cliniques (143). *S. Typhimurium* est identifiée comme le prototype des sérovars à large spectre d'hôtes, elle a été isolée chez plusieurs espèces incluant les humains et celles des animaux domestiques ou sauvages, des rongeurs et des oiseaux (184).

Plusieurs sérovars peuvent être isolés des carcasses ou des produits carnés du porc, mais l'infection chez l'espèce porcine est, dans plusieurs pays, associée avec le sérovar *Choleraesuis*, causant une maladie systémique, et avec le sérovar *Typhimurium*, responsable d'entéocolite (93). Au Québec, *S. Typhimurium* est celle qui est la plus souvent retrouvée dans la population porcine et *S. Choleraesuis* est très rarement isolée lors de salmonellose porcine. Toutefois, des épisodes septicémiques avec *S. Typhimurium* et associés avec des signes cliniques sévères et de la mortalité sont maintenant observés (57, 141).

2.1.2.3.1 Principaux sérovars chez le porc

En Europe et au Japon, *S. Typhimurium* a été le sérovar le plus isolé chez des porcs sains en engraissement (7, 160, 230). En Europe, *S. Typhimurium* est le sérovar le plus souvent isolé dans les carcasses ou les nœuds lymphatiques des porcs à l'abattoir (24, 230, 247) et dans la viande de porc (230). Au Canada en 2006, les sérovars les plus souvent isolés des échantillons caecaux de porcs à l'abattoir et des matières fécales chez des porcs sains à la ferme étaient *S. Typhimurium* et *S. Derby* (91). Alors que, *S. Branderburg* était en 1999 le sérovar le plus isolé chez des porcs à l'abattoir au Québec et *S. Typhimurium* était le quatrième en importance (142).

En Ontario, le sérovar Typhimurium a été le plus souvent isolé parmi les cas soumis au *Animal Health Laboratory*, Université de Guelph et au *Laboratory for Foodborne Zoonoses, Health Canada* entre 1991 et 2001 (268). Au Canada en 2006, *S. Typhimurium* est le sérovar le plus souvent identifié chez des isolats cliniques de porcs (91). Aux États-Unis, des échantillons prélevés entre 2002 et 2003 provenant de quatre laboratoires de diagnostic vétérinaire de différents états ont été analysés (269). Les sérovares les plus souvent isolés chez les porcs étaient *S. Typhimurium*, *S. Derby* et *S. Choleraesuis*.

2.1.2.3.2 Principaux sérovares chez l'humain

Salmonella peut causer des maladies chez les humains allant de la gastroentérite (*S. Typhimurium* et *S. Enteritidis*) à une maladie systémique qui peut résulter en la mort (*S. Typhi* : qui cause la fièvre typhoïde). *S. Typhimurium* est un des sérovares le plus souvent retrouvé dans les cas de diarrhée chez l'humain. Tous les sérovares sont potentiellement pathogènes pour l'homme, mais peu sont associés à une maladie grave (10).

En 2006 au Canada, parmi les isolats cliniques de *Salmonella*, *S. Enteritidis* (22.2%) et *S. Typhimurium* (16.8%) (91) ont été les plus isolés par le Laboratoire National de Microbiologie (LMN) (91). Aux États-Unis, l'infection est associée autant à *S. Enteritidis* qu'à *S. Typhimurium* et représente environ 45% des infections humaines (6, 119). En 2007 en Europe, l'infection est associée davantage à *S. Enteritidis* (64.5%) qu'à *S. Typhimurium* (16.5%) (230).

2.1.2.3.3 Principaux sérovars dans le monde

Les sérovars de *Salmonella* provenant d'isolats d'humains, d'animaux, de nourriture pour humain et pour animaux et de sources environnementales ont été déterminés dans différentes régions du monde (2000-2004) (256). Chez les humains, 61% des isolats étaient des *S. Enteritidis* et 18% des *S. Typhimurium*. Alors que chez les isolats non-humains, 23% étaient des *S. Typhimurium* et 8% des *S. Enteritidis* (*S. Heidelberg* vient en seconde place avec 9%) (256). Le tableau I (p.13) indique la répartition des *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* dans les différentes régions du monde pour les isolats humains.

Tableau I : Répartition mondiale de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* chez les isolats humains (256).

| Région | Répartition de <i>Salmonella</i> | |
|---|----------------------------------|---------------------------|
| | <i>S. Enteritidis</i> (%) | <i>S. Typhimurium</i> (%) |
| Afrique | 19 | 31 |
| Amérique du Nord | 22 | 27 |
| Amérique du Sud et Centrale et les Caraïbes | 39 | 17 |
| Asie | 33 | 5* |
| Europe | 75 | 13 |
| Océanie | 7† | 59 |

*: *S. Typhimurium* est en 5^{ème} position. *S. Enteritidis*, *S. Weltevreden*, *S. Anatum* et *S. Stanley* le précèdent.

† : *S. Enteritidis* est en 3^{ème} position. *S. Typhimurium* et *S. Virchow* le précèdent.

2.1.2.4 Les lysotypes chez *S. Typhimurium*

Le lysotypage évalue la susceptibilité des isolats à des bactériophages et permet de subdiviser les sérovars en différents variants. Certains lysotypes sont retrouvés chez un nombre limité d'hôtes alors que la majorité des lysotypes peuvent infecter une grande variété d'hôtes (184). Chez *S. Typhimurium*, les isolats qui infectent les humains via la nourriture proviennent d'un groupe diversifié. En effet, on dénote plus de 80 lysotypes parmi ces isolats (184). *S. Typhimurium* du lysotype (LT) 104 (synonyme de type définitif (TD) ou de type phagique (TP)) est un pathogène virulent pour l'homme et les animaux. Nous porterons à ce lysotype une

attention particulière étant donné l'importance de la multirésistance aux antimicrobiens et de la virulence de ce pathogène, la possibilité de son origine clonale, l'augmentation de sa prévalence et son potentiel zoonotique (10, 89, 120, 144, 147).

2.1.2.4.1 Principaux lysotypes chez le porc

Lors d'études effectuées en Ontario, aux États-Unis et en France, les auteurs rapportent que le lysotype (LT) 104 est celui qui est le plus souvent rapporté chez des porcs sains (50, 51, 66, 67, 83, 134). Par contre, des études faites au Québec et en Espagne, LT 104 est le deuxième lysotype en importance après LT 108 et LT 193/U 302 respectivement (81, 141, 160). Au Canada en 2006, le LT 104 a été identifié comme étant le lysotype le plus fréquent chez les isolats cliniques de *S. Typhimurum* chez les porcs (91).

Au Japon, un groupe de chercheurs a remarqué une diminution de la prévalence des isolats de *S. Typhimurium* LT 104 retrouvé chez des animaux sains dont les isolats provenaient du *Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring program*. En effet, en comparant les années 1999-2001 à 2002-2005, le groupe a trouvé une diminution significative entre ces deux cohortes (31.4% (11/35) et 4.1 % (2/48) ($P < 0.01$)) (64, 128).

2.1.2.4.2 Principaux lysotypes chez l'humain

En 2006 au Canada, les lysotypes les plus souvent identifiés parmi les isolats cliniques de *S. Typhimurium* par le LMN sont LT 170 (15.2%) et LT 104 (12.8%) (91). En 2007, selon le rapport de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), les lysotypes de *S. Typhimurium* les plus rapportés lors de cas confirmés de salmonellose étaient LT 193 (8.69%) LT 104 (7.34%) et LT 120 (7.33%) (230).

2.1.2.5 Survie dans l'environnement

Salmonella peut survivre dans différents environnements, ce qui favorise sa distribution mondiale. En effet, les salmonelles peuvent se multiplier entre 7 et 45°C et bien survivre à la congélation et à la dessiccation (93). Elles peuvent persister des semaines, des mois, voire même des années dans un substrat organique qui leur est favorable. *Salmonella* est inactivée par la chaleur aussi bien que par le phénol, le chlore et les désinfectants à base d'iode. La survie de *Salmonella* est plus courte en présence d'un pH inférieur à cinq (112).

2.2 Importance des infections à *Salmonella* en santé publique

Les infections à *Salmonella* comptent parmi les infections bactériennes les plus communes chez l'humain et sont associées à des gastroentérites reliées à la consommation de nourriture contaminée d'origine animale (203). Chaque année, au Canada, on dénombre de 6 000 à 12 000 cas de salmonellose humaine (205). Ceux-ci

correspondraient à une infirme partie des cas réels puisque la majorité ne sont pas recensés parce que les cas moins sévères peuvent passer inaperçus et être auto-limitants ou ne peuvent être différenciés des symptômes d'une grippe (205).

Dans le monde, la salmonellose non-typhoïdale est associée à des millions de cas de gastroentérite et/ou de diarrhée chez l'humain qui provoquent des milliers de décès annuellement (263). Les décès surviennent surtout chez les jeunes sujets, chez les personnes âgées ou les personnes immunodéprimées (183). Chaque année aux États-Unis, les sérovars de *Salmonella* causent environ 1.4 million de cas de maladies transmises par la nourriture, résultant en 168 000 visites chez le médecin, 15 000 hospitalisations et 580 mortalités (159, 263). Le coût estimé en 2008 de ces infections est de 2.6 milliards de dollars américains (239). Pour l'année 2007, l'EFSA a rapporté 151 995 cas confirmés de salmonellose humaine dans l'Union Européenne (230). Depuis 2004, l'EFSA remarque une diminution générale de la fréquence du nombre de cas de salmonellose chez l'humain qui serait expliqué par le contrôle intensif chez les populations animales, particulièrement la volaille et une meilleure hygiène le long de la chaîne alimentaire (230).

Au Danemark, le coût annuel est estimé à 15.5 millions de dollars américains en 2001 pour les infections alimentaires causées par des salmonelles (263). Depuis 1995, au Danemark, il existe un programme national de surveillance et de contrôle pour *Salmonella* chez les porcs. Ce programme implique tous les stades de production et a permis de réduire la prévalence de *Salmonella* chez les porcs de 3.5% en 1993 à 0.7 % en 2000 (171). On a aussi remarqué une diminution significative de

l'incidence des cas rapportés chez les humains. Cette réduction de la salmonellose humaine transmise par la nourriture est le résultat du contrôle de *Salmonella* au niveau des fermes et des usines agroalimentaires (253). Le coût estimé annuel de ce programme de contrôle (volailles et porcs) est de 14 millions de dollars américains ce qui permettrait d'économiser 25.5 millions de dollars américains annuellement aux dépenses publiques du Danemark (253, 263).

La salmonellose est considérée, avec la campylobactériose, comme les deux intoxications alimentaires les plus prévalentes dans les pays industrialisés. Depuis quelques années, les problèmes liés aux salmonelles ont pris de l'importance entre autre à cause de l'augmentation de l'incidence et de la gravité des cas, même si certains pays ont réussi à diminuer le nombre de cas associés à la salmonellose chez l'humain (263). On peut penser à *S. Typhimurium* LT 104 qui est multirésistante aux antimicrobiens. De plus, certains isolats sont résistants à des antimicrobiens qui ont une importance capitale en médecine humaine (263). Pour les *Salmonella*, les antimicrobiens ayant une importance primordiale sont les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération selon l'Organisation Mondiale de la Santé (262).

Tel que mentionné précédemment, les deux sérovars les plus prévalents chez l'humain sont *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*. *S. Enteritidis* est plus souvent associée aux œufs et à la volaille, alors que *S. Typhimurium* est plus souvent associée avec des produits contaminés provenant des porcs et du bœuf (230).

2.3 Les signes cliniques chez le porc

2.3.1 La forme septicémique

Chez le porc, *S. Choleraesuis* est habituellement associée avec une septicémie. Les porcelets de moins de cinq mois sont les plus souvent atteints, mais les porcs de tous les âges peuvent être infectés par *S. Choleraesuis* et manifestent des signes de septicémie ou d'avortement (93). Les porcs affectés peuvent démontrer de la léthargie, de l'inappétence et être fébriles (température jusqu'à 41.7°C) (69, 93). Des signes respiratoires peuvent apparaître 24 à 36 heures plus tard (188). Les premiers signes de la maladie sont des porcs qui ont de la difficulté à se déplacer et qui restent dans un coin du parc. La mort arrive en 2 à 4 jours et les porcs décédés ont les extrémités et l'abdomen cyanosés. Normalement, il n'y a pas de diarrhée dans les premiers jours d'infection. La mortalité est élevée et peut atteindre 100% surtout si le système nerveux central est impliqué (143). La morbidité est variable, mais normalement elle se situe à moins de 10% (93).

2.3.2 La forme entérique et les animaux porteurs

Les entérocolites sont habituellement associées à *S. Typhimurium* et plus rarement à *S. Choleraesuis* et la maladie peut être aiguë ou chronique. La salmonellose porcine est retrouvée principalement dans les élevages intensifs chez les porcelets sevrés d'environ quatre mois. À l'occasion, on peut la retrouver chez les porcs en engraissement ou chez les reproducteurs et rarement chez les porcelets à la

mamelle. La période d'incubation est de 24 à 48 heures. La mortalité est faible, mais la morbidité est élevée après quelques jours d'infection (93, 143).

Dans la forme localisée, une diarrhée liquide, jaune et fétide ne contenant ni sang ni mucus est présente ; la maladie peut se propager en quelques jours dans le troupeau. La diarrhée initiale chez un porc dure de 3 à 7 jours, mais il y a souvent un 2^{ème} et un 3^{ème} épisode donnant l'impression que la diarrhée persiste plusieurs semaines (93). Du sang peut apparaître sporadiquement dans les fèces. Les signes cliniques de la salmonellose deviennent évidents douze heures après l'infection quand les porcs développent de la fièvre. La plupart des porcs redeviennent cliniquement normaux, mais une portion demeure des porteurs et ils peuvent excréter de façon intermittente pour une période de cinq mois et plus après l'épisode.

La maladie causée par *S. Typhimurium* ne se limite pas à une gastroentérite ; on observe une nouvelle forme apparaît de plus en plus fréquemment. L'infection est soudaine et peut mener à la mort de sujets qui semblaient normaux dans les jours précédents (57, 141). Les signes cliniques que l'on peut observer sont de la diarrhée abondante, une septicémie et une mortalité subite. La maladie se produit souvent en fin d'engraissement (57).

L'état de porteur est représenté par un animal qui est infecté par *Salmonella* et qui ne démontre aucun signe clinique de la maladie. Par contre, le porc porteur est une source de contamination pour l'environnement, les autres animaux, les humains ou les carcasses à l'abattoir (104). Il existe trois types de porteurs : les porteurs actifs,

les porteurs passifs et les porteurs latents tel que revu par Wray and Sojka (265). Les porteurs actifs sont des animaux qui présentent ou qui ont présenté des signes cliniques de salmonellose et qui excrètent des salmonelles de façon permanente ou intermittente. On remarque aussi un titre élevé d'anticorps sériques dirigés contre les antigènes O et H de *Salmonella* (92). Des *Salmonella* sont présentes dans le tractus intestinal et dans les nœuds lymphatiques mésentériques.

Les porteurs passifs sont des animaux qui ingèrent des *Salmonella* et qui les excrètent dans leurs fèces, mais il n'y a pas ou peu de bactéries qui vont se loger dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Lorsque les animaux sont retirés de l'environnement contaminé, ils arrêteront d'excréter des bactéries peu de temps après leur retrait (revu par Wray and Sojka (265)).

Les animaux latents ou silencieux ont des *Salmonella* au niveau des nœuds lymphatiques mésentériques et n'excrètent pas la bactérie dans leurs fèces et la culture fécale est souvent négative (revu par Wray and Sojka (265)). Ils pourront développer une entérite sévère lors d'un stress et commencer à excréter quelques heures après celui-ci (93, 143) et redevenir des porteurs actifs. Suite à une infection à *S. Typhimurium*, certains porcs deviennent des porteurs asymptomatiques pour une longue période (261) et ils deviennent une source de contamination pour le troupeau (143). L'infection dans les troupeaux est plus commune que la maladie. Au Québec, *Salmonella* est retrouvée dans 50% des élevages et 20.6% des porcs sont porteurs (185).

2.3.2.1 Les lésions macroscopiques

Chez les porcs morts suite à une diarrhée, les lésions macroscopiques les plus importantes sont une entérite nécrotique focale ou diffuse, une colite ou une typhlite (69, 93). Ces lésions ressemblent à des débris adhérents gris jaune sur une surface mucoale rouge oedématiée du colon spiralé, du caecum ou de l'iléon. Les nœuds lymphatiques mésentériques et particulièrement les nœuds lymphatiques iléocaecaux sont plus gros et oedémateux. La nécropsie indique que les nœuds lymphatiques iléocaecaux sont un des endroits les plus sûres pour l'isolement de salmonelles chez le porc (129).

2.3.2.2 Les lésions microscopiques

Microscopiquement, la lésion typique de l'entérite est la nécrose des cryptes intestinales et de la surface des entérocytes qui varie de focale à diffuse. La lamina propria et la sous-muqueuse contiennent de nombreux macrophages et un nombre modéré de lymphocytes ; les neutrophiles sont nombreux seulement dans les lésions au début de la maladie (93). Les villosités de l'iléum peuvent être aplaties et couvertes de bactéries, de mucus et de neutrophiles. On peut observer au niveau du colon une inflammation importante, ceci étant le résultat de la congestion de petits vaisseaux et d'infiltration de neutrophiles et de macrophages dans la lamina propria (188).

2.4 Les signes cliniques chez l'humain

Les symptômes de gastroentérite apparaissent entre 6 et 24 heures après l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminées (202). Les symptômes les plus communs chez les humains infectés par *S. Typhimurium* LT 104 sont la diarrhée (100% des cas), la fièvre (80%), la douleur abdominale (65%), des vomissements (45%) et la présence de sang dans les selles (27%) (78). La gastroentérite peut durer aussi longtemps qu'une semaine et la sévérité de la maladie varie d'une personne à une autre. Le porteur asymptomatique peut excréter *Salmonella* pendant trois mois.

S. Typhimurium peut, dans de rares cas, se disséminer dans le sang et causer une septicémie. Hohmann rapporte que dans 5% des cas de gastroentérite causés par des *Salmonella* non-typhoïdes une bactériémie se développera (113). Ces cas s'observent surtout chez les personnes âgées, les enfants et les immunodéficients (90, 113, 217) mais des bactériémies peuvent se rencontrer aussi chez des personnes en bonne santé de façon sporadique (194). Les personnes les plus susceptibles peuvent aussi développer une infection localisée comme une méningite, une arthrite septique ou une pneumonie.

La plupart du temps, les symptômes rencontrés lors d'infection à *S. Typhimurium* sont auto-limitants et l'emploi d'antimicrobiens ne sera pas nécessaire. Chez l'humain, il est reconnu que l'utilisation d'antimicrobiens lors d'entérite à *Salmonella* prolongera l'état de porteur. Les fluoroquinolones sont devenues le traitement de choix pour la fièvre typhoïde étant donné que les salmonelles sont

maintenant résistantes à de multiple autres antimicrobiens (22, 176, 250). Par ailleurs, les fluoroquinolones ont été utilisées dans plusieurs pays pour traiter les infections non-typhoïdales chez les humains et les animaux (264). Cette utilisation a résulté en une augmentation du nombre d'isollements de *Salmonella* résistants aux fluoroquinolones chez les animaux (94, 264).

2.5 La transmission de *Salmonella*

2.5.1 Sources d'infection chez le porc

Les sources potentielles pour une infection à *Salmonella* sont très nombreuses, mais l'animal porteur serait la source majeure d'infection chez les animaux (93). L'environnement contaminé par les porcs porteurs chroniques, les animaux vecteurs (oiseaux, insectes, rongeurs et animaux domestiques et sauvages), la nourriture, l'eau, l'environnement et le personnel qui transporte du matériel contaminé sont des sources possibles d'infection (24, 93, 141, 143). La plupart des contaminations de la viande ont lieu à l'abattoir pendant le processus d'abattage (contamination croisée et directe) (139, 247), mais les porcs infectés provenant de la ferme sont considérés comme étant la source des infections à l'abattoir (139). Le stress du transport et le jeûne augmentent l'excrétion par des porteurs sous-cliniques qui eux contaminent l'environnement des camions et de l'abattoir et la contamination des carcasses (18, 140).

2.5.2 Sources d'infection chez l'humain

La salmonellose est devenue l'une des zoonoses les plus importantes transmises par la viande dans les pays développés. En effet, la volaille, les produits de la viande et les œufs sont les aliments les plus souvent identifiés comme source de contamination à l'homme (203). D'autres aliments peuvent aussi être incriminés comme le lait, les fruits frais et les jus, les épices, la crème glacée et les légumes (203, 218). Les salmonelles peuvent aussi être transmises par des contacts directs avec des animaux et des humains (169).

La viande de porc et les produits transformés du porc sont des sources significatives d'infection pour l'humain (11, 19). Les porcs peuvent être infectés par une multitude de sérovars qui ne causent pas de maladie chez le porc, mais qui peuvent être un vecteur de *Salmonella* dans les produits dérivés (93) et un réservoir de l'infection pour l'humain (20).

2.5.3 Transmission et excrétion des salmonelles

En général, la transmission féco-orale est le mode de transmission le plus utilisé par les salmonelles virulentes (93). Cette transmission peut se faire de porc à porc, de la mère à ses descendants ou par un environnement contaminé. Les sécrétions oro-pharyngées contenant des salmonelles peuvent amener une contagion nez à nez. Les sécrétions en aérosol, les fèces et les particules de poussière sont les principaux composants d'une transmission en aérosol sur de courtes distances (93).

L'excrétion persiste longtemps après l'infection. Dans une étude réalisée dans notre laboratoire, il a été démontré que *S. Typhimurium* persiste jusqu'à sept jours dans les tissus extraintestinaux et est retrouvée dans les fèces pendant les 14 jours suivant un challenge expérimental (49). Après une infection, les porcs peuvent devenir des porteurs latents, en excréant des salmonelles pendant 28 semaines (261). Une étude réalisée au Danemark estime que le temps moyen d'excrétion de *S. Typhimurium* dans un troupeau se situe entre 18 et 26 jours (132). On rapporte aussi que les porcs où l'on ne peut détecter aucune bactérie dans les fèces peuvent devenir des excréteurs en quelques heures suite à un stress (93). On estime à 15% la prévalence d'excréteurs asymptomatiques de *S. Typhimurium* (11, 143, 226). La transmission entre les porcs peut aussi survenir pendant le transport et l'attente à l'abattoir où le taux d'infection est proportionnel au temps passé dans le transport et lors de l'attente (121, 122). Cela pourrait être le résultat de la relâche de cathécholamines suite au stress et amènerait une diminution de la production de l'acidité gastrique et une augmentation de la mobilité intestinale. Le pH gastrique étant moins acide, *Salmonella* peut survivre plus facilement et se rendre dans l'intestin pour se multiplier (93).

Il y a différents facteurs de risque qui peuvent exacerber des épisodes cliniques de salmonellose dont une production porcine en continu, le mélange d'animaux d'âges différents, les sources de porcelets, un pauvre contrôle de l'environnement, une sanitation déficiente, la compétition pour la nourriture, l'eau et les zones de confort, la surpopulation, d'autres maladies virales, bactériennes ou

parasitaires et une nutrition inadéquate. L'exposition à ces différents éléments peut résulter en la manifestation de la maladie chez les porcs en fin d'engraissement.

2.6 Méthodes de caractérisation phénotypiques et génotypiques des isolats de *Salmonella*

Plusieurs techniques (PFGE, ribotypage et profil de résistance aux antimicrobiens) sont utilisées pour étudier la diversité parmi les salmonelles et, de manière générale *S. Typhimurium* est reconnue pour avoir une faible diversité génétique (144). Les méthodes phénotypiques étudient les propriétés exprimées par les bactéries. Plusieurs techniques phénotypiques sont disponibles pour la caractérisation des isolats : le sérotypage, le lysotypage, le biotypage et le profil de résistance aux antimicrobiens (75, 232).

En 2001, le génome de *S. Typhimurium* LT 2, une souche principalement utilisée pour la biologie cellulaire et moléculaire, a été séquencé (156). Les méthodes génotypiques permettent de différencier les isolats au niveau du génome et ces analyses génomiques donnent une meilleure compréhension des relations entre les souches des différents sérovars (39). Des méthodes génotypiques sont de plus en plus utilisées pour différencier les différents isolats de *Salmonella*. Il en existe plusieurs ; dont l'analyse des profils d'ADN en gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (75, 144), la technique de polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) (145), le typage moléculaire par *multilocus sequence typing* (MLST) (75), les profils plasmidiques (75, 144, 232), la technique de polymorphisme de longueur des

fragments de restriction (RFLP) (13), les patrons de restriction des gènes (ribotype) (144).

Parmi les méthodes génotypiques, le PFGE est considéré la méthode standard pour comparer les différents isolats de *Salmonella* (85, 228). Lorsque le PFGE est utilisé avec l'enzyme *XbaI*, cette méthode est considérée comme un test épidémiologique valable pour le sérovar Typhimurium (60). Cependant, une deuxième enzyme peut être utilisée pour augmenter le pouvoir discriminant (54, 70). Le *PulseNet USA (the national molecular surveillance network for foodborne infections in the United States)* utilise une première enzyme pour étudier les relations entre les différents isolats et une deuxième enzyme pour confirmer les résultats ou obtenir une discrimination supplémentaire (85).

Il n'y a pas de corrélation apparente entre les méthodes phénotypes et génotypes couramment utilisées et aucune de celles-ci n'est en mesure d'identifier les isolats de *S. Typhimurium* LT 104 ayant les gènes de résistance de la pentarésistance (89). La majorité des isolats de *S. Typhimurium* LT 104 démontre une résistance à cinq antimicrobiens : ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamides et tétracycline (82) ; ce qui désigne la pentarésistance associée aux isolats de *S. Typhimurium* LT 104. Il est donc important d'utiliser une combinaison de méthodes phénotypiques et génotypiques pour identifier et caractériser les isolats de *S. Typhimurium* (75, 83, 144).

2.7 Le transfert horizontal de gènes

Le transfert horizontal de gènes, c'est-à-dire l'échange de matériel génétique entre espèces et inter-espèces, joue un rôle essentiel dans l'évolution des bactéries pathogènes. Ce transfert de gènes serait responsable de la distribution des gènes de résistance aux antimicrobiens et des déterminants de pathogénicité. Les gènes de virulence regroupés des bactéries pathogènes peuvent être situés sur des éléments génétiques transmissibles comme les transposons, les intégrons ou les plasmides (212). de la Cruz et Davies (55) proposent que le transfert de gènes de façon horizontale serait responsable de la sous-spécification chez les bactéries et que le mécanisme existerait chez les eucaryotes. Trois mécanismes principaux permettent le transfert horizontal de gènes chez les procaryotes : la transformation, la conjugaison et la transduction (126).

2.7.1 Les éléments génétiques impliqués dans le transfert horizontal

2.7.1.1 Les transposons et les intégrons

Les transposons sont constitués d'ADN double brin (< 1 à 60 kb) ne possédant pas de système de répllication. Cet absence de système permet aux transposons d'être plus stables lors de leur intégration aléatoire dans l'ADN chromosomal ou plasmidique (212). Les transposons de petite taille connus sous le nom de séquences d'insertion codent pour une transposase ; alors que ceux de plus grande taille codent entre autre pour des gènes de résistance aux antimicrobiens.

Les intégrons jouent un rôle majeur dans la dispersion des gènes de résistance chez les bactéries Gram négatif (< 2 kb) (187). Les intégrons sont essentiellement composés d'un site de recombinaison spécifique et d'un gène de résistance. Ils ne possèdent pas de système de répllication et de transposition. Un système de recombinaison à des sites spécifiques leur permet de se déplacer. Les intégrons possèdent deux régions conservées entre lesquelles peuvent s'insérer des gènes de résistance aux antimicrobiens.

Deux intégrons de classe I sont identifiés chez les isolats de *S. Typhimurium* LT 104 ; ces intégrons sont séparés par une séquence dérivée d'un plasmide de type R (32). Chaque intégron possède un gène d'intégrase en 5' et un gène *sull* en 3' (gène pour la résistance aux sulfamides), ceux-ci sont séparés par des gènes de résistance aux antimicrobiens et aux désinfectants (*qauEA*) (32, 204). Le premier intégron possède le gène *aadA2* qui est associé à la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine (192, 204). Le deuxième intégron possède le gène de résistance *bla_{PSE-1}* qui code pour la résistance aux β-lactames (192, 204).

De plus, les gènes codant pour la résistance au chloramphénicol et aux tétracyclines se situent entre les deux intégrons décrits plus haut (32, 170). L'ensemble de ces gènes de résistance sont regroupés sur un locus chromosomal de 12.5 kb (43). Boyd et coll ont démontré que ce groupe de gènes appartient à l'îlot génomique de *Salmonella* I (SGI-I *Salmonella* Genomic Island) (26).

2.7.1.2 Les plasmides

Les plasmides sont mobiles et constitués d'ADN extrachromosomal double brin (2 à > 100 kb), circulaire qui peuvent être isolés chez les bactéries pathogènes autant que celles de la flore normale de l'hôte (212). Les plasmides peuvent se répliquer de façon autonome puisqu'ils possèdent des systèmes de réplication. Les fonctions présentes sur les plasmides ne sont pas essentielles à la survie des bactéries lors de conditions physiologiques, mais peuvent être bénéfiques aux bactéries dans certaines conditions spécifiques (212). Les plasmides codent pour différentes fonctions comme la résistance aux antimicrobiens/désinfectants ou pour des facteurs de virulence. Les plasmides peuvent être présents en une seule copie pour ceux de haut poids moléculaire ou en copies multiples pour ceux de faible poids moléculaire et ceux fabriqués artificiellement pour le clonage. Une bactérie peut contenir plus d'un plasmide. Les plasmides peuvent s'intégrer dans un autre plasmide ou dans le chromosome, en partie ou au complet ou bien être un vecteur pour les transposons et les intégrons.

Une première évaluation des plasmides peut-être faite par l'analyse de la taille et du nombre de plasmides présents dans les bactéries. Deux plasmides de même poids moléculaire, mais avec des séquences d'ADN différentes ne pourront être distingués sur un profil plasmidique. On peut confirmer le résultat en digérant les plasmides avec des enzymes de restriction créant un patron caractéristique de bandes pour chaque plasmide. Les plasmides peuvent être transférés par conjugaison et/ou par mobilisation.

2.7.1.2.1 *Les plasmides de haut poids moléculaire*

Les sérovars de *S. enterica* possèdent des plasmides variant de 2 kb à plus de 200 kb (199), mais la fréquence et la taille varient selon les sérovars. Les plasmides les mieux décrits sont ceux de virulence spécifique (50 à 100 kb) présents chez les sérovars fréquemment associés avec des infections chez les humains et les animaux de la ferme. Il s'agit des sérovars Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum et Abortusovis (199). Parmi ces sérovars, il est difficile de trouver un isolat de champ qui ne possède aucun plasmide (199) puisque ceux-ci possèdent presque tous des plasmides de virulence spécifique qui sont impliqués dans l'expression de la virulence chez *Salmonella*. Par exemple, le profil plasmidique dominant pour *S. Typhimurium* est constitué par un plasmide unique de 95 kb (10).

Il est bien connu que les plasmides de haut poids moléculaire transportent des facteurs de virulence (16). *Salmonella* peut posséder d'autres plasmides de haut poids moléculaire qui transfèrent de la résistance aux antimicrobiens et ainsi contribuent à disséminer des gènes dans la population bactérienne (199). Les plasmides transportant des gènes de résistance se nomment plasmides R et peuvent transporter d'autres structures génétiques tel que des transposons ou des intégrons. Certains plasmides de résistance chez des isolats de *S. Typhimurium* peuvent montrer un réarrangement ou des délétions si la pression de sélection ne favorise pas la conservation de gènes de résistance aux antimicrobiens (33) puisque ces plasmides représentent une charge considérable pour la bactérie hôte (199).

2.7.1.2.2 *Le plasmide de virulence*

Les plasmides de virulence des souches de *Salmonella* sont de taille variable et leur distribution dépend du sérovar (105, 199). Comme mentionné précédemment, le plasmide de virulence de *S. Typhimurium* est un plasmide d'environ 95 kb (10), alors que le plasmide de virulence de *S. Choleraesuis* possède une taille d'environ 50 kb (105). Le plasmide de virulence comprend trois régions qui contribuent à la réplication et à la maintenance chez *Salmonella* : IncFIB, IncFIIA et *parAB*. Le plasmide de virulence de *S. Typhimurium* possède ces trois régions ainsi qu'une origine de transfert (*oriT*). Le plasmide de virulence de *S. Typhimurium* contient un gène *tra* pour le transfert par conjugaison (2).

Les principaux gènes retrouvés sur le plasmide de virulence de *S. Typhimurium* sont les gènes *spvRABCD* (*Salmonella plasmid virulence*), *rck* (*resistance to complement killing*), *pef* (*plasmid-encoded fimbriae*), *srgA* (*SdiA-regulated gene, putative disulphide bond oxidoreductase*) et *mig-5* (*macrophage-inducible gene coding for putative carbonic anhydrase*) (revu par Rychlik et coll (199)). Le rôle de ce plasmide sera décrit dans la section 2.10.2 Phase septicémique.

2.7.1.2.3 *Les plasmides de faible poids moléculaire*

Les plasmides de faible poids moléculaire sont de taille plus petite que 20 kb et n'ont habituellement pas de fonction connue. Chez *Salmonella*, les plasmides de faible poids moléculaire sont rencontrés seulement chez 10% des souches de champ

(199). Parmi ces plasmides de faible poids moléculaire quelques-uns ont été associés à une augmentation de la résistance lors d'infection par des phages à cause de la présence de systèmes de restriction et de modification. Quelques plasmides de faible poids moléculaire sont retrouvés chez d'autres sérovars (Dublin, Newport et Muenster) et leur fréquence d'isolement est faible pour ces sérovars (36). Les plasmides de faible poids moléculaire sont fréquemment isolés chez les *Enterobacteriaceae* (199). Malgré leur relative instabilité, leur présence ou absence est souvent utilisée pour différencier les souches dans des études épidémiologiques (10, 144). La présence de ces plasmides chez seulement certaines souches de *Salmonella* amène le questionnement suivant : quelles fonctions retrouvent-on sur ces plasmides pour que les isolats de *Salmonella* emploient autant d'effort pour conserver les plasmides de faible poids moléculaire dans leur cytoplasme.

Selon le mode de répllication, les plasmides de faible poids moléculaire peuvent être classés en deux groupes. Les plasmides qui répliquent à travers des intermédiaires théta (par exemple : un plasmide ColE1) et les plasmides possédant une répllication circulaire (RCR : *rolling circle replicating*) (199). Les plasmides RCR codent seulement pour une protéine Rep et possèdent une taille d'environ 2 kb. Les plasmides RCR ne font aucune contribution à l'hôte et on suppose qu'ils ont une répllication efficace et que *Salmonella* ne peut pas s'en débarrasser (199).

Aucun plasmide de faible poids moléculaire n'a été impliqué dans la résistance aux antimicrobiens. Rychlik et coll (199) mentionnent qu'ils ont trouvé une souche de *S.*

Typhimurium qui possédait un plasmide ColE1 de 8.5 kb avec une copie complète d'un transposon Tn3 qui transférait la résistance à l'ampicilline (observations non-publiées).

2.7.2 Les mécanismes impliqués dans le transfert horizontal

La transformation est un mécanisme par lequel les procaryotes intègrent de l'ADN libre présent dans le milieu externe. La transformation peut s'effectuer entre deux espèces bactériennes différentes. Cet outil joue un rôle important pour les bactéries Gram positif dans la nature. La transformation est le mécanisme majeur utilisé pour insérer des plasmides dans une nouvelle bactérie dans des conditions *in vitro* (211).

La transduction est un processus par lequel les gènes peuvent se déplacer d'une espèce de procaryotes à une autre via des bactériophages (211). La quantité d'ADN à transférer est limitée par la taille du phage et les phages sont parfois restreints à un hôte en particulier. Les phages peuvent déposer l'ADN double brin dans le cytoplasme ou s'intégrer dans le chromosome (172). La transduction peut-être généralisée, une situation où n'importe quel gène peut être transféré, ou bien spécialisée alors que seulement les gènes situés près du site d'intégration sont transférés. Chez *Salmonella*, la transduction semble importante parce que plusieurs souches transportent des phages de transduction (208). La transformation et la transduction ne requièrent pas que les cellules donatrices et réceptrices soient présentes à la même place ou au même moment.

Les phages peuvent être utilisés comme outil génétique. Les phages P22, *Gifsy-1*, *Gifsy-2*, Fels-1, ST104 et SopEΦ ont été utilisés pour la caractérisation d'isolats de *S. Typhimurium* (61). *S. Typhimurium* possède des bactériophages lysogéniques comme *Gifsy-1*, *Gifsy-2*, Fels-1, Fels-2 et SopEΦ (72, 73, 156, 164). *Gifsy-1* et *Gifsy-2* sont deux phages lambda-like qui sont intégrés à différents endroits dans le génome de *S. Typhimurium* (156). Ces deux phages sont considérés comme étant des facteurs de virulence chez la souris (72, 225).

La conjugaison implique un contact physique entre les cellules donatrices et réceptrices. La conjugaison se produit quand la cellule donatrice construit une structure qui ressemble à un tube, le pilus, qui la relie à la cellule receptrice et transfère le plasmide à travers le tube. Le plasmide qui a été transféré est connu comme étant le plasmide de conjugaison. Par cette méthode, des procaryotes d'espèces différentes peuvent s'échanger du matériel génétique. Il y a plusieurs types de conjugaison 1) le transfert d'un plasmide de conjugaison auto-transmissible, 2) la mobilisation, où le plasmide est non auto-transmissible, mais contient une origine de transmission, 3) la cointégration, où deux plasmides différents fusionnent pour devenir qu'un et 4) la conjugaison par des transposons. L'importance de la conjugaison dans la dispersion des gènes de résistance chez *Salmonella* est bien établie (111).

2.8 Les îlots de pathogénicité

Les gènes de virulence des bactéries pathogènes peuvent être associés à des régions particulières, sur le chromosome bactérien, appelées îlots de pathogénicité. Ceux-ci sont retrouvés chez les bactéries Gram négatif et Gram positif. Plusieurs bactéries pathogènes contiennent des gènes de virulence qui ne sont pas présents chez les souches ou les espèces non-pathogènes très liées. de la Cruz et Davies (55) rapportent que même avec la fréquence des plasmides et des phages, des études génomiques ont montré que la plupart des gènes de virulence sont intégrés dans le chromosome des bactéries, qui eux sont présents au niveau des îlots de pathogénicité. Plusieurs membres des *Enterobacteriaceae* (ex : *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* et *Yersenia* spp.) causant des infections intestinales et extraintestinales ont des îlots de pathogénicité qui codent pour des facteurs de virulence (103). L'acquisition de ceux-ci est une étape clef dans l'évolution des pathogènes. Cependant, le mode de transmission spécifique des îlots de pathogénicité n'a pas encore été démontré et l'origine de leur évolution reste inconnue. On sait toutefois, que plusieurs îlots de pathogénicité sont situés aux loci tRNA ou tRNA-like, ceux-ci semblent être des sites communs pour l'intégration de séquences étrangères (102, 172). De plus, les séquences qui se retrouvent de chaque côté des îlots de pathogénicité contiennent souvent de petites répétitions directes qui rappellent celles générées lors de l'intégration d'éléments génétiques mobiles (102, 172) et les ORFs (*open reading frame*) dans certains îlots de pathogénicité montrent une séquence similaire aux intégrases des bactériophages (172), suggérant que les

chromosomes, classiquement vus comme essentiellement immobiles sont en fait la nécropole de la génétique de gènes mobiles.

Chez *S. Typhimurium*, cinq îlots de pathogénicité ont été identifiés et caractérisés (SPI-1 à 5) (259, 260). Toutefois, le séquençage a permis d'identifier jusqu'à maintenant dix îlots de pathogénicité chez des isolats de *S. Typhimurium* (206). L'îlot de pathogénicité 1 (SPI-1) est une région de 40 kb situé sur le chromosome au niveau du centisome 63 de *Salmonella* (150, 163) et possède un système de sécrétions de type III (SST3). Les gènes de l'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2) sont situés au centisome 30 sur le chromosome de *Salmonella* et possèdent une taille de 40 kb contenant 44 ORFs dont plusieurs sont régulés par un système de régulation à deux composantes SsrA/SsrB et un SST3 (214).

L'îlot de pathogénicité 3 (SPI-3) est une région de 17 kb situé au centisome 82 sur le chromosome de *Salmonella* et code pour l'opéron *mgtCB* qui est requis pour la croissance dans des conditions limitées en Mg^{+2} et la survie intra-macrophage (219). Ces régions codent aussi pour *rnbA*, *misL*, *fidL* et *mart*. Le système PhoP/PhoQ régule cet opéron à travers des senseurs de Mg^{+2} , PhoQ, et l'activateur, PhoP (220).

L'îlot de pathogénicité 4 (SPI-4) est un îlot de 25 kb qui code pour 18 ORFs (259). Les gènes de SPI-4 sont régulés par le régulateur transcriptionnel SirA (3). Alors que l'îlot de pathogénicité 5 (SPI-5) est sur le chromosome au centisome 25 (260). Les gènes dans SPI-5 sont *pipABCD* et *orfX*. Le rôle de SPI-1 et 2 sera discuté dans la section 2.10 sur la pathogénie des infections à *Salmonella*.

2.9 Multirésistance aux antimicrobiens et mécanismes de résistance

Un antimicrobien est un composé chimique qui possède un mécanisme d'action spécifique pour contrer la croissance des bactéries ou les tuer de façon ciblée. L'action de l'antimicrobien peut donc être de type bactéricide ou bactériostatique. Le but de l'utilisation des antimicrobiens est d'aider la défense spécifique et non-spécifique de l'hôte. Cependant, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux antimicrobiens et les isolats résistants développent des résistances peu de temps après l'apparition d'une nouvelle molécule. Les gènes associés à cette résistance peuvent se retrouver sur le chromosome ou sur des plasmides.

Les antimicrobiens sont souvent administrés aux animaux individuellement pour traiter (thérapie) ou prévenir (prophylaxie) une maladie (97, 158). Chez les animaux en production intensive, les antimicrobiens sont administrés chez des animaux malades pour les traiter ainsi que chez des animaux sains qui partagent le même environnement (métaphylaxie) ou pour améliorer la croissance des animaux (promoteur de croissance) (97, 158). La métaphylaxie implique l'administration d'antimicrobiens à des doses thérapeutiques pour une courte période de temps (158). La surutilisation des antimicrobiens dans le traitement ou la prévention des maladies, autant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, amène des questionnements.

L'antimicrobiorésistance est reconnue comme étant un problème émergent de santé publique. La plus grande préoccupation pour le public est que l'ensemble des gènes de résistance augmentent et que ceux-ci se retrouvent sur des plasmides ou

d'autres éléments mobiles qui permettent leur dispersion (111). Au Canada, le Programme Intégré Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA) (91) permet de suivre l'évolution de la résistance autant chez les humains que chez les animaux dont les produits transformés vont à la consommation humaine. *Salmonella* est une bactérie qui est évaluée par ce programme de surveillance.

Pour *Salmonella*, le profil de résistance aux antimicrobiens est généralement évalué par les méthodes de diffusion en disque ou de dilution selon les normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (44). En utilisant l'une ou l'autre de ces méthodes, le phénotype du profil antimicrobien est évalué. Pour *Salmonella*, le profil de résistance n'est pas une méthode phénotypique satisfaisante pour discriminer les isolats vu la fluidité des plasmides et des transposons impliqués dans le processus de résistance (232). Par contre, le profil de résistance peut être utilisé dans des études épidémiologiques en complément avec d'autres tests phénotypiques et génotypiques comme le sérotypage, le biotypage, le lysotypage et le profil plasmidique (232).

Les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux antimicrobiens qui peuvent être regroupés selon leur mode d'action: 1) la modification des cibles des antimicrobiens pour empêcher leur action, 2) l'inactivation de l'antimicrobien par des enzymes, 3) la réduction des concentrations intracellulaires de l'antimicrobien soit par des pompes à efflux, soit par une diminution de la perméabilité de la membrane (8, 38, 201). La résistance aux antimicrobiens peut être le résultat d'une résistance intrinsèque ou acquise par conjugaison, transformation ou transduction. La résistance

intrinsèque est une résistance naturellement présente chez tous les isolats et est habituellement chromosomale. *Salmonella* a des résistances naturelles aux classes d'antimicrobiens suivantes : les polypeptides (bacitracine), les lincosamides (clindamycine), les macrolides (érythromycine) (211), les streptogramines (quinupristine/dalfopristin) et les glycopeptides (vancomycine) (97). Par exemple, les bactéries Gram négatif ont une résistance naturelle aux glycopeptides parce que leur membrane externe est imperméable à ces antimicrobiens (97). La résistance acquise est généralement obtenue par une mutation au niveau des gènes du chromosome ou par acquisition de gènes via un plasmide chez certains isolats de l'espèce. Le tableau II (p.41) donne les différents mécanismes d'action des principales classes d'antimicrobiens et les mécanismes utilisés par les bactéries pour les contrer.

Tableau II : Mécanismes de résistance aux antimicrobiens (38, 191, 200, 211, 266)
(revu par Schwarz et Chaslus-Dancla (212)).

| Classe d'antimicrobiens | Exemples d'antimicrobiens | Mécanisme de résistance aux antimicrobiens† |
|--|--|--|
| Inhibition de la synthèse de la paroi (peptidoglycane) | | |
| β-Lactamines | amoxicilline-acide clavulanique, ampicilline, céfoxitine, ceftiofur, ceftriaxone, céphalothine | 1, 2, 3, 4 |
| Glycopeptides | vancomycine | 1, 3 |
| Polypeptides | bacitracine | 1 |
| Inhibition de la synthèse protéique | | |
| Aminoglycosides | amikacine, apramycine, gentamicine, kanamycine, néomycine, streptomycine | 1, 2, 3, 4 |
| Lincosamides- | clindamycine | 1, 2, 3, 4 |
| Macrolides | érythromycine | 1, 2, 3, 4 |
| Phénicoles | chloramphénicol | 1, 2, 3, 4 |
| Tétracyclines | tétracycline | 1, 2, 4 |
| Streptogramines | quinupristine-dalfopristine | 1, 2, 3, 4 |
| Inhibition de la synthèse ou du fonctionnement de l'ADN | | |
| Quinolones | acide nalidixique | 1, 3, 4 |
| Fluoroquinolones | ciprofloxacine, enrofloxacin | 1, 3, 4 |
| Inhibiteur de la folate | triméthoprime-sulfaméthoxazole, sulfisoxazole | 1, 2, 3, 4 |

† 1) modification de la cible, 2) inactivation enzymatique, 3) diminution de la perméabilité et 4) pompes à efflux.

2.9.1 Résistance antimicrobienne chez les *S. Typhimurium* LT 104

Une augmentation du niveau de résistance chez *S. Typhimurium* et de la multirésistance (souches ayant plus d'une résistance) est observée depuis quelques années (111). *S. Typhimurium* possède une fréquence plus élevée de résistance que les autres sérovars. La localisation de gènes de résistance sur des plasmides de conjugaison et sur des transposons permettent une dispersion efficace de ces gènes de résistance chez les *Salmonella*. LT 104 est un lysotype qui est multirésistant aux antimicrobiens.

La grande majorité des isolats de *S. Typhimurium* LT 104, isolés au Canada, aux États-Unis et en Europe, ont des gènes de résistance qui sont associés à l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et la tétracycline (type R : ACSSuT) (51, 75, 82, 83, 89, 117, 120, 170). Les isolats de *S. Typhimurium* LT 104 sont résistants aussi à d'autres antimicrobiens, par exemple : l'apramycine, la gentamicine, la kanamycine, le triméthoprime, l'amoxicilline-acide clavulanique et/ou la ciprofloxacine (83, 120, 147, 152, 234). Des isolats de *S. Typhimurium* de lysotypes autres que LT 104 démontrent la résistance de type R (186).

Threlfall et coll (233) ont été les premiers à identifier la localisation chromosomale des gènes de résistance pour les *S. Typhimurium* LT 104 quand ils ont montré que des isolats pentarésistants (ACSSuT) avaient toujours cette résistance malgré l'élimination du plasmide de virulence. L'origine de l'ADN contenant les gènes de résistance contre ACSSuT n'est pas connue, des études suggèrent une

possible dissémination clonale de ces isolats dans la population (32, 192). En général, les isolats de *S. Typhimurium* LT 104 sont considérés d'origine clonale (10, 147), toutefois, des auteurs ont observés une plus grande diversité génétique parmi des isolats LT 104 (152, 269).

Une résistance à la triméthoprine a aussi été détectée, cette résistance se retrouve sur un plasmide non transférable, mais mobilisable et les gènes de résistance aux sulfonamides peuvent aussi être présents (234). La résistance à la gentamicine est transmissible et le plasmide responsable de cette résistance est spécifique pour l'enzyme 3-N-aminoglycoside acétyltransférase (AAC(3)IV) (53) qui donne aussi la résistance aux aminoglycosides reliés comme l'apramycine.

2.9.2 La résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones, introduites dans les années 1990 en médecine vétérinaire, sont une des plus récentes classes d'antimicrobiens à large spectre d'activité efficaces pour le traitement d'une variété de conditions en médecine humaine et vétérinaire (9, 115). En médecine vétérinaire, les fluoroquinolones sont utilisées pour traiter des infections intestinales et systémiques chez les animaux de consommation (9). En médecine humaine, ce sont des antimicrobiens de choix pour traiter la salmonellose dans plusieurs pays (35, 115).

Les fluoroquinolones sont des antimicrobiens bactéricides et représentent la troisième génération des quinolones. L'utilisation de certaines fluoroquinolones,

comme l'enrofloxacin, est approuvée chez les animaux de production dans certains pays (266). L'enrofloxacin est administrée oralement dans la nourriture ou l'eau chez des porcs malades ou seulement en prophylaxie. Le traitement de prévention avec des fluoroquinolones augmente la pression sélective et prédispose pour l'apparition de souches résistantes (9).

L'ADN bactérien est circulaire et légèrement superenroulé. Lors de la réplication et de la transcription, l'ADN double brin est déroulé pour permettre la synthèse d'un nouveau brin d'ADN. Les quinolones vont agir sur deux enzymes qui sont essentielles dans le déroulement de l'ADN : la topoisomérase II, aussi connue comme l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (96). La gyrase et la topoisomérase IV sont un complexe d'enzymes composé de deux paires de sous-unités chacun : GyrA et GyrB pour la gyrase et ParC et ParE pour la topoisomérase IV (125). Quelques espèces bactériennes ont seulement l'ADN gyrase, mais la plupart des espèces bactériennes ont les deux enzymes. L'ADN gyrase est la cible principale des fluoroquinolones chez les bactéries Gram négatif alors que la topoisomérase IV est la cible principale chez les bactéries Gram positif. Les quinolones inhibent la réplication de l'ADN bactérien en se liant à leur cible et en provoquant un changement de conformation et une accumulation d'ADN-topoisomérase-quinolone (96, 202).

La résistance aux fluoroquinolones serait essentiellement le résultat d'une mutation au niveau du gène *gyrA*. Chez *Salmonella*, les mutations ponctuelles se produisent dans un premier temps sur le gène *gyrA* ; en effet, une simple mutation dans *gyrA* résulte en une résistance importante à l'acide nalidixique (198). Toutefois,

des mutations ont aussi été rapportées sur les gènes *gyrB*, *parC* et *parE* tel que revu par Hopkins et coll (115). Le mécanisme d'action commun implique que la résistance à une fluoroquinolone conduit à une résistance aux autres fluoroquinolones. Les résistances arrivent spontanément et impliquent des substitutions d'acides aminés dans la région de la sous-unité *gyrA* qui est appelée *quinolone-resistance-determining region* (QRDR) (125). On rapporte des mutations chez certaines souches de *Salmonella* qui sont situées à l'extérieur de la QRDR (235). Cette mutation est souvent associée à une diminution de l'expression des porines de la membrane externe ou à la surexpression des pompes à efflux (115). Le problème avec cet antimicrobien est qu'une seule mutation dans les acides aminés de la sous-unité gyrase A rend les bactéries résistantes aux fluoroquinolones. Cette résistance pourrait être le résultat d'une surutilisation des fluoroquinolones en médecine humaine (202). Des auteurs rapportent que des infections avec des *S. Typhimurium* résistantes aux fluoroquinolones sont associées avec une augmentation de la mortalité et de la morbidité chez l'humain comparés aux infections avec des *S. Typhimurium* susceptibles aux quinolones (109, 110).

Les mutations dans les gènes des topoisomérases ne pourraient pas expliquer tous les phénotypes de résistance, ce qui laisse la possibilité d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance supplémentaires (26). D'autres études sont nécessaires quant à l'implication de l'opéron *marRAB*, un locus qui contrôle la résistance de plusieurs antimicrobiens (227). Celui-ci pourrait avoir un rôle à jouer dans cette résistance chez les *Salmonella*. Des mutations dans l'opéron *marRAB* pourraient amener une surproduction de la pompe à efflux AcrAB (88), mais cela n'a pas encore

été démontré chez *Salmonella*. On a isolé le gène *qnr* sur un plasmide (PMQR, *plasmid-mediated quinolone resistance*) (235) chez quelques isolats, dont *E. coli* et *S. Typhimurium* (1, 235). Le type de résistance serait la protection de l'ADN par une liaison avec une protéine. La protéine QnrA peut se lier à l'holoenzyme gyrase aussi bien qu'à ses sous-unités GyrA et GyrB et à l'holoenzyme topoisomérase IV et à ses sous-unités ParC et ParE (236, 237). Cette résistance plasmidique entraîne une résistance aux quinolones et une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones.

2.10 Pathogénie des infections à *Salmonella*

Pour causer une maladie, une bactérie pathogène intracellulaire doit passer par les cinq stades de la pathogénie soit : 1) adhérer aux tissus de l'hôte, 2) envahir les tissus de l'hôte (habituellement), 3) se multiplier dans les tissus de l'hôte, 4) s'évader des défenses de l'hôte et 5) causer des dommages. *Salmonella* n'échappe pas à ces étapes qui seront élaborées dans les prochaines sections. La pathogénie de l'infection chez le porc n'est pas très bien comprise.

2.10.1. Phase intestinale de l'infection

2.10.1.1 Ingestion de *Salmonella*

La transmission de *Salmonella* se fait majoritairement par la voie féco-orale même si la voie respiratoire est aussi acceptée comme une des portes d'entrée pour l'infection chez le porc (68, 182). Un des premiers mécanismes de défense de l'hôte est la production de peptides antimicrobiens (PAM). Parmi les PAM, on retrouve les

bêta-défensines 1 des cellules épithéliales porcines (pBD-1) qui s'expriment au niveau du dos de la langue à des concentrations antimicrobiennes. Ces bêta-défensines participent à la barrière de protection pour le dos de la langue et l'épithélium oral (215). Les salmonelles qui échappent à cette barrière peuvent coloniser les amygdales. Lors de l'ingestion, *S. Typhimurium* entre par les cryptes des amygdales du palais mou et persiste dans les cryptes et sur les couches superficielles de l'épithélium chez les porcs (68, 116, 257). Aucune information détaillée n'est disponible sur l'interaction de *Salmonella* avec les amygdales. Cependant, on sait que des isolats non invasifs peuvent coloniser les amygdales porcines (30) et que SPI-1 n'est pas impliqué dans la colonisation des amygdales chez le porc (30).

Après l'ingestion, *Salmonella* rencontre le milieu acide de l'estomac, un mécanisme de défense de l'hôte ; celui-ci permet de réduire le nombre de bactéries (86). La réponse au stress acide par *Salmonella* augmente sa résistance au pH bas. *Salmonella* s'adapte pour survivre à l'environnement acide en produisant certaines protéines (21). Deux systèmes de tolérance à l'acide sont décrits : le premier est un système transitoire induit par le régulateur ferrique Fur, présent pendant la phase de croissance des bactéries et qui fournit une tolérance modérée à l'acide (137). Le second système de tolérance à l'acide est plus performant et dépend du facteur alternatif sigma S codé par le gène *rpoS* (137).

Les travaux de Lee et coll ont démontré une relation entre le système de transition de résistance à l'acide et celui de soutien (137). Un pH bas génère des

signaux et les bactéries changent la synthèse de sigma S et perturbent le métabolisme du fer d'une certaine façon. À ce moment, il y a initiation de l'induction des protéines sigma S-dépendantes et Fur-dépendantes reliées à l'acidité. De plus, des protéines sigma S-indépendantes et Fur-indépendantes sont induites ; celles-ci vont collaborer avec les protéines dépendantes. AtrB serait la liaison entre les deux systèmes de tolérance à l'acide. Quand sigma S est abondant, *atrB* est réprimée. Quand sigma S est réprimé, *atrB* est induit et ses produits deviennent disponibles pour la participation de la réponse à l'acidité de Fur-dépendant (137). De plus, PhoP et OmpR sont des régulateurs qui répondent à la variation du pH. Un nombre indéterminé de *Salmonella* vont ainsi survivre au passage de l'estomac et passer dans le petit intestin.

2.10.1.2 Colonisation et adhésion au tractus intestinal inférieur

Les bactéries survivantes atteignent le petit intestin. *S. Typhimurium* possède des flagelles péritriches lui permettant d'avancer et de culbuter. Les flagelles sont des structures hélicoïdales de surface faisant une rotation à partir de la liaison avec la membrane.

La première étape dans la pathogénie de *Salmonella* chez le porc est l'adhésion à la muqueuse intestinale dans les parties distales de l'intestin (27). Des molécules appelées adhésines sont impliquées dans l'adhérence. Les adhésines sont des structures de surface bactériennes adhésives qui permettent à la bactérie de cibler

et de coloniser les tissus de l'hôte par la reconnaissance d'un récepteur spécifique. *S. Typhimurium* possède différentes adhésines putatives (jusqu'à maintenant, 12 opérons fimbriaires ont été identifiés) comme par exemple les fimbriae de type 1 (codés par les gènes *fim*), les fimbriae polaires longs (gènes *lpf*) et les fimbriae agrégants minces (*curli*, présent sur les gènes *agf*) qui sont situés sur le chromosome et les fimbriae présents sur le plasmide de virulence (gènes *pef*) (15, 156).

Cependant, les fimbriae de type 1 sont les seuls dont la contribution à l'attachement aux entérocytes et à la colonisation de l'intestin a pu être démontré chez le porc (5). Une étude récente a identifié, par *signature-tagged mutagenesis* (STM), des fimbriae atypiques putatives de *Salmonella* (gènes *saf*) qui semblent jouer un rôle dans la colonisation de l'intestin chez le porc (37). L'opéron *safABCD* est situé au centisome 7 de l'îlot génomique (SGI) chez les *Salmonella enterica* (77), connu aussi comme étant l'îlot de pathogénicité 6 chez *S. Typhi*. Dans l'étude de Carnell et coll (37), le mutant *safA* est atténué dans leur modèle porcin, mais pas dans celui du veau ou de la volaille et *safA* n'est pas requis pour la virulence de *S. Typhimurium* chez la souris (76, 167). La bactérie pourrait exprimer différentes adhésines selon l'hôte. Cependant, aucune différence significative dans la réduction du niveau ou de la durée de l'excrétion fécale avec le mutant *safA* n'a pu être démontrée (37).

Le petit intestin contient des composés bactéricides et des mécanismes pour se défendre tel que les sels biliaires, le mucus intestinal, les lysozymes, les lactoferrines,

le péristaltisme intestinal, les acides organiques et les défensines (27, 143). La concentration en acides biliaires est particulièrement importante dans la partie proximale du petit intestin, ces acides biliaires inhibent l'invasion de *Salmonella* dans les cellules épithéliales (181). La quantité de protéines sécrétées et encodées par des gènes sur SPI-1 est diminuée, rendant moins efficace le SST3 et donc l'invasion des cellules épithéliales (181). Cette concentration importante en acides biliaires pourrait expliquer la préférence de *Salmonella* pour coloniser la partie plus inférieure de l'intestin, c'est-à-dire, l'iléum, le caecum et le colon (27). Veldhuizen et coll (245) ont démontré la présence de deux défensines, pBD-1 et pBD-2, dans l'intestin des porcs. L'expression maximale de ces défensines se trouve à l'extérieur de l'intestin, sur la langue (pBD-1) et dans les reins et le foie (pBD-2). Néanmoins, la défensine pBD-2 a une activité antimicrobienne contre *S. Typhimurium* dans l'intestin des porcs (244). De plus, la flore normale de l'intestin diminue la colonisation de *Salmonella*, ce mécanisme se nomme interférence bactérienne (16). Les bactéries de la flore normale possèdent des mécanismes qui empêchent la colonisation des bactéries pathogènes tels que la production de substances inhibitrices, la compétition pour les sites d'adhésion et la limitation des nutriments.

Une couche de mucus recouvre les surfaces mucoales et est formée par des glycoprotéines de mucus ou de la mucine (216). Cette couche est une des premières barrières que les pathogènes rencontrent dans l'hôte. Le mucus intestinal sert de site initial pour une première adhérence des bactéries. Les cellules caliciformes sont des cellules épithéliales cylindriques qui synthétisent et sécrètent le mucus. Les entérocytes sont les cellules environnantes et sont responsables de l'absorption. Cette

adhésion, entre les entérocytes et les bactéries, est principalement un processus physicochimique basé sur des interactions non-spécifiques (les interactions de van der Waals et de Coulombic) (107, 242). Ce type d'adhésion peut être réversible ou non. Les propriétés de surface de certaines bactéries peuvent influencer les interactions non-spécifiques avec les cellules de l'hôte. La stratégie principale utilisée par *Salmonella* pour échapper à l'environnement de compétition dans l'intestin est de traverser la muqueuse intestinale.

L'initiation de l'infection par *Salmonella* débute au niveau des surfaces mucosales et une réponse humorale mucoale est déclenchée. L'immunoglobuline la plus souvent rencontrée dans ces régions est l'IgA, mais des IgG et/ou des IgM peuvent être présentes. Les IgA sont présents dans la bile et les sécrétions mucosales.

2.10.1.3 Invasion des cellules épithéliales de l'hôte

Suite à l'adhésion aux cellules épithéliales, *Salmonella* passe de la lumière intestinale au système lymphoïde. Le système lymphoïde du tube digestif (GALT : *gut-associated lymphoid tissue*) consiste en un ensemble comprenant les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés, l'appendice et les nœuds lymphatiques mésentériques. Les plaques de Peyer sont un agrégat de follicules lymphoïdes sous-épithéliaux qui sont présents surtout au niveau de l'iléum. La partie dominante des plaques de Peyer dans la lumière intestinale consiste en un épithélium associé folliculaire (FAE : *follicle-associated epithelium*) spécialisé dans l'assimilation des antigènes et des microbes dans la lumière intestinale. Cet épithélium possède des

caractéristiques différentes de l'épithélium des villosités iléales permettant un passage facilité aux bactéries : une faible production de mucus, la faible présence ou l'absence de cellules à gobelet, une faible concentration d'IgA et une bordure en brosse irrégulière (revu par Kraehenbuhl et Neutra (130)). *Salmonella* interagit avec les cellules M pour faciliter la colonisation de l'hôte pendant la macropinocytose, une forme d'endocytose, par un mécanisme d'ondulation de la membrane. *Salmonella* peut envahir l'épithélium intestinal par les entérocytes, les cellules M et les cellules à gobelet chez le porc (207) et leur colonisation permet le développement de la maladie locale ou systémique. *S. Typhimurium* peut se trouver dans les entérocytes porcins et les nœuds lymphatiques mésentériques deux heures après une inoculation orale (188).

L'invasion de l'épithélium semble être essentielle pour la virulence de *Salmonella*. *S. Typhimurium* possède différents mécanismes pour pénétrer dans les cellules. Les gènes de virulence présents sur SPI-1 sont impliqués dans l'étape de l'invasion et ces gènes sont cruciaux pour la colonisation de l'intestin et du GALT (30). Un groupe de chercheurs ont identifié des gènes de virulence potentiels, incluant des gènes présents sur SPI-2, qui pourraient être impliqués dans la colonisation de l'épithélium de l'intestin du porc, en utilisant la méthode STM (37).

Le mécanisme majeur pour l'invasion intestinale est codé par des gènes rassemblés sur SPI-1 (163). Les gènes de SPI-1 permettent à *Salmonella* d'entrer par macropinocytose et ainsi envahir les cellules épithéliales. SPI-1 code pour un système de sécrétion qui exporte des protéines en réponse au contact bactérien avec les cellules épithéliales (87). Il s'agit en fait d'un SST3 et c'est un facteur de virulence

des plus sophistiqué. Les gènes situés sur SPI-1 sont divisés en trois catégories : ceux codant des protéines de régulation, ceux impliqués dans la formation du SST3 et ceux codant des protéines sécrétées directement dans la cellule de l'hôte, les effecteurs (16). D'autres effecteurs sont aussi sécrétés par le SST3 de SPI-1, mais les gènes les encodant ne sont pas localisés dans le SPI-1, tel que des gènes situés dans SPI-5 et le gène *sopE* qui est transporté par un prophage de *S. Typhimurium*. Ce phage est situé dans la région intergénique *smpB-nrdE* sur le chromosome de *S. Typhimurium*.

Le cytosquelette des cellules eucaryotes se compose de trois filaments : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Le réseau d'actine sert à changer la structure des cellules dans leurs activités, incluant la dispersion des cellules, la locomotion, l'ondulation de la membrane, la phagocytose et la division cellulaire (196). Les cellules des mammifères modulent leur structure d'actine selon la réponse à un stimulus externe. Plusieurs bactéries pathogènes développent des stratégies pour détendre les réarrangements du réseau d'actine de l'hôte qui résulte en la formation de pseudopodes qui engouffrent la bactérie. En manipulant l'actine, ces pathogènes peuvent bloquer ou induire la phagocytose et exploiter la cellule hôte dans une autre voie. Dans plusieurs cas, cette capacité est essentielle pour la virulence. Les bactéries manipulent surtout les filaments d'actine et rarement les microtubules et les filaments intermédiaires (196). Le Cdc42 est impliqué dans l'induction du réarrangement de l'actine par *Salmonella* (41). On appelle ce phénomène chez *Salmonella* l'ondulation de la membrane (*membrane ruffling*). La bactérie entre alors dans une vésicule qui se déplace vers la base de la cellule et la cellule hôte retrouve son apparence normale.

Plusieurs protéines effectrices sécrétées par le SST3 du SPI-1 permettent l'entrée des *Salmonella* dans les cellules non-phagocytaires. Ces effecteurs, inclus SopE, SopE2 et SopB, activent les GTPases, Cdc42 et Rac1 de la famille Rho et provoquent le réarrangement du cytosquelette ; SipA et SipC se lient à l'actine et modulent pour aider la réorganisation du cytosquelette et SptP renverse l'activation de Cdc42 et Rac1 causé par SopE, SopE2 et SopB. La morphologie de la cellule épithéliale est reconstituée par SptP en codant une phosphatase tyrosine, une enzyme mimant les signaux de transduction des enzymes des cellules de l'hôte tel que revu par Libby et coll (143). De plus, SPI-1 contient un ensemble de gènes, appelés les gènes *inv*, responsables du phénomène de l'ondulation de la membrane associé à l'invasion des cellules par *S. Typhimurium*. Le locus *inv* est constitué d'au moins 14 gènes contigus (*invA* à *invO*, mais pas *invB*) qui sont présents à 59 min du chromosome de *S. Typhimurium*. SPI-4 joue un rôle dans l'invasion (3) et SPI-5 est requis pour la maladie entérique mais non pour la systémique (260).

2.10.1.4. Le mécanisme de la diarrhée

Les outils disponibles par *Salmonella* pour induire la diarrhée sont multiples, mais la plupart des infections chez le porc par *S. Typhimurium* sont asymptomatiques et sous-cliniques. Des facteurs comme la pression d'infection (c'est la résultante de la quantité de bactéries présentes dans l'environnement des animaux et de leur virulence (153)), l'âge, le statut immunologique et la présence de SPI-1 peuvent jouer un rôle dans le déclenchement de l'infection. On dénombre trois protéines effectrices encodées par des gènes de SPI-1 qui peuvent réprimer à la baisse la transcription du

nuclear factor kappaB (NF-κB) et subséquemment, la réponse inflammatoire de l'hôte : AvrA, une cystéine protéase inhibe la production de cytokines proinflammatoires (47) ; SspH1, un membre de la famille des protéines effectrices du SST3 montrant des motifs répétés riches en leucine et appelé *Salmonella translocated effectors* (STE) (162) et une autre STE, SptP, une protéine qui renverse les effets de SPI-1 concernant l'invasion (106). Même si ces gènes sont considérés comme étant des protéines anti-virulence, une réponse inflammatoire peu importante peut permettre à *Salmonella* de passer inaperçu. NF-κB est altéré dans les nœuds lymphatiques des porcs inoculés avec *S. Typhimurium* (251).

La plupart des études concernant le mécanisme de la diarrhée impliquée lors d'infections à *S. Typhimurium* sont surtout réalisées chez les veaux ou les souris. L'invasion des cellules M, des entérocytes et aussi des cellules à gobelet (207) stimule une réponse inflammatoire caractérisée par une présence importante de leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et l'induction de plusieurs cytokines dans l'intestin du porc par le SST3 de SPI-1 (222, 240, 249). Une réponse pro-inflammatoire est attribuée à l'action de SopE, SopE2 et SopB qui activent Cdc42 et Rac1 GTPases permettant de stimuler la voie de la MAP kinase Erk, p38 et Jnk tel que revu par Galan (80). La production d'IL-8 à la bordure basolatérale et l'effet chémoattractif du pathogène à la bordure apicale amène une migration de PMNs des vaisseaux sanguins à la lamina propria et aussi dans la lumière intestinale. L'IL-8 est la cytokine la plus étudiée et elle semble être la plus importante. L'infection des cellules épithéliales porcines (249) et des macrophages porcins avec *S. Typhimurium* augmente la sécrétion d'IL-8 par ces cellules (28, 249). Les IL-8 sont relâchées de la

partie basolatérale des cellules épithéliales infectées et ont une fonction importante dans l'initiation des neutrophiles de la circulation à la région sous-épithéliale (157). Le SST3 de SPI-1 et l'effecteur SipA sont des éléments cruciaux dans le recrutement des PMNs vers la lumière intestinale (30). En plus des effecteurs de SPI-1 qui attirent les PMNs, d'autres mécanismes sont induits par les salmonelles amenant une entérite ou de la diarrhée, mais il n'y a rien de confirmé chez le porc quant à cette étape de la pathogénie.

La contribution des toxines dans la diarrhée sécrétoire causée par *Salmonella* n'a jamais été clairement confirmée, mais plusieurs activités toxiques ont été décrites chez *Salmonella*. Aucune toxine n'a été purifiée ou démontrée pour induire l'entérite et la diarrhée dans des infections naturelles (143).

L'hôte montre une réponse inflammatoire au site de l'invasion des *Salmonella* et cette bactérie exprime des gènes impliqués contre l'inflammation peu de temps après l'entrée de celle-ci dans l'épithélium. L'expression de ces gènes semble être médiée par PhoPQ, un système de régulation à deux composantes qui change l'expression des gènes en réponse aux changements de concentration externe du Mg^{2+} , du Ca^{2+} et du pH (246). Les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} stabilisent la membrane externe en neutralisant les charges négatives du groupe phosphate et en s'attachant aux molécules adjacentes aux lipopolysaccharides (LPS). La vacuole intracellulaire dans laquelle se trouve *Salmonella* contient une faible concentration de Mg^{2+} et Ca^{2+} . Dans cet environnement, PhoPQ active *pmrAB*, deux gènes codant pour un deuxième système de régulation à deux composantes (100). L'activation de PmrAB change la

conformation des LPS. Ce changement structural dans les LPS augmente la résistance à une protéine antibactérienne cationique (BPI : *bactericidal/permeability increasing*), qui est relâchée par les PMNs humains lors de l'inflammation (108). De plus, en réponse aux faibles concentrations de Mg^{2+} et Ca^{2+} , PhoPQ active un autre système d'expression indépendant, *pmrAB*, qui augmente la résistance des bactéries aux défensines relâchées par les PMNs recrutés et les crypdines produites par les cellules de Paneth qui sont localisées dans les cryptes intestinales (100). Si l'infection ne progresse pas en salmonellose, la bactérie demeurera dans le tractus gastro-intestinal comme un habitant de la flore commensale et il y aura excrétion dans les fèces. Les cellules mucoales sont endommagées pendant le processus et des plaques fibronécrotiques sont formées. Par contre, lors de septicémie, on n'observe pas de dommage à l'épithélium intestinal.

Les PMNs sont une ligne de défense contre les infections à *Salmonella* dans l'intestin (27). Une inefficacité des PMNs est une opportunité pour le pathogène de coloniser et/ou de se répliquer et d'établir un état de porteur ou une infection sous-clinique chez les porcs (224). La présence de nombreux neutrophiles dans la lumière intestinale permet à l'hôte de se défendre contre *Salmonella* (79). Par contre les neutrophiles induisent des dommages pouvant causer des lésions associées aux infections à *Salmonella* (238).

Les jonctions serrées entre les cellules peuvent se défaire et permettent aux bactéries d'atteindre les récepteurs *Toll-like* (TLRs) sur la bordure basolatérale des entérocytes produisant une augmentation de la production de cytokines pro-

inflammatoires (143). Une inflammation plus importante peut survenir quand les salmonelles sont tuées dans la lamina propria. L'invasion des cellules M et des entérocytes et l'inflammation font en sorte que les bactéries ont le loisir d'envahir les tissus de la sous-muqueuse. Les PMNs causent des dommages en se déplaçant entre les cellules et en relâchant des réactifs d'oxygène intermédiaires.

Dans la lamina propria, les salmonelles stimulent une réponse inflammatoire et sont exposées à un grand nombre de cellules phagocytaires, incluant les neutrophiles et les macrophages associés au GALT. L'ingestion de *Salmonella* par les cellules phagocytaires permet de tuer beaucoup de bactéries envahissantes, mais quelques-unes peuvent survivre. Des macrophages vont être tués rapidement par un processus médié par la caspase-1 permettant le relâchement des IL-13 et IL-18 (143). La mort cellulaire rapide dépend de SPI-1 et de SipB chez *Salmonella* (165, 241). Ce processus comporte des similarités avec l'apoptose et la nécrose. Les salmonelles présentes dans les cellules phagocytaires sont transportées dans le sang vers les noeuds lymphatiques et les organes où elles sont capables de survivre et de se multiplier permettant la colonisation extraintestinale des organes comme le foie et la rate (74). *Salmonella* est une bactérie intracellulaire facultative qui peut survivre pour une période prolongée dans les cellules phagocytaires. La mort retardée des macrophages est dépendante de gènes présents sur le SPI-2, encodant pour le SST3, et OmpR (165, 241).

2.10.2 Phase septicémique de l'infection

La phase septicémique de *S. Typhimurium* chez le porc n'est pas très bien documentée. Il est accepté que *Salmonella* puisse se disperser dans l'organisme en utilisant le système sanguin et le système lymphatique et infecter les organes internes. La colonisation des nœuds lymphatiques mésentériques, de la rate et du foie est le résultat de la réponse locale et systémique du système immunitaire (58). Les macrophages sont les cellules d'intérêt pour la dissémination des *Salmonella* vers les organes internes. Les bactéries se répliquent rapidement et causent la phase septicémique de l'infection en interférant avec les mécanismes antibactériens des macrophages et en induisant la mort cellulaire (118). Le système immunitaire du porc, diffère cependant de celui des autres mammifères. Chez les porcs, des salmonelles peuvent être présentes dans le foie et la rate peu de temps après une inoculation expérimentale ; il ne semble pas avoir de réplication et l'élimination des organes se produit quelques jours après l'inoculation (29). À ce moment, les bactéries sont retrouvées dans l'intestin et le GALT. Les macrophages ne seraient pas des cellules importantes en ce qui concerne la persistance à long terme.

L'îlot de pathogénicité 2 (SPI-2) est essentiel pour la survie de *S. Typhimurium* dans les macrophages murins et pour la dispersion septicémique dans les souris (42, 213, 252). Boyen et coll et Brumme et coll (31, 34) ont montré qu'une ou des mutations dans le SPI-2 résultent en une diminution de la virulence chez les porcs.

Les monocytes et les PMNs porcins interagissent avec *S. Typhimurium* par la phagocytose, la flambée oxydative et la mort intracellulaire (59). Les monocytes obtenus de différents porcs diffèrent beaucoup dans la production de réactifs libres d'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*) et dans leur habilité à tuer les bactéries. Une grande production de ROS ne coïncide pas nécessairement avec une augmentation de la mort intracellulaire.

Des cytotoxicités précoces et retardées ont été rapportées chez les macrophages alvéolaires porcins, seule la cytotoxicité précoce est dépendante de SPI-1 (28). Il a été montré que les gènes reliés à l'apoptose sont réprimés dans les nœuds lymphatiques mésentériques de porcs inoculés avec des *S. Typhimurium* dans les premiers stades de l'infection, indiquant une possible interférence avec le signalement de la mort cellulaire chez les porcs (251). La signification biologique de la mort cellulaire induite par *Salmonella* dans la pathogénie des infections de *Salmonella* chez les porcs n'est pas encore claire.

Le plasmide de virulence des *Salmonella* possède des gènes impliqués pour la maladie septicémique (180). Le locus *spv* code pour cinq gènes (*spvR* et *spvABCD*) qui affectent la croissance bactérienne pendant la phase septicémique de l'infection dans les macrophages chez la souris (98, 99). Environ 20 gènes du plasmide de virulence seraient impliqués dans la survie des bactéries dans les macrophages (63). Il a été déterminé récemment que *SpvB* déstabilise le cytosquelette du macrophage lors d'invasion (138, 229). *Salmonella* est résistant au complément et il peut croître avec peu d'inhibition dans du sérum contenant tous les constituants du complément. Une

protéine codée par le plasmide de virulence, Rck, est spécifiquement associée à la résistance au complément. Avec l'exception du premier gène, *spvR*, qui code pour un activateur positif de *spvABCD*, la fonction exacte des autres gènes n'est pas connue. Les gènes *spv* semblent être essentiels pour une étape qui a lieu tôt dans l'invasion et qui implique les cellules phagocytaires.

2.11 La résistance génétique chez le porc

La résistance génétique à la maladie septicémique causée par *S. Typhimurium* a beaucoup été étudiée chez la souris. Cette résistance est reliée à plusieurs facteurs dont le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (155). Lacey et coll (133) ont remarqué chez les porcs que certains phénotypes du CMH favorisent l'assimilation et la mort de *S. Typhimurium*.

La résistance naturelle associée aux protéines des macrophages (*Slc11a1* ; aussi appelé NRAMP1) est rapportée et jouerait un rôle dans le contrôle de la croissance de plusieurs pathogènes intracellulaires, dont *Salmonella* chez les souris (revu par Roy et Malo) (197). Chez les porcs, NRAMP1 est hautement exprimée dans les macrophages et les neutrophiles suivant une stimulation par le LPS (267) et cette protéine est significativement surexprimée dans les nœuds lymphatiques de porcs inoculés avec *S. Typhimurium* (240, 251).

2.12 Diagnostic de la salmonellose porcine

Le diagnostic de salmonellose est confirmé en bactériologie et par la présence de lésions histologiques. *Salmonella* étant distribuée à plusieurs endroits dans l'environnement, un simple isolement de la bactérie n'a pas de valeur diagnostique ; il faut aussi confirmer la présence de lésions appropriées (93). La culture bactérienne doit être utilisée pour identifier l'organisme et confirmer le diagnostic. La rate, le foie, les poumons, les nœuds lymphatiques et les reins sont des tissus où la culture se fait plus facilement que les intestins ou les fèces. Si des antimicrobiens ont été administrés à l'animal échantillonné, ceux-ci peuvent interférer avec le succès de la culture (210).

L'identification des animaux porteurs sous-cliniques est plus difficile. L'ensemencement d'échantillons fécaux, nasaux et d'amygdales de plusieurs animaux dans un milieu d'enrichissement peut être effectué. Ces milieux ont une composition qui favorisent les organismes de *Salmonella* et suppriment la croissance des bactéries compétitrices de la flore normale présentes dans les fèces (4).

La sérologie peut donner des indications sur le statut d'un troupeau, mais n'est pas assez sensible et spécifique pour déterminer le statut excréteur d'un individu (114). Les troupeaux infectés par *S. Typhimurium* peuvent avoir une proportion de séropositifs, mais plusieurs d'entre eux n'excréteront pas la bactérie (132). Les anticorps peuvent persister longtemps après l'isolement de salmonelles. Des

différences sont trouvées dans la détection d'anticorps selon les sérovars. Une infection par *S. Typhimurium* est facilement détectée par la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum (243).

2.13 Traitement de la salmonellose chez le porc

Le but du traitement lors d'une salmonellose septicémique ou entérique est de minimiser la sévérité des signes cliniques, de prévenir la dispersion de l'infection et de la maladie et la récurrence de la maladie dans le troupeau (93). Pendant la maladie clinique, les organismes habitent dans une niche intracellulaire de protection qui est inaccessible à plusieurs antimicrobiens. Les traitements oraux peuvent diminuer l'efficacité de la transmission et ont un effet prophylactique sur les salmonelles chez les porcs qui ne sont pas déjà affectés. Une combinaison d'antimicrobiens, basée sur l'antibiogramme, est indiquée dans le traitement de la salmonellose aiguë. L'antibioprophylaxie et l'antibiothérapie ne modifient pas la durée ou le niveau de l'excrétion fécale (154).

2.14 Les vaccins

La prévention de la salmonellose chez les porcs n'est pas toujours possible. Les porcs infectés par *S. Typhimurium* ne développent pas toujours la maladie ; une certaine proportion devient des porteurs asymptomatiques et un réservoir pour infecter leurs congénères ou les humains (20). De plus, les porcs porteurs

asymptomatiques sont difficiles à détecter, étant des excréteurs intermittents. Une des sources majeures d'infection chez les humains est les produits carnés du porc. En effet, des porcs asymptomatiques peuvent se mettre à excréter la bactérie quelques heures après un stress comme le transport vers l'abattoir (93). S'il y a un bris de l'intestin lors de l'éviscération, la viande peut être contaminée par *Salmonella* et infecter les humains. De plus, l'usage important d'antimicrobiens favorise l'émergence de la résistance à de multiples antimicrobiens. Ces problèmes ont incité la recherche de vaccins pour contrôler cette importante zoonose.

2.14.1 Les vaccins tués

L'utilisation de vaccins tués pour contrer *S. Typhimurium* résulte en la stimulation de l'immunité humorale et est sécuritaire pour les animaux. Ceux-ci offrent toutefois peu de protection à la suite d'un challenge important étant donné qu'ils stimulent peu l'immunité cellulaire nécessaire pour une protection efficace contre la salmonellose. Les vaccins tués ont une certaine efficacité car, des études ont montré que la dose pour causer les manifestations de la maladie doit être plus importante lors d'un challenge à la suite d'une vaccination (12, 255). Ces vaccins peuvent offrir une certaine protection contre la salmonellose septicémique lors de laquelle l'immunité humorale peut jouer un rôle (12, 255).

2.14.2 Les vaccins vivants modifiés

Les vaccins vivants modifiés qui stimulent l'immunité cellulaire sont les plus efficaces pour protéger contre la salmonellose chez les porcs (93) ; ils miment l'infection en exposant des antigènes à leur surface, lesquels l'animal pourra rencontrer lors d'une infection. Différents vaccins vivants modifiés pour prévenir les infections à *S. Typhimurium* chez les porcs ont été proposés. Les premiers vaccins qui ont été développés contre *S. Typhimurium* sont constitués d'une souche de *S. Typhimurium* possédant une mutation dans le gène *aroA*. Leur administration a résulté en une diminution de l'excrétion fécale et de la sévérité de la diarrhée, mais la durée de la protection n'est pas claire (148). Ces vaccins induiraient une réponse lymphocytaire et/ou humorale selon le type d'antigène évalué (149).

2.14.3 Les vaccins oraux

Un vaccin vivant modifié administré par voie orale serait le vaccin idéal contre les infections à *Salmonella* puisque ce type de vaccin induit une immunité à médiation cellulaire et des anticorps systémiques et mucosaux (93). Une étude a démontré que l'administration orale dans des microphères de bactéries tuées de *S. Enteritidis* chez des poulets produit une réponse systémique et locale (146). Une exposition à une souche vivante de *S. Typhimurium* possédant une mutation dans les gènes *cya/crp* chez des porcs a résulté en une protection chez ceux-ci, mais ces souches amènent une pyrexie post-infection (46). La vaccination avec une souche de *S. Typhimurium* présentant des mutations dans les gènes *gyrA*, *-cpxA-rpoB* prévient

les signes cliniques de salmonellose chez des porcs, diminuent la colonisation des organes internes et stimulent le développement d'une meilleure immunité spécifique (IgA) que le groupe placebo (195). Cependant, le groupe vacciné démontre une quantité significativement plus petite d'IgM dans le sérum, ce qui amènerait une réponse systémique déficiente avec ce type de vaccin.

Dans une autre étude, des porcs ont été immunisés avec un isolat de *S. Typhimurium* LT 9 vivant atténué par une double mutation (histidine-adénine). Le vaccin était administré oralement ou par la voie parentérale et orale. Les deux types de vaccination ont diminué significativement la colonisation dans l'intestin (223). Par contre, certains porcs vaccinés ont démontré de la fièvre et/ou de légers signes de diarrhée.

2.14.3.1 Les vaccins oraux de *S. Choleraesuis*

Au Québec, lors d'épisodes de salmonellose à *S. Typhimurium*, les vétérinaires utilisent un vaccin vivant atténué de *S. Choleraesuis*. Ce vaccin préviendrait les pneumonies, les diarrhées, les septicémies et la mortalité causées par les isolats de *S. Choleraesuis* et l'excrétion lors d'infection à *S. Typhimurium* (23, 124).

Le vaccin consiste en une souche vivante avirulente de *S. Choleraesuis* (mutation Δ cya Δ (crp-cdt)) (40). La vaccination de porcs avec ce vaccin est bénéfique pour la protection des porcs contre le développement d'une maladie clinique due à *S.*

Choleraesuis (131). Il a été démontré que la vaccination des animaux avec ce vaccin avant un challenge avec *S. Typhimurium* amène une diminution de la présence de la bactérie dans les nœuds lymphatiques mésentériques, suggérant que l'utilisation de ce vaccin peut prévenir la colonisation (140). Des observations faites par notre groupe de recherche démontrent que ce vaccin serait utile pour diminuer les signes cliniques associés à *S. Typhimurium*, mais serait moins utile pour l'excrétion de bactéries lors d'infections à *S. Typhimurium*.

2.15 Résumé de la problématique

S. Typhimurium cause une gastroentérite chez les humains (52). La salmonellose est une zoonose importante pour l'homme dont on rapporte 1.3 milliard de cas par année dans le monde (175). Chez les porcs, les infections à *Salmonella* amènent une perte économique importante et les porcs sont un réservoir de l'infection pour l'humain (20). Une haute proportion de porcs sains héberge la bactérie, celle-ci n'est pas considérée comme un habitant de la flore normale de l'intestin. Habituellement, les infections chez le porc par le sérovar *Typhimurium* sont associées avec une maladie entérique. Cependant, depuis quelques années, une augmentation des épisodes septicémiques causés par *S. Typhimurium* et associés à des signes cliniques sévères et de la mortalité sont observés (57, 141).

Les infections à *S. Typhimurium* sont un problème de taille pour l'industrie porcine et la santé publique. En effet, des souches de *S. Typhimurium* présentant des résistances multiples aux antimicrobiens et appartenant au LT 104 causent des

septicémies chez les porcs en engraissement. Les carcasses peuvent être contaminées parce que les bactéries persistent plusieurs jours dans les tissus des animaux atteints. Il faut donc contrôler l'infection au niveau du troupeau pour éviter que ces souches ne contaminent les viandes.

L'hypothèse à la base de ce projet est que des isolats de *S. Typhimurium* associés à des septicémies chez des porcs expriment un ou des facteurs de virulence qui sont absents chez des isolats de *S. Typhimurium* provenant de porcs sains.

Le but global des études qui constituent cette thèse est de caractériser des isolats de *S. Typhimurium* associés à des porcs septicémiques et de les comparer avec des isolats provenant de porcs sains en utilisant des méthodes phénotypiques et génotypiques. Il est important de mieux caractériser ces isolats pour comprendre la pathogénie de l'infection et développer des mesures de contrôle appropriées.

CHAPITRE 3. ARTICLE 1

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

Manuscrit sous presse pour la revue

The Canadian Journal of Veterinary Research, Janvier 2010

Responsabilités des coauteurs dans cet article

Dans ce premier article, au niveau technique, j'ai participé à la réalisation des antibiogrammes avec l'aide de la technicienne de laboratoire. J'ai entièrement fait les manipulations pour le PFGE avec l'aide de l'agente de recherche. J'ai effectué l'analyse des données dans le programme Bionumerics. Pour l'analyse des protéines avec le SDS-PAGE et l'immunobuvardage, mon collègue Jonathan Corriveau avait réalisé une grande partie des manipulations et écrit une partie de l'article. Par la suite, j'ai fait la compilation et contribué à l'analyse des données avec le statisticien. J'ai analysé et interprété les données et écrit en majeure partie l'article.

Les Drs Letellier, Daigle et Quessy ont collaboré à la planification de l'étude, à l'élaboration des protocoles, aux conseils techniques, à l'interprétation des résultats et à l'écriture de l'article.

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

Nadia Bergeron, Jonathan Corriveau, Ann Letellier, France Daigle, Sylvain Quessy

Chaire de recherche en salubrité des viandes (CRSV), Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec (Bergeron, Corriveau, Letellier, Quessy); Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec (Daigle).

Address all correspondence to Dr. Sylvain Quessy; telephone: (450) 773-8521 ext. 8398; fax: (450) 778-8157.

Dr. Quessy's current address is Faculty de médecine vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6.

This paper is part of a PhD thesis by Nadia Bergeron.

Keywords : *Salmonella* Typhimurium; swine; septicemia; characterization.

Abstract

Salmonella Typhimurium is frequently isolated from pigs and may also cause enteric disease in human. In this study, 33 isolates of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine (CS) were compared to 33 isolates recovered from healthy animals at slaughter (WCS). The isolates were characterized using phenotyping and genotyping methods. For each isolate, the phage type, antimicrobial resistance, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) DNA profiles were determined. In addition, the protein profiles of each isolate grown in different conditions were studied by Coomassie Blue-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot. Various phage types were identified. The phage type PT 104 represented 36.4% of all isolates from septicemic pigs. Resistance to as many as 12 antimicrobial agents, including some natural resistances, was found in isolates from CS and WCS. Many genetic profiles were identified among the PT 104 phage types. Although it was not possible to associate one particular protein with septicemic isolates, several highly immunogenic proteins, present in all virulent isolates and in most isolates from clinically healthy animals, were identified. These results indicated that strains associated with septicemia belong to various genetic lineages that can also be recovered from asymptomatic animals at the time of slaughter.

Résumé

Salmonella Typhimurium est souvent isolée de porcs et peut causer une gastro-entérite chez l'humain. Dans cette étude, des isolats provenant de porcs septicémiques (ASC) ($n = 33$) ont été comparés à des isolats provenant de porcs sains à l'abattoir (SSC) ($n = 33$). Ces isolats ont été caractérisés par des méthodes phénotypiques et génotypiques. Le type phagique, le profil d'antibiorésistance et l'analyse des profils d'ADN en gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ont été déterminés pour chacun des isolats. Le profil des protéines pour chacun des isolats, cultivés dans différentes conditions de croissance, a aussi été déterminé par la méthode Coomassie Blue-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) et l'immunogénicité des protéines a été évaluée par immunobuvardage. Différents types phagiques ont été identifiés parmi les isolats. Chez les souches provenant de porcs septicémiques, le type phagique PT 104 représentait 36,4% des isolats. Les isolats pouvaient être résistants à 12 antimicrobiens, si l'on considère aussi les résistances naturelles, autant chez les souches ASC que celles appartenant au groupe SSC. Parmi les souches PT 104, plusieurs groupes génétiques ont été identifiés. Il n'a toutefois pas été possible d'identifier une protéine en particulier chez le groupe d'isolats provenant de porcs septicémiques. Il a été possible d'identifier des protéines immunogènes chez tous les isolats virulents et chez la majorité des isolats provenant de porcs sains. Ces résultats indiquent que les souches associées aux porcs septicémiques proviennent de lignées génétiques variées dont certaines peuvent être aussi retrouvées chez les porcs asymptomatiques au moment de l'abattage.

Introduction

Salmonella is an important problem in both humans and animals worldwide. More than 2500 serotypes have been isolated in the *Salmonella* genus: most are potential human pathogens, but only a few serotypes have been regularly associated with human infections. *Salmonella* cause diseases in humans ranging from a mild gastroenteritis to a systemic disease that can result in death. *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium are quantitatively the most important causative agents in human foodborne illnesses. For the serovar Typhimurium alone, more than 200 definitive phage types have been identified. The phage type PT 104 causes particular concerns because of its increasing prevalence and the presence of resistance genes to many antimicrobial agents (1).

Although most animals may carry the bacterium without exhibiting clinical signs, in pigs, *Salmonella* are associated with diseases and economic losses. Swine may represent a reservoir for human infection (2). The infection of pigs with the serovar Choleraesuis is usually associated with septicemic disease, whereas infection with the serovar Typhimurium is associated with enteric disease. However, septicemic episodes of *S. Typhimurium*, associated with severe clinical signs and sudden death, have been observed (3,4). In these animals, the serovar Typhimurium can be isolated from multiple organs; however, at slaughter, *S. Typhimurium* is one of the most frequently isolated serovar in apparently healthy pigs (5).

Infections caused by septicemic strains of *S. Typhimurium* can be associated with significant mortality in finishing pigs. Since previous studies showed persistence of strains in various tissues for many days following infection, the presence of these strains in finishing animals also represents a food safety concern (6). Thus, it is important to better characterize these isolates in order to understand the pathogenesis of infection and develop appropriate control measures. Asymptomatic animals may, following a stress period, begin to shed the bacteria and contaminate other animals during transportation and in the lairing pen at the slaughterhouse. During evisceration procedures, direct or cross-contamination of meat may result in human foodborne infections.

Studies on the diversity of salmonellae indicate that generally *Salmonella* species have low genetic diversity. To date, various phenotypic methods have been used to characterize this bacterium, including phage typing, biotyping, and antimicrobial resistance profiling (7,8). Genotyping methods such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (8,9), amplified-fragment length polymorphism (AFLP) (10), plasmid profiling (7-9), IS200 restriction fragment length polymorphism (RFLP) (11), and ribotyping (9) were also used. The current “gold standard” method of choice for molecular typing of *Salmonella* is PFGE (12).

Some phage types of *S. Typhimurium*, such as PT 104, are known to harbor genes encoding resistance to many antimicrobial agents. Multidrug-resistant PT 104 is an important human and animal pathogen that is widespread in western and eastern Europe, North America, and the Middle East (13). For instance, PT 104 are very

often found to be resistant to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides, and tetracycline (R-Type AmpChlStrSulTet) (1,8,13,14). Multiple resistance to antimicrobial agents is an important concern for human health.

The aim of this study was to compare, using phenotypic and genotypic methods, isolates of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine and isolates recovered from apparently clinically healthy pigs at slaughter.

Materials and methods

Bacterial isolates

Salmonella isolates ($n = 33$) recovered from extra-intestinal organs and/or feces of dead pigs (CS; clinical signs) (with diagnosis of salmonellosis) and submitted for necropsy were obtained from Dr. S. Messier (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec). Isolates ($n = 33$) from healthy pigs (WCS; without clinical signs) were collected at slaughter from animals with no macroscopic lesions (5). Unless otherwise noted, bacterial cultures were carried out at 37°C in Luria-Bertani (LB) Muller Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) or on LB containing 1.5% (w/v) agar. Isolates were stored at -70°C in LB supplemented with 35% (v/v) glycerol.

Serotyping and phage typing

Isolates were serotyped and phage typed at the Laboratoire d'Épidémiologie Animale du Québec (LEAQ) in Saint-Hyacinthe, Québec or at the Laboratory for Foodborne Zoonoses, Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario.

Antimicrobial resistance

Resistance of all isolates to various antimicrobial agents was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method following criteria established by the Clinical

and Laboratory Standards Institute's (CLSI) guidelines (15). The range of antimicrobial agents tested covers many classes of antibiotics: amikacin (30 µg/disk) (Amk), amoxicillin-clavulanic acid (20/10 µg/disk) (Amc), ampicillin (10 µg/disk) (Amp), bacitracin (10 IU/disk) (Bac), cefoxitin (30 µg/disk) (Fox), ceftiofur (30 µg/disk) (Ctf), ceftriaxone (30 µg/disk) (Cro), cephalothin (30 µg/disk) (Cef), chloramphenicol (30 µg/disk) (Chl), ciprofloxacin (5 µg/disk) (Cip), clindamycin (2 µg/disk) (Cli), enrofloxacin (5 µg/disk) (Enr), erythromycin (15 µg/disk) (Ery), gentamicin (10 µg/disk) (Gen), kanamycin (30 µg/disk) (Kan), nalidixic acid (30 µg/disk) (Nal), neomycin (30 µg/disk) (Neo), quinupristin/dalfopristin (4.5/10.5 µg/disk) (Q/D), streptomycin (10 µg/disk) (Str), sulfisoxazole (250 µg/disk) (Sul), tetracycline (30 µg/disk) (Tet), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg/disk) (Sxt), and vancomycin (30 µg/disk) (Van). Results were interpreted according to the CLSI guidelines (15,16) or in accordance with the manufacturer's instructions. The diameter zone of apramycin (15 µg/disk) (Apr) was interpreted in accordance with Mathew et al (17). All the antimicrobial agents were purchased from Oxoid (Nepean, Ontario) except ceftriaxone and sulfisoxazole which were purchased from Becton Dickinson (BD-Canada, Oakville, Ontario). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as the standard reference strain. In this study, isolates with intermediate phenotype were grouped with susceptible isolates to prevent over-estimation of occurrence of resistance.

Growth conditions for protein production

The growth conditions known to encourage the *Salmonella* invasion process include anaerobiosis, high osmolarity, late-log-phase growth and neutral pH (18,19). Aerobic growth conditions for bacterial cultures were induced by vigorous agitation (200 rpm) of tubes. Anaerobic conditions were induced 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 served to confirm the establishment of an anaerobic environment. The effect of high osmolarity (0.3 M NaCl) was assessed by the use of LB or nutrient broth (NB) (Difco Laboratories) supplemented with NaCl. The effect of iron was tested by supplementing NB with 40 μ M FeSO₄ (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario) and depleting iron with 100 μ M 2,2'-dipyridyl (Sigma). To analyze the effect of pH, strains were grown in NB buffered with 0.1 M MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid] (Sigma) at pH of 5.0 or 6.5.

SDS-PAGE

LB agar plates were first inoculated with bacteria stored in frozen glycerol and incubated at 37°C overnight. A 50-mL sample of one of the media described herein was inoculated with single colonies and incubated for 20 h at 37°C. Optical density (OD) of ~0.6 at 600 nm was obtained. The bacterial suspensions were centrifuged and resuspended in PBS and sonicated twice, for 2 min each time, on ice (Sonic Material, Danbury, Connecticut, USA). The suspension was centrifuged again for 20

min at 4°C. Proteins present in the supernatant were harvested, mixed with an equal volume of buffer to insure solubility, boiled 5 min and separated by SDS-PAGE standard technique in 12.5% polyacrylamide vertical slab gel with 4.5% stacking gel. Gels were stained with Coomassie brilliant blue stain (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario).

Production of antisera

Pigs ($n = 5$) were injected intramuscularly once a week for 6 wk with 1 mL of a formalin-killed (0.5% v/v, 18 h) suspension of 10^9 CFU/mL of a field isolate serovar Typhimurium PT 104 (obtained from a septicemic pig) and grown overnight in NB. Pigs were euthanized 1 wk later and blood was 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, proteins were transferred to the nitrocellulose membrane (Bio-Rad) by electroblotting in a transblot apparatus (Bio-Rad) with methanol-Tris-glycine buffer according to the standard technique. 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, Pennsylvania, USA) for 60 min at a dilution of 1:2000 in 2% (w/v) casein in Tris-NaCl. After repeated washings, the 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% H₂O₂ in Tris-NaCl. All manipulations and incubation periods were done at room temperature. Apparent molecular weights were calculated by comparison with standards of known molecular weight (Bio-Rad).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Genomic DNA was prepared in agarose gel plugs from an overnight bacterial culture on LB agar using a modified protocol (20). Briefly, bacterial cultures were resuspended to obtain an OD of 1.4 at 610 nm. Bacterial culture and Seakem Gold agarose 1.5% (Cambrex Corporate, East Rutherford, New Jersey, USA) were mixed in a mold to form plugs. The agarose plugs were incubated 2 h at 54°C in lysis solution and proteinase K (Quiagen, Mississauga, Ontario). Cell debris and any excess proteinase K were removed by washing twice with millipore water and 4 times with Tris-EDTA buffer. Genomic DNA was digested with restriction endonucleases, *SpeI* (recognition sequence ACTAGT) and *XbaI* (recognition sequence TCTAGA) (Invitrogen Canada, Burlington, Ontario).

The PFGE was performed using a CHEF DR II system (Bio-Rad) on a horizontal agarose gel electrophoresis in a 1% (w/v) SeaKem Gold agarose gel at 6 V/cm with 0.5x Tris-Borate electrophoresis buffer. Gels were stained with SYBR

Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) and photographed on a UV transilluminator. *Salmonella* Braenderup “Universal Marker” was used as the reference marker (21). The PFGE patterns obtained were analyzed by the Bionumerics Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) using algorithm for clustering and the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) tree-building approach with optimization of 2.0% and 4.0% and 3.5% for position tolerance for *Xba*I and *Spe*I, respectively. Visual inspection of the patterns was performed as a final validation step.

Statistical analysis

Computer software (SAS version 9.1; SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) was used to analyze the data. Univariate analysis using the exact chi-squared test examined the relationship between various categorical variables. The comparison was made between the isolates from septicemic pigs and those from healthy pigs. Another comparison was made between the isolates from phage type PT 104 and isolates from the group of other phage types. The statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Typing of isolates

Salmonella Typhimurium was the only serovar identified in this study out of the 33 isolates from CS. When isolates were phage typed, it was found that 36.4% (12/33) belonged to PT 104 whereas the others belonged to 11 different phage types. For the 33 isolates from WCS, the prevalence of strains belonging to PT 104 was 51.5% (17/33) while the second most prevalent type was PT 193 (8/33). No association was found between the origin of the isolates and the phage type PT 104 ($P = 0.32$). Only 3 isolates could not be phage typed.

Salmonella isolates were found in extra-intestinal organs or feces from pigs. Animals came from a total of 55 farms, 7 farms were sampled more than once. Among these 7 farms, isolates from both CS and WCS were found in 3 farms.

Antimicrobial susceptibility testing

In this study, 24 antimicrobial agents (AMA) were tested. Among those showing resistance, 5 AMA were considered as natural resistance (Bac, Cli, Ery, Q/D, Van). All isolates were resistant to up to 7 AMA among the 19 remaining AMA tested. Six isolates in both groups showed no resistance, but none of these were PT 104. Among all isolates, 19 different antimicrobial resistance profiles were identified. Twelve different profiles were observed in isolates from CS, 13 different profiles

were found in isolates from WCS while 6 profiles were common to both CS and WCS isolates. The most prevalent resistance profile (Amp, Chl, Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul) was found in both CS and WCS.

Among the *S. Typhimurium* PT 104 isolates from CS, 3 different profiles were observed, whereas among PT 104 isolates from WCS, 4 antimicrobial resistance profiles were found. Two profiles were common in PT 104 isolates from both CS and WCS. Among the 3 non-typable isolates 2 showed the same antimicrobial resistance profiles.

PT 104 isolates from CS were significantly more resistant to some AMA compared with other phage types from CS: Amp ($P = 0.0002$), Chl ($P < 0.0001$), Kan ($P = 0.009$), Neo ($P = 0.009$), Str ($P = 0.0008$), and Sul ($P = 0.01$). PT 104 isolates from WCS were also more resistant to some AMA versus other phage types: Amp ($P = 0.0003$), Chl ($P < 0.0001$), Kan ($P = 0.02$), and Str ($P = 0.002$). Other phage types were more resistant than PT 104 in WCS: Gen ($P = 0.02$).

Protein profiles by SDS-PAGE and western blotting

In order to reflect the various environmental conditions encountered by *Salmonella* during colonization and invasion of the host, different growth conditions were used to study the protein profiles of the 2 groups of isolates. For a given environmental growth condition, protein profiles of isolates associated with septicemia and those isolated from clinically healthy pigs were similar (data not

shown). It was not possible to relate any proteins to septicemic isolates; however, several different patterns were expressed when a given isolate was grown under different environmental conditions (data not shown). For instance, 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. In addition, few immunogenic proteins were found to be expressed in all growth conditions.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A total of 17 different PFGE profiles were found when *Xba*I was used. Twelve different profiles were observed for isolates from CS compared with 11 profiles for isolates from WCS. Six profiles were common among isolates from CS and WCS. Profile 1 was significantly more prevalent in isolates from CS compared with WCS ($P = 0.03$). A total of 19 different profiles were found with *Spe*I. Using *Spe*I, 11 different profiles were identified in isolates from CS, while 13 profiles were identified from isolates from WCS. Five profiles were common to isolates of both CS and WCS. Profile 20 was significantly more prevalent among isolates from WCS compared with CS ($P = 0.02$).

For *Xba*I, among the *S. Typhimurium* PT 104 isolates from CS, 7 different genotypes were observed, profile 2 being significantly more prevalent in PT 104 isolates compared with other phage types ($P < 0.0001$). Profile 1 was significantly more prevalent in isolates from other phage types compared with PT 104 ($P = 0.03$).

Profiles 2, 7, 16, and 17 for isolates from CS and profiles 2, 5, and 11 for isolates from WCS were found in PT 104 isolates only. The 3 non-typable isolates harboured different profiles for *Xba*I.

For *Spe*I, among the *S. Typhimurium* PT 104 isolates from CS, 8 different profiles were found; none more frequently than another. It was not possible to identify a major profile with *Spe*I in the group of PT 104 isolates and in the group of other phage types. Profiles 30 and 35 for isolates from CS and profiles 29, 30, and 34 for isolates from WCS were found in PT 104 isolates. Only 2 of the 3 isolates, which could not be typed, had the same *Spe*I profile. A summary of the results are presented in Tables I and II.

Discussion

In this study, PT 104 isolates were compared with all other phage types because of their antimicrobial resistance, recognition as foodborne pathogens, greater virulence, suggested clonal origin, and zoonotic potential (9,13,22). Phage type PT 104 was found to be the most prevalent phage type in characterized isolates. This agrees with other studies that reported similar results in Ontario, the United States, and France in isolates from apparently healthy animals (23-25). However, previous studies from Quebec and Spain indicated that PT 104 was the second phage in importance after PT 108 and PT 193, respectively (4,26).

Phage type PT 104 was found in 31.4% (11/35) of *S. Typhimurium* isolates from apparently healthy food-producing animals in Japan, as determined by the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring program (1999-2001) (27). It was found that the percentage of PT 104 isolates was lower in animals from WCS, as opposed to what was observed in our study. On the other hand, another similar study completed by the same group between 2002 and 2005 showed a significant decrease ($P < 0.01$) to 4.1 % (2/48) of the PT 104 *S. Typhimurium* isolates (28).

In the current study, PT 104 isolates were generally found to be more resistant to antimicrobial agents than other phage types but it was not possible to associate this phage type to pigs with CS. Many authors from various countries reported that most isolates of *S. Typhimurium* PT 104 are resistant to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides, and tetracycline (1,8,13,14,24,29,30) and that some

isolates are also kanamycin resistant. In our study, 89.7% (26/29) of PT 104 isolates possess the complete pentaresistance profile; among these isolates, 69.0% (20/29) showed additional resistance to kanamycin and neomycin. It has been described that the pentaresistance genes in PT 104 isolates are situated on the chromosome and located on integrons, and thus rarely horizontally transmissible (13,31-33). The origin of DNA containing the pentaresistance genes is unknown, previous studies proposing a possible clonal dissemination of the *S. Typhimurium* PT 104 in the population (9,22,30,31). Our antimicrobial resistance results suggested that other genetic lineages can be found in PT 104 isolates from swine in Canada, particularly in healthy animals.

Bacteria obtained from infected animals are routinely examined by SDS-PAGE and immunoblotting to search for the presence of putative virulence determinants. In our study, we had the opportunity to compare isolates from diseased animals to isolates from healthy animals. Although we made the assumption that isolates from healthy animals were less likely to express some virulence factors, we cannot rule out the possibility that some of the isolates from healthy animals were in fact isolates from animals that had recovered from disease. However, since the occurrence of outbreaks associated with *S. Typhimurium* is quite low in Quebec, it seemed reasonable to expect that isolates from healthy animals were less likely to be virulent. Nevertheless, although differences in protein profiles were observed when strains were grown in different environmental growth conditions, it was not possible to associate a particular protein to septicemic strains. On the other hand, we observed the expression of a ~33 kDa protein when isolates were grown under iron-limiting

conditions. Expression of a protein of a similar molecular weight, named SitA, under iron-limiting conditions was also reported by Zhou et al (34). These authors identified an iron transport system, encoded within the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) of *S. Typhimurium*. As observed in this study, the induction of *sit* gene expression was prevented by the addition of Fe^{2+} to the growth medium. Furthermore, Janakiraman and Schlauch (35) demonstrated that the putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *S. Typhimurium*. The fact that this protein was found in both types of isolates suggests that it may also be needed for colonization of pigs in sub-clinical infections.

Although no protein was associated with septicemic isolates, many proteins that are strongly recognized by swine antisera were found in both type of isolates in all growth conditions. In particular, a ~37 kDa protein was found to be present in all septicemic isolates and in most isolates from clinically healthy animals and might be considered for vaccine production given its high immunogenicity.

Among genotyping methods, PFGE is considered the reference method for DNA fingerprinting in *Salmonella* and other foodborne pathogens (12), and has been proposed as a system for differentiating epidemic strains from endemic ones (36). The use of PFGE (*Xba*I) is considered a good tool for the epidemiological typing of *S. Typhimurium* (37). If genetic variation does not significantly impact the size or electrophoretic mobility of a restriction fragment, then the change may not be identified as a separate pulsotype (8). By the use of 2 or more enzymes for PFGE analysis, the discriminatory power of the method may be enhanced for differentiating

Salmonella isolates (38). Some authors, however, have emphasized that *S. Typhimurium* has often been considered very clonal and PFGE may not have sufficient discriminatory power to differentiate the various phage types (39). In this study, PFGE was able to demonstrate genetic variability among *S. Typhimurium* isolates in general, while it was also instrumental in demonstrating that some genetic clusters were associated with isolates from diseased animals.

In this study, different procedures were used in order to differentiate *S. Typhimurium* isolates recovered from septicemic animals from those of healthy pigs. Overall, a poor correlation was observed between the various typing methods, as previously observed in other studies (8,9). Usually a multiple typing approach is used to increase the ability to differentiate strains, especially when trying to separate isolates that appear to have clonal distribution (8,9).

However, we demonstrated, using genetic typing methods, a very high genetic diversity in isolates from sick animals, suggesting that multiple genetic lineages might be responsible for clinical outbreaks in swine herds. Some genetic profiles, however, were found almost exclusively in diseased animals. In a recent study that compared genetic variability of both groups of isolates within the herds (40), a significantly higher difference of genetic diversity in strains from asymptomatic animals was also observed, suggesting that once a virulent strain is established within a herd, this genetic lineage may persist for a prolonged period. In addition, the fact that some genetic clusters can be found in both types of isolates can be explained by

transport up to the slaughter period and septicemic isolates following recovery from the disease.

Acknowledgments

This work was supported by NSERC. We would like to thank Dr. S. Messier and Dre N. Rheault for contributing strains. We thank Johanne Bisailon, Guillaume Gauthier-Larivière, Valérie Normand, and Stéphanie St-Jean for technical assistance. We thank Dr. Guy Beauchamp of the Université de Montréal for the statistical analysis.

References

1. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998;338:1333-1338.
2. Berends BR, Van Knapen F, Snijders JMA, Mossel DAA. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* 1997;36:199-206.
3. Desrosiers R. Les maladies en émergence chez le porc. *Méd Vét Québec* 1999;29:185-188.
4. Letellier A, Messier S, Paré J, Ménard J, Quessy S. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* 1999;67:299-306.
5. Letellier A, Messier S, Quessy S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J Food Prot* 1999;62:22-25.
6. Côté S, Letellier A, Lessard L, Quessy S. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* 2004;68:241-248.

7. Threlfall EJ, Frost JA. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: Laboratory aspects and epidemiological applications. *J Appl Bacteriol* 1990;68:5-16.
8. Foley SL, White DG, McDermott PF, et al. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol* 2006;44:3569-3577.
9. Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, et al. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J Clin Microbiol* 2002;40:4450-4456.
10. Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Kapperud G. A variation of the amplified-fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction endonucleases, and assessment of the enzyme combination *Bgl*III-*Mfe*I for AFLP analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 2000;189:19-24.
11. Baquar N, Threlfall EJ, Rowe B, Stanley J. Phage type 193 of *Salmonella* Typhimurium contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. *FEMS Microbiol Lett* 1994;115:291-295.

12. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382-389.
13. Humphrey T. *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 2001;67:173-186.
14. Gebreyes WA, Altier C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 2002;40:2813-2822.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. 2nd ed. [CLSI Document M31-A2] Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2002.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirteenth Informational Supplement. [CLSI Document M100-S13] Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2003.
17. Mathew AG, Saxton AM, Upchurch WG, Chattin SE. Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2770-2772.

18. Galan JE, Curtiss R, 3rd. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect Immun* 1990;58:1879-1885.
19. Lee CA, Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4304-4308.
20. Michaud S, Arbeit RD, Gaudreau C. Molecular strain typing of *Campylobacter jejuni* by pulsed-field gel electrophoresis in a single day. *Can J Microbiol* 2001;47:667-669.
21. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: Converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol* 2005;43:1045-1050.
22. Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup FM. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 2000;38:1581-1586.

23. Farzan A, Friendship RM, Dewey CE, Muckle AC, Gray JT, Funk J. Distribution of *Salmonella* serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Can J Vet Res* 2008;72:1-6.
24. Gebreyes WA, Altier C, Thakur S. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiol Infect* 2006;134:187-198.
25. Lailler R, Grimont F, Jones Y, Sanders P, Brisabois A. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathol Biol (Paris)* 2002;50:361-368.
26. García-Feliz C, Collazos JA, Carvajal A, et al. *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* 2007;54:294-300.
27. Esaki H, Morioka A, Kojima A, et al. Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (1999-2001). *Microbiol Immunol* 2004;48:553-556.
28. Kawagoe K, Mine H, Asai T, et al. Changes of multi-drug resistance pattern in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci* 2007;69:1211-1213.

29. Daly M, Buckley J, Power E, et al. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: Detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:614-619.
30. Ng LK, Mulvey MR, Martin I, Peters GA, Johnson W. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:3018-3021.
31. Ridley A, Threlfall EJ. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104. *Microb Drug Resist* 1998;4:113-118.
32. Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 1999;170:251-256.
33. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, Rowe B. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec* 1994;134:577.

34. Zhou D, Hardt WD, Galan JE. *Salmonella* Typhimurium encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* 1999;67:1974-1981.
35. Janakiraman A, Slauch JM. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 2000;35:1146-1155.
36. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-2239.
37. Doran G, Morris D, O'Hare C, et al. Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8236-8240.
38. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2314-2321.
39. Weill FX, Guesnier F, Guibert V, et al. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* 2006;44:700-708.

40. Perron GG, Quessy S, Letellier A, Bell G. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *Infect Genet Evol* 2007;7:223-228.

Table I. Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of *S. Typhimurium* PT 104 isolates from diseased and healthy pigs

| Antimicrobial profile | PFGE (<i>XbaI</i>) ^{abc} | PFGE (<i>SpeI</i>) ^{abc} |
|---|--|--|
| Amp, Chl, Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 5 ^{aa} 17 ^a 1 ^{ab} 2 ^{aaaabbbb} | 23 ^a 24 ^{aa} 25 ^a 35 ^a 18 ^{ab} 19 ^{abb} 30 ^{ab} 20 ^{bb} 22 ^b 26 ^b 27 ^b 29 ^{bb} 34 ^b |
| Amp, Chl, Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 7 ^a 16 ^a 2 ^{ab} 1 ^b 5 ^b | 19 ^a 21 ^a 23 ^a 18 ^b 20 ^b 27 ^b |
| Amp, Neo, Tet, Sxt, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 8 ^a | 23 ^a |
| Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 1 ^b | 18 ^b |
| Neo, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str | 11 ^b | 19 ^b |

^a Isolates with clinical signs (CS).

^b Isolates without clinical signs (WCS).

^c In this table, each number represents a distinct profile obtained by PFGE. Using *XbaI*, a total of 17 different profiles was found while with *SpeI*, a total of 19 different profiles were observed.

Table II. Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of *S. Typhimurium* isolates belonging to phage types other than PT 104 from diseased and healthy pigs

| Antimicrobial profile | PFGE (<i>Xba</i> I) ^{abc} | PFGE (<i>Spe</i> I) ^{abc} |
|---|---|--|
| Amp, Chl, Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 1 ^a 5 ^a 8 ^a 14 ^a 3 ^b 13 ^b | 18 ^a 25 ^a 28 ^a 24 ^{ab} 27 ^b |
| Bac, Cli, Ery, Q/D, Van | 1 ^{aaaa} 4 ^b 6 ^b | 18 ^a 21 ^{aa} 31 ^a 20 ^b 26 ^b |
| Apr, Gen, Tet, Sxt, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 3 ^a 10 ^a 1 ^{aab} | 21 ^{aa} 28 ^a 32 ^a 36 ^b |
| Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van | 1 ^{aa} 3 ^b 10 ^b | 18 ^{aab} 19 ^b |
| Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 15 ^a 4 ^b | 19 ^a 20 ^b |
| Amp, Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van | 1 ^a 12 ^a | 18 ^{aa} |
| Apr, Gen, Tet, Sxt, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 1 ^a | 23 ^a |
| Amp, Tet, Sxt, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 1 ^a | 18 ^a |
| Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str | 1 ^a | 18 ^a |
| Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 1 ^a | 18 ^a |
| Gen, Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 3 ^b 4 ^{bb} | 20 ^b 22 ^b 33 ^b |
| Apr, Gen, Neo, Tet, Sxt, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Sul | 1 ^{bb} | 18 ^b 25 ^b |
| Amp, Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 4 ^b | 22 ^b |

| | | |
|--|----------------|-----------------|
| Tet, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van, Str, Sul | 9 ^b | 26 ^b |
| Amp, Neo, Tet, Kan, Bac, Cli, Ery, Q/D, Van | 7 ^b | 22 ^b |

^a Isolates with clinical signs (CS).

^b Isolates without clinical signs (WCS).

^c In this table, each number represents a distinct profile obtained by PFGE. Using *Xba*I, a total of 17 different profiles was found while with *Spe*I, a total of 19 different profiles were observed.

CHAPITRE 4. ARTICLE 2

**Interaction between host cells and septicemic *Salmonella enterica*
serovar Typhimurium isolates from pigs**

Manuscrit publié dans la revue

Journal of Clinical Microbiology, 2009, vol. 47, no. 11, p. 3413-3419

Responsabilités des coauteurs dans cet article

Dans ce deuxième article, j'ai participé à la mise au point des protocoles pour la phagocytose, la survie dans les macrophages et l'apoptose avec l'aide technique de Louise Lessard. De plus, nous avons réalisé les manipulations et l'analyse des résultats ensemble. J'ai mis au point le protocole pour l'adhésion au mucus et fait les manipulations avec l'aide d'une agente de recherche. J'ai réalisé les manipulations pour l'affinité aux solvants avec l'aide d'un stagiaire. Jonathan Corriveau a mis en place les protocoles pour l'adhésion et l'invasion sur des cellules intestinales, il a fait la majorité des manipulations s'y rattachant et écrit une partie de l'article. J'ai compilé et participé à l'analyse des données avec le statisticien. J'ai analysé et interprété l'ensemble des données et écrit en majeure partie l'article.

Les Drs Letellier, Daigle et Quessy ont collaboré à la planification de l'étude, à l'élaboration des protocoles, aux conseils techniques, à l'interprétation des résultats et à l'écriture de l'article.

Interaction between host cells and septicemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pigs

Nadia Bergeron,¹ Jonathan Corriveau,¹ Ann Letellier,¹ France Daigle,² Louise Lessard,³ and Sylvain Quessy^{1*}

Department of Pathology and Microbiology, Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6¹; Department of Microbiology and Immunology, Medicine Faculty, Université de Montréal, C.P. 6128 Branch City Center, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7²; and Saint-Hyacinthe Laboratory, Canadian Food Inspection Agency, 3400 Boul. Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 8E3³

*Corresponding author. Mailing address: Department of Pathology and Microbiology, Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone : (450) 773-8521, ext. 8398. Fax: (450) 778-8157.

Abstract

Salmonella enterica serovar Typhimurium is an important pathogen in swine and is also a frequently reported zoonotic agent. The objective 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 pigs. We were particularly interested in comparing the two groups of isolates for their ability to adhere to and invade host cells, to be phagocytized and to survive in monocyte cells, to induce apoptosis, and to adhere to intestinal mucus. Their surface properties were also evaluated by interactions with solvents. The isolates recovered from diseased animals were shown to invade intestinal epithelial cell lines at a higher rate ($P = 0.003$) than isolates from healthy pigs. Septicemic isolates were phagocytized by human monocytes at a higher rate than isolates from healthy pigs ($P = 0.009$). The mean percentages of phagocytosis were significantly lower for human monocytes than porcine monocytes ($P = 0.02$ and $P = 0.008$, respectively) for isolates from both diseased and healthy animals. Healthy animal isolates were more greatly phagocytized by porcine monocytes at 15 min ($P = 0.02$) than septicemic isolates. No difference between isolates from septicemic pigs and isolates from healthy pigs was detected for other tested parameters. These results suggest that septicemic isolates have a particular pattern for invasion.

Keywords : *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; swine; septicemia; invasion; phagocytosis.

Introduction

In pigs, *Salmonella* strains are related to significant animal infections associated with clinical signs and economic losses but are mainly associated with carrier state, becoming a reservoir for human infections (3). Infection and/or silent carriage of *Salmonella* in pigs is an important public health concern. Multiresistance to antimicrobial agents is often associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (14). In order to develop control measures, it is important to characterize these isolates and better understand the pathogenesis of the infection.

The pattern of infection by *Salmonella* is an oral ingestion of the bacteria followed by passage through the mucus which covers the epithelial cells to invade the mucus membranes and cause disease (35). The intestinal mucus can thus serve as an initial binding site for bacteria. Initial adhesion is mainly a physicochemical process founded on nonspecific interactions (van der Waals and coulombic interactions) (17, 33). This type of adhesion can be reversible or not, and surface properties of some bacteria have been show to influence nonspecific interactions with host cells. The first steps of infection are : adhesion on the surface, firm attachment, and penetration into intestinal epithelial cells. The invasion of intestinal epithelial cells is believed to be a very important step with regards to the virulence of *Salmonella* strains associated with infections (5).

After invasion of the epithelial cells, the bacteria reach the subepithelial lymph tissue and the lamina propria, where they meet host immune cells (28). The

overall phagocytic process can be divided into at least two main parts. First, bacteria must adhere to phagocyte surface. The second step of phagocytosis involves internalization or ingestion of the adherent particle. Following initial adherence to phagocytes, special bacterial cell surface structures recognize receptors on the target cell surface (17, 33). The virulence genes of *S. enterica* serovar Typhimurium located on SPI-1, which encode a type III protein export machinery, are necessary for invasion of either nonphagocytic (5) or phagocytic (28) cells. *Salmonella* is able to induce cell death in macrophages in two different ways (32). Rapid activation of programmed macrophage cell death depends on SipB and SPI-1, whereas delayed induction of apoptosis is SPI-1 independent (32). The results reported by van der Velden et al. indicate that *ompR* and a functional SPI-2 encoded type III protein secretion apparatus are required for delayed induction of apoptosis (32). Bacterial survival in phagocytes is an important step to induce septicemia in pigs, causing clinical signs similar to those in humans (16, 31). Thus pig infection model may be used to study human salmonellosis. *Salmonella* is able to survive and replicate in phagocytic cells which represents an essential component in the virulence of these bacteria (1). *S. enterica* serovar Typhimurium cells that have invaded the macrophage by phagocytosis are able to replicate intracellularly (28) and induce apoptosis (32). In the past 10-15 years, an increased prevalence of clinical salmonellosis associated with *Salmonella* serovar Typhimurium has been observed in pigs (11), suggesting that these isolates may have acquired new virulence mechanisms.

The aim of this study was to compare isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium associated with septicemia in swine with isolates recovered from

clinically healthy pigs, with respect to ability to adhere to and invade host cells, to be phagocytized and survive in cells, to generate the apoptosis, to adhere to intestinal mucus and various to solvents.

Materials and methods

Bacterial isolates

Salmonella isolates ($n = 33$) were recovered from extraintestinal organs or feces of dead pigs with an anamnesis of diarrhea and sudden death and typical lesions associated with salmonellosis and septicemia at necropsy. A diagnosis of salmonellosis was established following necropsy. These isolates from pigs with clinical signs (CS isolates) were obtained from S. Messier (Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada). Isolates ($n = 33$) from healthy pigs without clinical signs (WCS isolates) were isolated from the feces of apparently healthy animals at slaughterhouses and originating from farms without a history of clinical signs and without macroscopic lesions observed at this time (24). Sampled animals originated from a total of 55 farms; 7 farms were sampled more than once (4). *S. enterica* serovar Typhimurium strain SL1344, previously described as being highly invasive in in vitro invasion assays and virulent for mice, was used as positive control (18, 20). A noninvasive *Escherichia coli* strain 862B, isolated at the Reference Laboratory for *E. coli*, Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, from the intestinal content of a pig and considered as non virulent was used as negative control (9). All strains and isolates used in this study were sensitive to colistin (polymyxin E, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Ontario, Canada). Unless otherwise mentioned, bacterial cultures were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) Muller Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) or on LB

containing 1.5% (wt/vol) agar. Isolates were stored at -70°C in LB supplemented with 35% (vol/vol) glycerol.

Cell cultures

The Int-407 human embryonic intestinal epithelial cell line (CCL-6; ATCC) (also known as Henle 407) was used in this study. Cells were routinely grown and maintained in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Invitrogen Canada Inc, Ontario, Canada). The culture medium was changed every 3 to 4 days for up to 15 passages. For adhesion and invasion assays, 10^5 cells/1.5 ml/dish (media without antibiotics) were seeded and allowed to grow to confluency (approximately 5.5×10^5 cells/dish) in 24-well plates.

Growth and preparation of bacteria for adhesion and invasion assays

All isolates from a previous study (4) were analyzed for adhesion and invasion assays. LB agar plates were first inoculated with bacteria from frozen glycerol stocks and incubated 37°C overnight. Late-logarithmic-phase cultures of bacteria (optical density [OD] at 600 nm of ~ 0.650) were prepared by inoculating LB with a single colony and incubating the bacteria with shaking for 20 h at 37°C . The bacteria were centrifuged at low speed and resuspended in MEM at an OD at 600 nm of ~ 0.290

(10^8 CFU/ml). Dilutions were prepared for resulting in a multiplicity of infection (MOI) of 10 bacteria per cell in 1 ml of inoculum.

Adhesion and invasion assays

For adhesion assays, confluent monolayers of Int-407 cells were washed once with prewarmed Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) (pH 7.4) (Invitrogen). The bacterial inoculum was added, and the infected cells were incubated at 37°C for 30 min in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were rinsed three times with D-PBS to remove the nonadherent bacteria. Cells were then overlaid with 0.1% (wt/vol) sodium deoxycholate in D-PBS and incubated for 5 min at room temperature to release adherent bacteria. The cell lysate was then diluted and plated on LB agar to determine viable bacterial counts.

For invasion assays, confluent monolayers of Int-407 cells were washed and the bacterial inoculum was added to the cells as described above for the adhesion assay. The infected cells were incubated at 37°C for 1 h in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were rinsed three times with D-PBS and then incubated for an additional 2 h with fresh MEM containing 150 µg/ml colistin. Colistin was chosen instead of the commonly used gentamicin since some isolates belonging to *Salmonella* serovar Typhimurium are resistant to this antibiotic. Kusters et al. (20) validated the use of colistin for killing extracellular bacteria. Cells were washed three times with D-PBS and subsequently overlaid with 0.1% (wt/vol) sodium deoxycholate in D-PBS and incubated for 5 min at room temperature. The cell lysate was then diluted and plated

on LB agar to determine viable bacterial counts. The adhesion and invasion rates were calculated according to the following method: percent adhesion or invasion = (number of bacteria recovered/total number of bacteria added) x 100.

Evaluation of phagocytosis level

For logistic reasons, selected isolates were included in the remaining experiments according to the results of the invasion assay. In the group of isolates from septicemic pigs, the six most invasive isolates and three isolates with an invasion rate similar to that of the isolates from the group of healthy pigs were chosen. From the group of healthy pigs, six isolates among the eight least invasive isolates were chosen.

LB agar plates were first inoculated with bacteria from frozen glycerol stocks and incubated at 37°C overnight. LB broth (200 ml) was then inoculated with a single colony and incubated with shaking for 16 h at 37°C. Late-logarithmic-phase cultures of bacteria (OD at 600 nm of ~0.650; 10⁹ CFU/ml) were prepared by inoculating 200 ml of LB with 10 ml of overnight culture and incubated with shaking for 4 to 5 h at 37°C. The bacteria were concentrated using low-speed centrifugation and labeled with the fluorochrome fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich). The bacteria, resuspended in 1 ml carbonate-bicarbonate buffer (Sigma-Aldrich) and FITC at a concentration of 20 mg/ml (100 µl), were incubated with shaking in darkness at room temperature for 30 min. Bacteria were washed three times with D-PBS to remove excess FITC (23). The OD of the bacterial suspension was then

determined at 600 nm and adjusted to an absorbance reading of 0.5 (10^8 CFU/ml). An aliquot of the suspension was used to determine the number of viable cells by diluting and plating samples on LB agar. Confirmation of the bacterial fluorescence was provided by flow cytometry and fluorescence microscopy.

The protocol for evaluation of phagocytosis was adapted from those of Busque et al. and Letellier et al. (6, 23). Porcine blood was collected at the slaughterhouse, and human blood was collected from three volunteers. The institutional ethic committee approved the protocol, and all patients provided written informed consent. Whole blood (porcine or human) was incubated with FITC-labeled *Salmonella* at a phagocyte/ bacterium ratio of 1:10 for 15, 30, and 60 min at 4°C and 37°C. The reaction was stopped with ice-cold D-PBS, the erythrocytes were lysed with Coulter whole-blood lysing reagents (Beckman Coulter Canada Inc., Ontario, Canada), and the cells were washed and fixed with paraformaldehyde (2%, wt/vol). The phagocytosis level was calculated as the percentage of phagocytosis by monocytes at 37°C minus the percentage of phagocytosis at 4°C (adherence control). The analyses were done using a flow cytometer (BD FACSCalibur System; BD Biosciences Pharmagen, Ontario, Canada). Three assays were carried out from various blood donors.

Survival

In order to evaluate survival rates, the phagocytosis was stopped with ice-cold D-PBS and cells were centrifuged. The pellet was suspended and incubated (1 h) with D-PBS-colistin (600 µg/ml) for elimination of extracellular bacteria. The cells were washed with ice-cold D-PBS. The pellet was resuspended in D-PBS and incubated at 37°C for 6 and 18 h. Water was added to the cells and left for 10 min, and the cell lysate was then diluted and plated on LB agar for an incubation of 20 to 24 h at 37°C to determine viable bacterial counts.

Apoptosis

At 2, 4, and 6 h after the beginning of phagocytosis, the reaction was stopped with ice-cold D-PBS. The erythrocytes were lysed by the Coulter whole-blood lysing reagents. The cells were washed with D-PBS, and stained with annexin V-allophycocyanin (APC) for the determination of phospholipid phosphatidylserin exposure and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences) for the evaluation of the membrane integrity in accordance with the manufacturer's instructions, and analyzed by flow cytometry within 1 hour.

Mucosal preparations

The mucus was prepared using a modified protocol based on previous reports (21, 22). Briefly, the porcine intestinal mucus was isolated from the small intestines (segments of 10 cm) of five pigs from a slaughterhouse. The small intestines were placed in sterile petri dishes containing 10 mmol/liter HEPES-Hanks buffer (HH) (pH 7.4) and cut transversally into 2- to 3-cm lengths. Any feces and partially digested food were removed from each intestinal section manually by pressing one end to the other. The intestines were placed to a second set of petri dishes containing HH and split open longitudinally with scissors. The sections were shaken to remove any further debris and transferred to a third set of petri dishes. The layer of mucus gel covering the intestinal lumen was collected by gently scraping the mucosa with a rubber spatula.

After the intestinal sections were discarded, the collected mucus gel was centrifuged twice at 28 000 X g for 15 min at 4°C to remove cell debris and bacteria. Mucus was stored at -70°C after measurement of the protein concentrations (protein assay, dye reagent concentrate; Bio-Rad Laboratories Inc., Ontario, Canada) and used for binding studies. The presence of *Salmonella* in the mucus gel was confirmed by culture on LB agar plate.

Adhesion assay with mucus

A modification of the protocol of Laux et al. (21, 22) was used for the adhesion assay with mucus. Bacteria were labeled using the same method as for phagocytosis and apoptosis. Assays, in triplicate, were performed in small petri dishes (tissue culture dish; Sarstedt Inc., Québec, Canada). The mucous preparations (10 mg/ml) was immobilized in petri dishes by incubation for 24 h at 4°C. Excess mucus was removed by two washes with ice-cold HH. The fixed mucus was used for binding assays with *S. enterica* serovar Typhimurium. The labeled bacteria were added to each petri dish. After the incubation for 1 h at 37°C, the petri dishes were rinsed three times with ice-cold HH to remove unattached bacteria. Adherent bacteria were released by adding 5% sodium dodecyl sulfate to each petri dish and incubating for 1 h at 37°C. Samples were removed from each petri dish and fixed with paraformaldehyde (2%, wt/vol) before examination by flow cytometry (25). The level of adherence to mucus was calculated as the percentage of relative fluorescence by bacteria minus the autofluorescence by the mucus.

Affinity of the strains for solvent

In order to study microbial surface properties that could affect interaction with host cells, microbial adhesion to solvents (MATS) was used as described previously (2). This method compares the microbial cell affinities to a monopolar solvent and an apolar solvent. The monopolar solvent can be an electron acceptor or electron donor, but both solvents should have similar van der Waals' surface tension components (2).

Two pairs of solvents were used, as described by Bellon-Fontaine et al. (2), to determine acidic and basic microbial surface properties: (i) chloroform, an electron acceptor solvent, and hexadecane, a nonpolar solvent, and (ii) ethyl acetate, a strong electron donor solvent, and decane, a nonpolar solvent. All solvents were obtained from Sigma-Aldrich.

The protocol is based on those of Bellon-Fontaine et al. and Planchon et al. (2, 30). Three successive subcultures in LB broth were completed for all strains, and the third one was collected in stationary phase after 24 h in LB media with shaking. The bacteria were washed and resuspended in saline water (8.5g/liter NaCl) to obtain an OD at 400 nm between 0.6 and 0.7 (A_0). In all assays, 2.4 ml of this suspension was vortexed for 90 s with 0.4 ml of solvent. The mixture was held at room temperature for 15 min to ensure the separation of two phases. The OD at 400 nm (A) was measured using 1 ml of aqueous phase. The percentage of bound cells was calculated using the equation : percent affinity = $[1-(A/A_0)] \times 100$.

Flow cytometry

For flow cytometry, data for all samples were obtained on a BD FACSCalibur and analyzed using BD FACStation and BD Cell Quest Pro software (BD Biosciences Pharmagen). For each experimental condition, 10 000 cells were acquired.

We used a dot plot display of forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) for analysis of blood and bacteria. Computerized gating in FSC and SSC was set to

exclude cell debris and residual free bacteria. The data analysis was performed on fluorescence histograms. After gating, for the monocyte population, the number of monocytes participating in the phagocytosis could be determined. The upper limit of the autofluorescence of the monocytes was measured in a control sample containing blood only. A marker was positioned after the upper FL1 value of the autofluorescence, and the portion of monocytes in the histogram to the right of the marker represented the signal for cells with associated FITC-labeled bacteria (12). Phagocytosis was expressed as percentage of monocyte-associated fluorescent cells. For the apoptosis analysis, events were collected in list mode format for each sample with FSC versus SSC and 4-decade logarithmic amplification of fluorescence (29).

For adherence to mucus, we used a dot plot display of FSC versus SSC for analysis of mucus and bacteria, respectively. The device was set to exclude cellular debris and non-adherent bacteria. We also used a histogram to show the relative fluorescence of each cell sample and calculated the median fluorescence intensity for each peak. Median fluorescence intensity values were compared for two groups of isolates and controls. Bacteria bound to mucus are represented as a shift in fluorescence compared with the autofluorescence expressed by mucus (7, 25).

Statistical analysis

All analyses were based on at least three independent replicates. We used SAS (version 9.1; SAS Institute, Cary, NC) for data analysis. For adhesion, invasion,

phagocytosis, survival, apoptosis, mucus adhesion, and MATS assays, the mean and the standard deviation were used for descriptive statistics. Prior to analysis, survival data were log transformed and phagocytosis and apoptosis data were transformed with the arcsine square root to normalize distributions. For MATS, negative results were considered equal to zero. Linear models with isolates as fixed factors were used to examine differences among isolates. For adhesion, invasion, survival, and MATS assays, mixed linear models with isolate type as a fixed factor and isolate within a type as a random factor were used to compare types of isolates (CS and WCS). For the solvent decane, results were dichotomized (presence versus absence) due to the high prevalence of zero values. In this case, exact chi-square tests were used to compare the prevalence of positive results among isolates and to compare isolate types. For phagocytosis and apoptosis data, repeated-measures linear models, with time as a within-subject factor, were used to examine the effect of time, isolate, isolate type, and monocytes source (human or swine). Post-hoc tests, with sequential Bonferroni adjustment, were used to compare pairs of means. The statistical significance was set at a P value of < 0.05 .

Results

Ability to adhere to and to invade Int-407 cells

Bacterial adhesion to Int-407 cells was tested for the two groups of isolates. It was not possible to detect any significant difference ($P = 0.53$) between the two groups of isolates in the ability to adhere to Int-407 cells. The means of adhesion and standard errors were $16.00\% \pm 2.48\%$ for septicemic isolates and $18.60\% \pm 3.13\%$ for isolates from healthy pigs. The results are presented in Fig. 1.

We compared the invasion of Int-407 cells for *S. enterica* serovar Typhimurium isolates from septicemic animals with that by isolates from nonsepticemic pigs. A significant difference ($P = 0.003$) was observed between the two groups of isolates. Septicemic isolates ($42.68\% \pm 5.54\%$) invaded epithelial cells at higher rates than isolates from healthy pigs ($10.30\% \pm 6.84\%$). The results are presented in Fig. 1.

Phagocytosis level

The percentage of monocytes that were able to phagocytize FITC-labeled *Salmonella* in porcine whole blood was measured. The mean values increased with time for CS isolates ($16.40\% \pm 4.43\%$, $23.66\% \pm 3.21\%$, and $37.77\% \pm 3.11\%$ for 15, 30, and 60 min, respectively) ($P < 0.0001$) as well as for WCS isolates ($31.89\% \pm 7.81\%$, $28.65\% \pm 6.60\%$, and $36.34\% \pm 5.49\%$ for 15, 30, and 60 min respectively)

($P = 0.02$) but to a lesser degree than for CS isolates. The average was significantly lower for CS isolates than for WCS isolates at 15 min ($P = 0.02$) (Fig. 2) but not at 30 min ($P = 0.70$) or 60 min ($P = 0.82$), although, overall, there was no difference. The percentage of phagocytosis was heterogenous within CS isolates or within WCS isolates ($P = 0.005$ and $P = 0.004$, respectively).

The percentage of monocytes that were able to phagocytize FITC-labeled *Salmonella* in human whole blood was measured. Septicemic isolates were ingested at a higher level ($10.63\% \pm 3.14\%$, $16.90\% \pm 2.19\%$, and $25.34\% \pm 3.64\%$ for 15, 30, and 60 min, respectively) by human monocytes than isolates from healthy pigs ($4.07\% \pm 1.39\%$, $5.84\% \pm 1.62\%$, and $11.82\% \pm 2.07\%$ for 15, 30, and 60 min, respectively) at all times tested ($P = 0.009$). Figure 2 shows the results at 15 min. For WCS isolates, the mean values of intracellular bacteria increased with time for human monocytes ($P = 0.005$). The percentage of phagocytosis was heterogenous within CS isolates ($P = 0.02$).

We compared the percentages of bacteria phagocytized by monocytes isolated from porcine blood and human blood. The mean percentages of phagocytosis were significantly lower for the human monocytes than porcine monocytes for isolates from both diseased and healthy pigs at all times ($P = 0.02$ and $P = 0.008$, respectively).

Survival

Since *Salmonella* is capable of surviving in monocyte cells, we then tested whether there was a difference in the survival rate between the two groups of isolates. Some isolates were able to survive for 6 h and 18 h, whereas negative control bacteria was not able to survive for this time. It was not possible to detect any significant difference ($P = 0.17$) between the two groups of isolates in the ability to survive after 6 h (Fig. 3). The means (log transformed) and standard errors were 5.41 ± 0.15 for septicemic isolates and 5.05 ± 0.19 for isolates from healthy pigs. The results at 18 h are similar to those at 6 h.

Apoptosis

As *S. enterica* serovar Typhimurium was able to induce apoptosis of monocytes, we compared apoptosis levels in cells infected by CS and WCS isolates. The mean values for living cells infected with each isolate decreased with time for CS isolates ($90.72\% \pm 3.28\%$, $77.91\% \pm 2.58\%$, and $63.69\% \pm 2.53\%$ for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$) and WCS isolates ($87.11\% \pm 2.71\%$, $74.66\% \pm 2.42\%$, $55.55\% \pm 3.19\%$ for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$). The results after 6 h of apoptosis are presented in Fig. 4 and 5. The percentage of living cells was heterogeneous within CS isolates ($P < 0.0001$). The apoptosis level was heterogeneous within CS isolates ($P < 0.0001$) and within WCS isolates ($P = 0.005$).

The mean values of apoptotic to necrotic cells infected with each isolate increased with time for CS isolates ($2.07\% \pm 1.68\%$, $5.69\% \pm 1.50\%$, and $5.66\% \pm$

2.19% for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$) and WCS isolates ($1.62\% \pm 0.79\%$, $3.27\% \pm 1.07\%$, and $6.43\% \pm 2.52\%$ for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$). The percentage of apoptotic to necrotic cells was heterogeneous within CS and WCS isolates ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively). The mean values of necrotic cells infected with each isolate increased with time for CS isolates ($4.52\% \pm 1.59\%$, $11.74\% \pm 1.78\%$, and $26.61\% \pm 2.82\%$ for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$) and WCS isolates ($6.69\% \pm 1.22\%$, $17.15\% \pm 1.63\%$, and $31.44\% \pm 4.29\%$ for 2, 4, and 6 h, respectively) ($P < 0.0001$). The percentage of necrotic cells varied within CS and WCS isolates ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively).

The averages of the percentages of living cells, apoptotic cells (cells at beginning of the apoptotic process), apoptotic to necrotic cells (cells at a later phase of the apoptotic process), and necrotic cells did not differ between CS isolates and WCS isolates ($P = 0.21$, $P = 0.51$, $P = 0.91$, and $P = 0.91$, respectively).

Adhesion to mucus

Isolates were tested for their ability to adhere to the porcine intestinal mucus. It was not possible to detect any significant difference ($P = 0.89$) between the two groups of isolates in their ability to adhere to mucus. The means and the standard errors were $35.36\% \pm 5.19\%$ for septicemic isolates and $34.21\% \pm 6.36\%$ for isolates from healthy pigs. The results are presented in Fig. 6.

Affinity of the strains for solvent

Four different solvents were used to study microbial surface properties of all isolates. Two monopolar solvents, chloroform and ethyl acetate, were chosen for the estimation of the Lewis acid/base character (i.e. electron donor/acceptor), whereas two apolar solvents, hexadecane and decane, were employed to estimate the hydrophobic/hydrophilic cell surface properties of isolates. All isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium had the greatest affinity with chloroform, the acidic solvent. The lowest affinity was observed for ethyl acetate, the basic solvent. These results showed that cell surfaces of both groups of isolates were strong electron donors and weak electron acceptors. For all isolates, adhesion to a nonpolar solvent was near zero. Adhesion to chloroform was higher than to hexadecane, the apolar solvent; being two solvents with comparable van der Waals properties. These differences indicated an electron donor and a basic character for *S. enterica* serovar Typhimurium. It was thus not possible to detect any difference between the groups of isolates for MATS ($P = 0.10$, $P = 0.54$, $P = 0.97$, and $P = 0.75$, respectively, for chloroform, hexadecane, ethyl acetate, and decane). The results are presented in Fig. 7.

Discussion

In this study, different procedures were used to discriminate between *S. enterica* serovar Typhimurium isolates recovered from diseased and clinically healthy pigs. Gianella et al. (15), in an in vitro model for *Salmonella* invasion, found that only strains that penetrated HeLa cells were able to invade the mucosa of the rabbit ileum. Many parameters, such as the MOI, can influence results and interpretation of this type of assay. Kusters et al. (20) observed that the MOI has an impact on the fraction of the inoculum that adheres to or invades cells. Other authors enhanced invasion by use of a low-speed centrifugation step (8, 19).

In our study, using the same control strain (*S. enterica* serovar Typhimurium SL1344) and similar parameters (MOI, cell line, and growth conditions) as Galan and Curtiss (13) and found significant differences among septicemic and nonsepticemic isolates in invasion rates but not in adhesion rates. Septicemic isolates invaded epithelial cells at a higher rate than isolates from healthy pigs. However, some strains isolated from clinically healthy animals also possessed a high invasiveness rates, suggesting that healthy animals may carry potentially pathogenic strains. Since pigs may carry *Salmonella* for prolonged period after onset of diarrhea and disease, it is possible that some septicemic isolates could have been recovered from clinically healthy animals. Another possibility is contamination during the transport or lairage.

The greater morbidity and mortality associated with *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 has led to the proposal that these strains may be more virulent (34). In our study, the prevalence of DT104 was 36.4% (12/33) for CS isolates and 51.5% (17/33) for WCS isolates (4). When we used invasion assays, we did not observe any greater invasiveness for DT104. This is in accordance with the study by Allen et al. (1), who were not able to show that *S. enterica* serovar Typhimurium DT104 were more virulent than *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 using in vitro and in vivo experiments.

Overall, isolates were phagocytized more by porcine monocytes than by human monocytes. CS isolates were phagocytized less by porcine monocytes in 15 min than WCS isolates. One hypothesis would be that the phagocytosis is delayed for septicemic isolates. Although the mean values of phagocytosis were similar, it appeared that CS isolates were more heterogeneous than WCS isolates. On the other hand, when in contact with human monocytes, CS isolates are phagocytized more than WCS isolates. *S. enterica* serovar Typhimurium survival in macrophages is essential for virulence (10). Some authors, using cultured macrophages, demonstrated that invasive strains of *S. enterica* serovar Typhimurium invaded macrophages 10 times more than strains that have a noninvasive phenotype (28). Invasive *S. enterica* serovar Typhimurium strains can induce apoptosis, whereas noninvasive mutant strains did not (28). Interestingly, we did not observe any significant difference between the two groups of isolates in their ability to induce apoptosis. These results suggest that the apoptosis process is not associated with virulence in *S. enterica* serovar Typhimurium isolates that induce disease in pigs. We can speculate that these

isolates take advantage of intracellular replication and use this mechanism to spread through the host.

In this study, we also examined the binding of *S. enterica* serovar Typhimurium to pig intestinal mucus, since this was described as being an important step leading to colonization. We observed that all isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium can bind to crude mucus, with no significant difference between CS and WCS isolates. One study had indicated that both virulent and avirulent *S. enterica* serovar Typhimurium strains were able to bind to rat intestinal mucus; however, in this animal species, the binding of a virulent strain was six times greater than that of an avirulent *S. enterica* serovar Typhimurium (35). Those authors proposed that virulent *Salmonella* strains take advantage of a specific interaction with the mucus and possibly favor colonization of the epithelial cells. Other studies reported that virulent strains of various bacterial species can bind to intestinal mucus from different animal species with a higher affinity than avirulent strains (21, 22, 26), in contrast to our findings and those of McCormick et al. (27). There are probably other virulence factors which were not examined in this study which could be implicated. The examination of virulence-related genes by use of a microarray could complete this study.

The MATS method was used for the characterization of the electron donor/electron acceptor properties of bacteria (2). In addition, this method confirmed that adhesion between the bacterial and cell surfaces is the result of an association between van der Waals, Lewis acid-base, and electrostatic interactions (2). According

to our results, we can conclude that all isolates possess a higher affinity for chloroform. This high affinity for chloroform, an acidic solvent, it is due to the basic or electron donor character of the bacteria, whereas the weak affinity found in bacteria for a basic solvent is due to the weak acidic or electron acceptor property (2). This basic character can be attributed to the presence of carboxylic groups on the microbial surface (2) or to the negatively charged surface of microorganisms (30). Furthermore, most bacteria are negatively charged in the pH range frequently found in most food ($\text{pH} < 7$) (30). The fact that both types of isolates were found to possess similar surface properties suggests that virulence of *S. enterica* serovar Typhimurium in swine is linked not to a variation of their surfaces properties, but probably to specific adhesins.

Whether the isolates (no. 42, 43, and 46) whose invasion is weaker are included or excluded, there is no difference in all results, indicating that the difference could be at the level of the invasion in epithelial cells.

In this study, we characterized isolates from septicemic animals in order to identify putative virulence factors. However, host factors may also affect this issue of infection by septicemic isolates, since a range of clinical signs can be observed during outbreaks in affected herds. One cannot rule out that host susceptibility may also influence the status of isolates. The influence of host factors in the outcome of infection by virulent isolates should be further studied.

In summary, in this study, using various methods to assess virulence of isolates from healthy or diseased animals, we were able to demonstrate that isolates from diseased animals possess an increased capacity to invade intestinal cells and were phagocytized at a lower level earlier in the infection than isolates from healthy animals. However, most other classical virulence features of isolates related to survival within host cells, such as induction of apoptosis or survival within monocytes, were found to be identical, suggesting that early steps in the establishment of infection and spread within host phagocytes are most important for the outcome of the infection in animals. Further studies at the molecular level will be necessary to better elucidate the pathogenesis of this infection in swine.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the NSERC to Sylvain Quessy.

We thank John M. Fairbrother, Serge Messier, and Nancy Rheault for contributing strains. We thank Nancy Blain, Annie DesRosiers, Guillaume Gauthier-Larivière, Peter Mueller, Frédéric Oigny, and Stéphanie St-Jean for technical assistance. We thank Guy Beauchamp of the Université de Montréal for the statistical analysis. We thank the blood donors for their contribution.

References

1. **Allen, C. A., P. J. Fedorka-Cray, A. Vazquez-Torres, M. Suyemoto, C. Altier, L. R. Ryder, F. C. Fang, and S. J. Libby.** 2001. In vitro and in vivo assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 virulence. *Infect. Immun.* **69**:4673-4677.
2. **Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault, and C.J. van Oss.** 1996. Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron-donor/electron acceptor or Lewis acid-base properties of microbials cells. *Colloids Surf. B* **7**:47-53.
3. **Berends, B. R., F. Van Knapen, J. M. A. Snijders, and D. A. A. Mossel.** 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food. Microbiol.* **36**:199-206.
4. **Bergeron, N., J. Corriveau, A. Letellier, F. Daigle, and S. Quessy.** *Can. J. Vet. Res.*, in press.
5. **Boyen, F., F. Pasmans, F. Van Immerseel, E. Morgan, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, A. Decostere, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2006. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microbes Infect.* **8**:2899-2907.
6. **Busque, P., R. Higgins, S. Sénéchal, R. Marchand, and S. Quessy.** 1998. Simultaneous flow cytometric measurement of *Streptococcus suis* phagocytosis by polymorphonuclear and mononuclear blood leukocytes. *Vet. Microbiol.* **63**:229-238.

7. **Drudy, D., D. P. O'Donoghue, A. Baird, L. Fenelon, and C. O'Farrelly.** 2001. Flow cytometric analysis of *Clostridium difficile* adherence to human intestinal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* **50**:526-534.
8. **Ernst, R. K., D. M. Dombroski, and J. M. Merrick.** 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.
9. **Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, and S. Larivière.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **50**:1029-1036.
10. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**:5189-5193.
11. **Foley, S. L., A. M. Lynne, and R. Nayak.** 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim. Sci.* **86**(E. Suppl.):E149-162.
12. **Gaforio, J. J., M. J. Serrano, E. Ortega, I. Algarra, and G. Alvarez de Cienfuegos.** 2002. Use of SYTOX green dye in the flow cytometric analysis of bacterial phagocytosis. *Cytometry* **48**:93-96.
13. **Galan, J. E., and R. Curtiss III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**:6383-6387.
14. **Gebreyes, W. A., C. Altier, and S. Thakur.** 2006. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiol. Infect.* **134**:187-198.

15. **Giannella, R. A., O. Washington, P. Gemski, and S. B. Formal.** 1973. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.* **128**:69-75.
16. **Gordon, M. A.** 2008. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J. Infect.* **56**:413-422.
17. **Heinzelmann, M., M. Scott, and T. Lam.** 2002. Factors predisposing to bacterial invasion and infection. *Am. J. Surg.* **183**:179-190.
18. **Hoiseth, S. K., and B. A. D. Stocker.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**:238-239.
19. **Iyoda, S., T. Kamidoi, K. Hirose, K. Kutsukake, and H. Watanabe.** 2001. A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* **30**:81-90.
20. **Kusters, J. G., G. A. W. M. Mulders-Kremers, C. E. M. van Doornik, and B. A. M. van der Zeijst.** 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.
21. **Laux, D. C., E. F. McSweegan, and P.S. Cohen.** 1984. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to immobilized intestinal mucosal preparations : a model for adhesion to mucosal surface components. *J. Microbiol. Methods* **2**:27-39.
22. **Laux, D. C., E. F. McSweegan, T. J. Williams, E. A. Wadolowski, and P. S. Cohen.** 1986. Identification and characterization of mouse small intestine

- mucosal receptors for *Escherichia coli* K-12 (K88ab). *Infect. Immun.* **52**:18-25.
23. **Letellier, A., S. Messier, L. Lessard, S. Chénier, and S. Quessy.** 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can. J. Vet. Res.* **65**:168-172.
24. **Letellier, A., S. Messier, and S. Quessy.** 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J. Food Prot.* **62**:22-25.
25. **Logan, R. P. H., A. Robins, G. A. Turner, A. Cockayne, S. P. Borriello, and C. J. Hawkey.** 1998. A novel flow cytometric assay for quantitating adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J. Immunol. Methods* **213**:19-30.
26. **Mantle, M., and S. D. Husar.** 1993. Adhesion of *Yersinia enterocolitica* to purified rabbit and human intestinal mucin. *Infect. Immun.* **61**:2340-2346.
27. **McCormick, B. A., B. A. D. Stocker, D. C. Laux, and P. S. Cohen.** 1988. Roles of motility, chemotaxis, and penetration through and growth in intestinal mucus in the ability of an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* to colonize the large intestine of streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* **56**:2209-2217.
28. **Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, and S. Falkow.** 1996. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**:9833-9838.
29. **O'Brien, M. C., S. F. Healy, Jr., S. R. Raney, J. M. Hurst, B. Avner, A. Hanly, C. Mies, J. W. Freeman, C. Snow, S. K. Koester, and W. E.**

- Bolton.** 1997. Discrimination of late apoptotic/necrotic cells (type III) by flow cytometry in solid tumors. *Cytometry* **28**:81-89.
30. **Planchon, S., B. Gaillard-Martinie, S. Leroy, M. N. Bellon-Fontaine, S. Fadda, and R. Talon.** 2007. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiol.* **24**:44-51.
31. **Sirinavin, S., P. Jayanetra, and A. Thakkinstian.** 1999. Clinical and prognostic categorization of extraintestinal nontyphoidal *Salmonella* infections in infants and children. *Clin. Infect. Dis.* **29**:1151-1156.
32. **van der Velden, A. W. M., S. W. Lindgren, M. J. Worley, and F. Heffron.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect. Immun.* **68**:5702-5709.
33. **van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, and A. J. B. Zehnder.** 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* **54**:75-87.
34. **Villar, R. G., M. D. Macek, S. Simons, P. S. Hayes, M. J. Goldoft, J. H. Lewis, L. L. Rowan, D. Hursh, M. Patnode, and P. S. Mead.** 1999. Investigation of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Washington State. *JAMA* **281**:1811-1816.
35. **Vimal, D. B., M. Khullar, S. Gupta, and N. K. Ganguly.** 2000. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Mol. Cell. Biochem.* **204**:107-117.

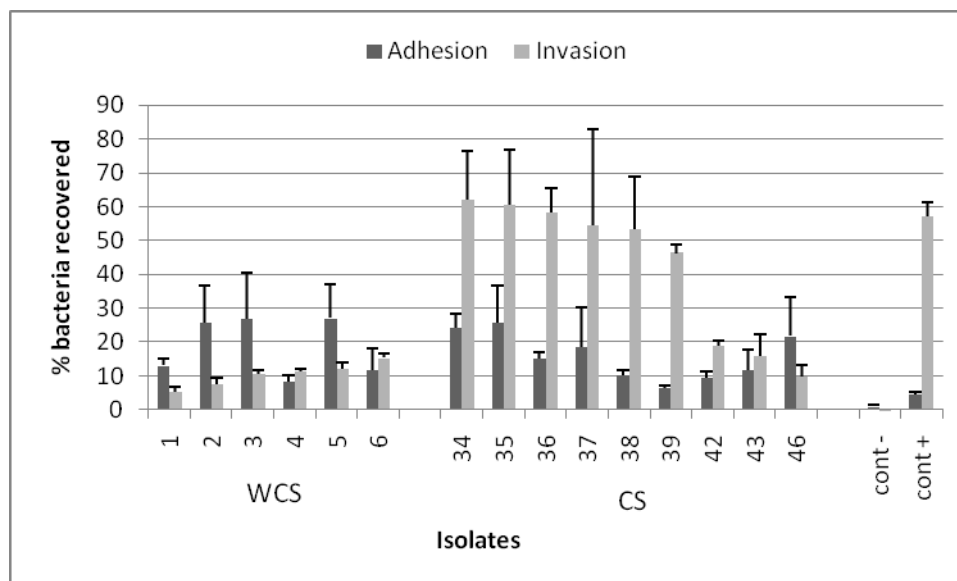


FIG. 1. Mean percentages of adhesion to and invasion into intestinal cell line Int-407 by *Salmonella* isolates from diseased and healthy animals. Data represent averages and standard deviations from at least three independent trials. The adhesion and invasion rates were calculated according to the following method: percent adhesion or invasion = (number of bacteria recovered/total number of bacteria added) x 100. Cont-, negative control (*E. coli* 862B) ; cont+, positive control (SL1344).

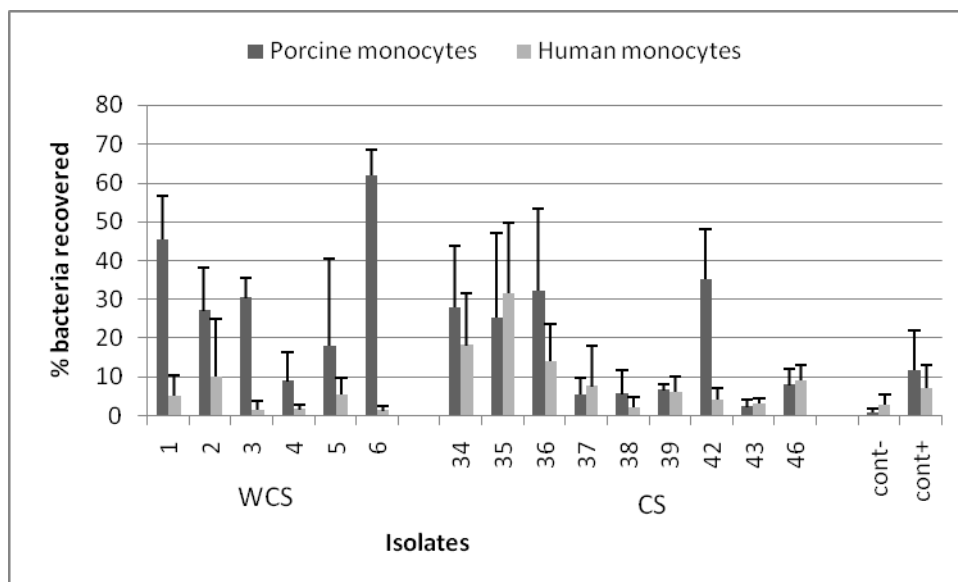


FIG. 2. Mean percentages of phagocytosis of *Salmonella* isolates from diseased and healthy animals by porcine and human monocytes at 15 min. Data represent averages and standard deviations from three independent trials.

Cont-, negative control (*E. coli* 862B) ; cont+, positive control (SL1344).

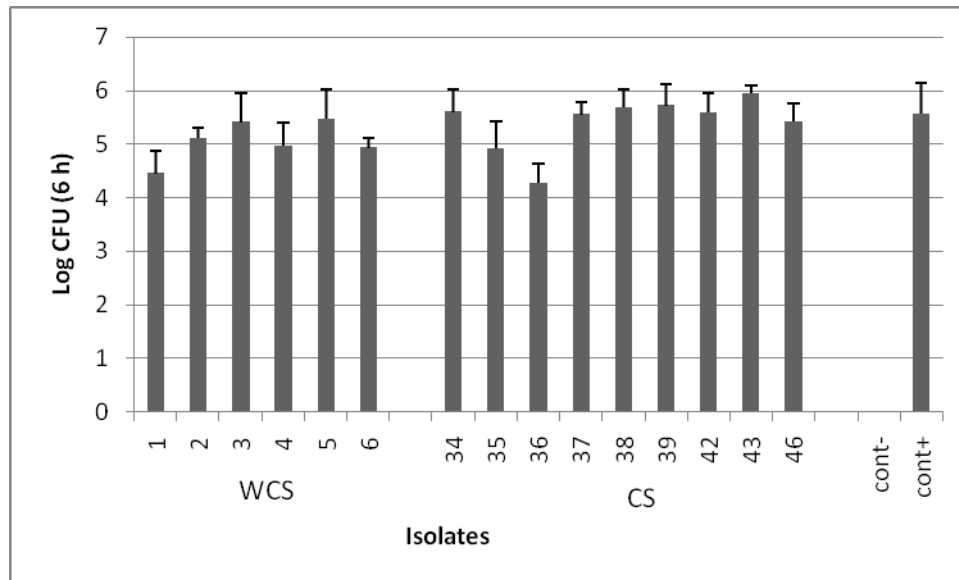


FIG. 3. Number of *Salmonella* organisms surviving in porcine blood at 6 h after the beginning of the phagocytosis. Data represent log-transformed mean values and standard deviations from three independent trials.

Cont-, negative control (*E. coli* 862B) ; cont+, positive control (SL1344).

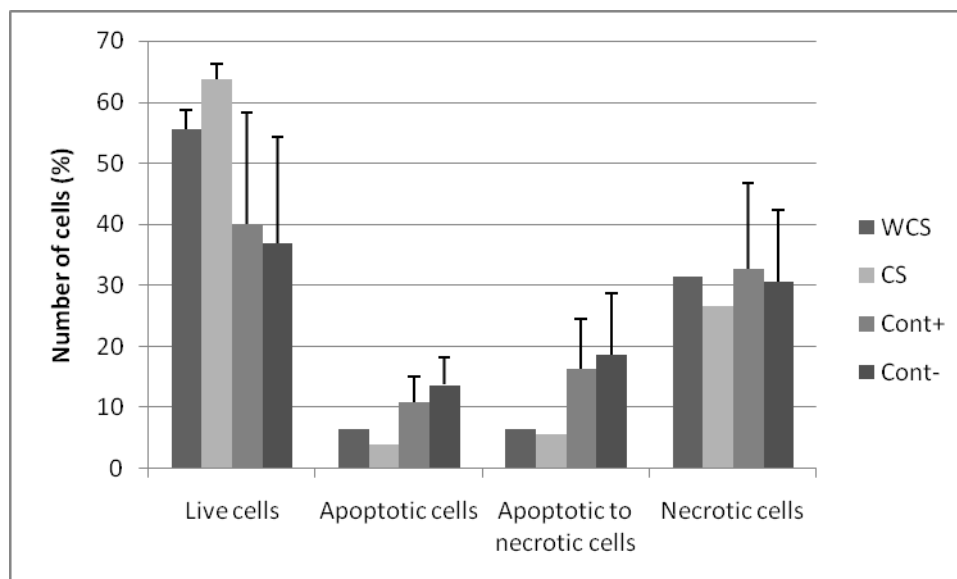


FIG. 4. Mean percentages of bacteria at different times in the process of apoptosis for isolates from diseased and healthy animals at 6 h after beginning of phagocytosis. Data represent averages with standard errors (WCS and CS) or standard deviations (Cont+ and Cont-). For the WCS and CS, the percentages represent the mean of the group, while for the controls they represent the mean value obtained with each isolate, from three independent trials.

Cont-, negative control (*E.coli* 862B) ; cont+, positive control (SL1344).

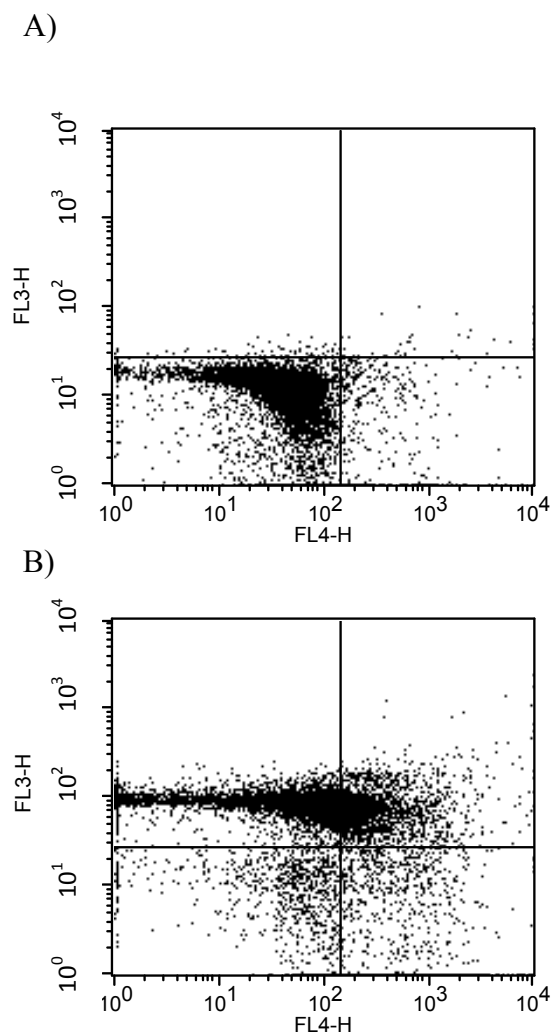


FIG. 5. Invasion by isolate #4 induces apoptosis in porcine blood. Staining with annexin V-APC (FL4) and 7-AAD (FL3) determined phospholipid phosphatidylserin exposure and membrane integrity, respectively. (A) Two hours after the beginning of phagocytosis; (B) 6 h after the beginning of phagocytosis. When apoptosis is measured over time, cells can often be tracked from annexin V-APC and 7-AAD negative (viable, or no measurable apoptosis) (lower left) to annexin V-APC positive and 7-AAD negative (early apoptosis, membrane integrity present) (lower right) and finally to annexin V-APC and 7-AAD positive (end stage apoptosis and death) (upper right) (BD Biosciences).

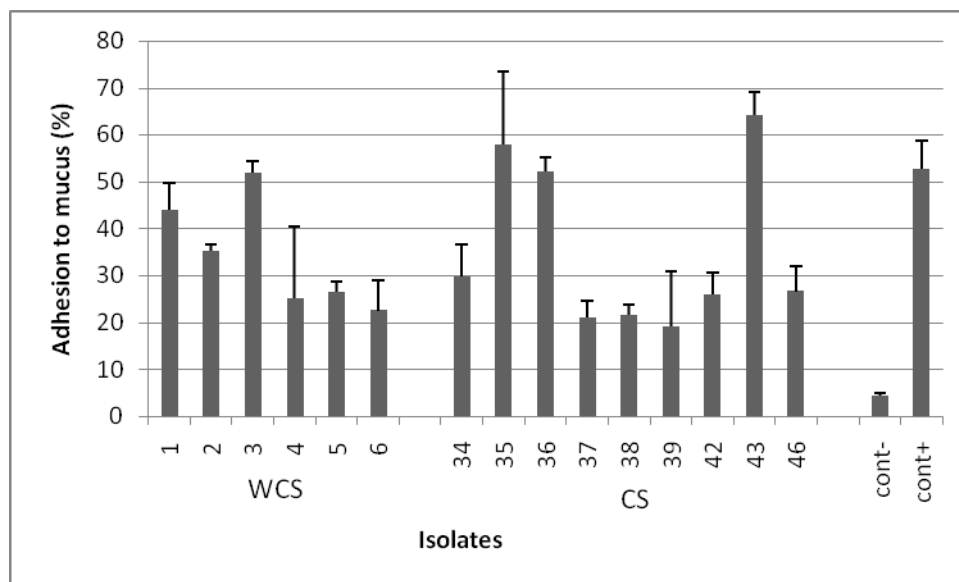


FIG. 6. Percentages of fluorescence that adhere to swine intestinal mucus. Data represent averages and standard deviations from three independent trials. The level of adherence to mucus was calculated as the percentage of relative fluorescence by bacteria minus the autofluorescence by the mucus.

Cont-, negative control (*E.coli* 862B) ; cont+, positive control (SL1344).

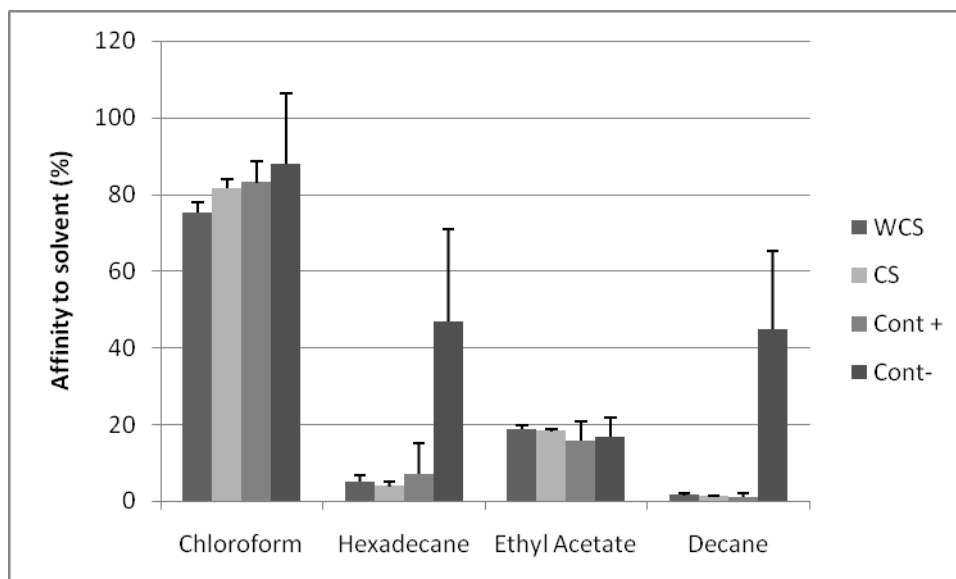


FIG. 7. Percentages of affinity to various solvents of selected WCS and CS *Salmonella* isolates, positive control (Cont+) (SL1344), and negative control (Cont-) (*E.coli* 862B). Data represent averages with standard errors (WCS and CS) or standard deviations (Cont+ and Cont-). For the WCS and CS, the percentages represent the mean of the group, while for the controls they represent the mean value obtained with each isolate, from three independent trials. The percentage of bound cells was calculated using the equation : percent affinity = $[1-(A/A_0)] \times 100$.

CHAPITRE 5. ARTICLE 3

**Genetic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from
septicemic and healthy pigs**

Article en préparation pour la revue

FEMS Microbiology Letters

Responsabilités des coauteurs dans cet article

Dans ce troisième article, j'ai réalisé l'ensemble des manipulations entourant la technique de l'hybridation soustractive dans le laboratoire et sous la supervision de la Dr Daigle. J'ai aussi mis au point la technique pour l'isolement des profils plasmidiques et réalisé la technique sur tous les isolats avec l'aide d'un stagiaire. J'ai réalisé les manipulations pour la caractérisation du plasmide en collaboration avec la Dr Daigle. J'ai compilé et contribué à l'analyse des données avec le statisticien. J'ai analysé et interprété l'ensemble des données et écrit en majeure partie l'article.

Les Drs Letellier, Daigle et Quessy ont collaboré à la planification de l'étude, à l'élaboration des protocoles, aux conseils techniques, à l'interprétation des résultats et à l'écriture de l'article.

Genetic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from septicemic and healthy pigs

Nadia Bergeron ¹, France Daigle ², Ann Letellier ¹ & Sylvain Quessy ¹

¹ Chaire de Recherche en Salubrité des Viandes (CRSV), Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Department of Pathology and Microbiology, Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada ; and ² Department of Microbiology and Immunology, Medicine Faculty, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence: Sylvain Quessy, Department of Pathology and Microbiology, Veterinary Medicine Faculty, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Tel.: 450-773-8521 ext. 8398; fax: 450-778-8157.

Abstract

Salmonella Typhimurium is an important pathogen in swine and also a zoonotic agent. It causes septicemia in fattening pigs but, more commonly, pigs will be asymptomatic carriers contaminating other pigs or meat products. The objective of this study was to genetically compare isolates of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine (CS) to isolates recovered from healthy animals at slaughter (WCS). Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to identify DNA restriction fragments present in a *S. Typhimurium* isolated from a septicemic pig but absent in a *S. Typhimurium* isolated from healthy pig. Thirteen different clone inserts were identified five of which had similarity with sequences of known or predicted functions. Among these inserts, two clones contained genes associated with plasmids. Plasmid profiles were determined for several CS and WCS isolates. Analysis of plasmids indicated that similar profiles were identified in isolates from CS and WCS. Two profiles (PL14 and PL20) were more frequently observed in the isolates DT 104 than in the isolates of other phage type ($P = 0.01$ and $P = 0.01$, respectively). One interesting plasmid of the CS isolate used in the SSH was further characterized. This plasmid contained several genes of unknown functions. The *S. Typhimurium* isolate from septicemic pig characterized in this study contained several genes which will need to be further studied for their putative role in virulence.

Keywords : *Salmonella* Typhimurium; septicemia; swine; plasmids.

Introduction

Salmonella is a bacteria found worldwide in both humans and animals. It is an important source of bacterial foodborne illness in humans and causes self-limiting gastroenteritis or septicemic disease. Humans can be infected by various sources, but the pig remains an important vector. Both septicemic and asymptomatic animals can be a vehicle for human salmonellosis (Berends *et al.*, 1997). Salmonellosis represents a public health concern. Over the past few years, an increase of clinical salmonellosis associated with *S. Typhimurium* in pigs has been observed (Foley *et al.*, 2008). Multiresistance to antimicrobial agents is frequently associated with this serovar (Gebreyes *et al.*, 2006). The phage type DT 104 of *S. Typhimurium* is an emerging pathogen and isolates are often resistant to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides, and tetracycline (R-Type ACSSuT) (Humphrey, 2001; Gebreyes & Altier, 2002; Foley *et al.*, 2006). These resistances were found on two integrons (Briggs & Fratamico, 1999).

Plasmids have been linked to *Salmonella* virulence (Helmuth *et al.*, 1985). Most field strains of serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Gallinarum, Pullorum and Abortusovis possess a serovar specific virulence plasmid, characteristically 50-100 kb in size (Rychlik *et al.*, 2006). *Salmonella* serovars, such as Typhimurium, can also possess high molecular weight plasmids that can harbour genes code for resistance to antimicrobial agents. The genes associated with the pentaresistance (ACSSuT) in *S. Typhimurium* are found on a genomic island (SGI1)

showing significant homology to some plasmid-related genes (Boyd *et al.*, 2001). Some plasmids can be self-transmissible or co-transferred with conjugative plasmids. The *S. Typhimurium* virulence plasmid is observed more frequently in isolates from septicemic pigs than in diarrheic or apparently healthy pigs ($P > 0.01$) (Namimatsu *et al.*, 2006). So far, low molecular weight plasmids (< 20 Kb) are generally of unknown functions (Rychlik *et al.*, 2006).

A recent study by Bergeron *et al.* (Bergeron *et al.*, 2009) showed that isolates recovered from septicemic pigs (CS) invade intestinal epithelial cell lines at a higher rate than isolates from healthy animals (WCS). We considered it would be interesting to conduct investigations at the genome and plasmids level. The aim of this study was to compare an isolate of *S. Typhimurium* associated with septicemia in swine (CS) to an isolate recovered from a healthy animal at slaughter (WCS), in order to identify virulence attributes possibly related to the higher invasiveness of CS isolates.

Materials and methods

Bacterial isolates and culture conditions

A bank of isolates that have been characterized in a previous study and two controls were used for plasmid profiles in the present study (Bergeron *et al.*, 2009). In the current study, we were particularly interested by a subset (#36, #48, #49, and #64) of highly virulent isolates that, based on preliminary results, did not possess the classical 95 kb plasmid associated with virulence and showed no resistance to tested antimicrobial agents (Bergeron *et al.*, in press) assuming that these isolates would more likely contain new and unknown virulence factors. One isolate (#36) from this subset was chosen from this subgroup for suppression subtractive hybridization. This isolate was one of the most invasive in intestinal epithelial cell line ($58.34 \pm 7.32\%$) (Bergeron *et al.*, 2009).

The isolate (#1) from a healthy pig was chosen because it was the least invasive in the intestinal epithelial cell line ($5.24 \pm 1.52\%$) (Bergeron *et al.*, 2009). This isolate also lacked the high molecular virulence plasmid.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted by the phenol/chloroform extraction method adapted by Ausubel (Ausubel, 1994) whereby a single colony was transferred into 5 mL LB broth and incubated at 37°C overnight with vigorous shaking. The culture was

centrifuged, the supernatant was removed and the bacterial pellet was resuspended in Tris-EDTA (TE, pH 7.4). The lysis solution (Tris 50 mM, pH 7.3; NaCl 0.3M; SDS 1% and EDTA 10mM) and proteinase K ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) were added. After an incubation period at 65°C , a phenol extraction was effected. The supernatant was transferred to an eppendorf tube and treated with RNase (10 mg mL^{-1}). After another incubation period at 37°C , one phenol extraction step, two phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and one chloroform steps were performed. The DNA was precipitated with cold ethanol (100%) and resuspended in Tris-HCl (10 mM, pH 8.5). Another RNase step was effected and, after an incubation period, a purification step was completed using phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). Finally, a precipitation step with cold ethanol (100%) and 0.3 M sodium acetate (pH 5.2) was carried out. The pellet of double-stranded DNA was suspended in Tris-HCl. Genomic DNA was visualized on an agarose 0.7% (w/v) gel run for 45 min at 80 V. Gels were stained with ethidium bromide (EtBr) (Fisher Scientific Canada, Nepean, Ontario, Canada) and a picture was taken with an UV transilluminator. One marker was used: Ready-Load 1 kb DNA Ladder (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada).

Suppression subtractive hybridization and cloning

Genomic comparison by suppression subtractive hybridization (SSH) was performed using the PCR-Select Bacterial Genome Subtraction kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) according to the manufacturer's instructions. The *S.*

Typhimurium isolate (#36) was assigned as the SSH tester and the *S. Typhimurium* isolate (#1) was assigned as the SSH driver. Experimental tester and driver genomic DNA and the control *E. coli* genomic DNA were digested separately with *RsaI* (recognition sequence GTAC). One minor change was made in the protocol; for nested PCR, the number of cycles was adjusted to fifteen.

Secondary (nested) PCR-amplified subtracted cDNA populations were cloned into pCR 2.1 vector (TA Cloning Kit, Invitrogen) and transformed into chemically competent *E. coli* DH5 α cells. The cells were plated on LB agar supplemented with kanamycin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and X-Gal (40 mg mL^{-1}) selection.

Differential screening

The insert clones were amplified by PCR using the PCR2.SpeI-F and PCR2.Xba-R primers (Table 1) under the following conditions : Hot Start at 80°C for 2 min and then 25 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final cycle at 72°C for 7 min. PCR products were analyzed on 0.7% (w/v) agarose/EtBr gel to identify insert-containing clones. One marker Ready-Load 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) was used. The differential screening was effected by Southern blot and/or dot blot analysis (Bio-Dot Microfiltration Apparatus Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). For Southern blot hybridizations, the PCR products were loaded on 1% agarose gel and a standard Southern blot analysis was performed. The probes (isolates #1 and #36) were labeled with DIG-High Prime (Roche Applied Science, Laval, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions.

Hybridization was completed overnight at 42°C with gentle agitation. Subsequently, the membranes were washed as recommended (Roche Applied Science) and immunological detection was performed with Anti-Digoxigenin-AP conjugate and CSPD (chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase). The membrane was exposed on X-ray film (KODAK BioMax Light Film, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). For the dot-blot, denatured DNA samples were distributed in duplicate onto Trans-Blot Transfer-Medium Pure Nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Life Science, Mississauga, Ontario, Canada) and fixed by baking in an oven for 30 min at 120°C. The DNA labeling, hybridization, and immunological detection were completed as for the Southern blot (see above). PCR products that show visual positive differential expression (present in CS isolate and absent in WCS) were sequenced.

Plasmid isolation and profiling

Plasmid DNA was extracted by the alkaline lysis method of Birboim and Doly (Sambrook & Russell, 2001) whereby a single colony was transferred into LB medium and incubated at 37°C overnight with shaking. The culture was centrifuged, the supernatant was removed and the bacterial pellet was resuspended in cold Solution I (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0). Solution II (0.2 N NaOH and 1% SDS) and cold Solution III (5M potassium acetate and glacial acetic acid) were then added. After centrifugation step, a phenol chloroform extraction was performed. Finally, a precipitation step with 95% ethanol was performed and the pellet was rinsed with 70% ethanol at 4°C. The pellet of

double-stranded DNA was suspended in TE (pH 8.0) containing DNase-free pancreatic RNase ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada). The DNA plasmid was visualized on an agarose 0.8% (w/v) gel for 3h30 at 75 V. The gels were stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) and photographed, on an UV transilluminator. Two markers were used: BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) for high molecular weight plasmids (HMWP) and Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen) for low molecular weight plasmids (LMWP).

Characterization of the CS isolate plasmid

When the subset of isolates without 95 kb plasmid were compared to avirulent isolates, it was noted that a 3.6 kb plasmid was present in two out of four virulent isolates, while absent in the avirulent isolates. We therefore proceeded to sequence this plasmid.

The donor *E. coli* SM10 λ pir (Δ asd) (Miller & Mekalanos, 1988) strain containing a Tn10-based transposon plasmid (Herrero *et al.*, 1990) was conjugated with the recipient CS *S. Typhimurium* isolate (#36). The donor strain was grown in LB broth with DAP (2,6-diaminopimelic acid) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), kanamycin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), and ampicillin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and the CS isolate was grown in a LB medium only at 37°C overnight in a standing position. The cultures were centrifugated at low speed and resuspended in LB broth with DAP. The conjugation was made on LB agar with

DAP and IPTG (isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranoside) (20 mg mL^{-1}) at 37°C for 6 h and was kept at room temperature overnight. The conjugants were plated on selective media.

The conjugants were pooled and grown overnight for plasmid extraction using the QIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canada) in accordance with the manufacturer's instructions. Plasmids DNA were visualized on 0.7% (w/v) agarose/EtBr gel. A Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen) for low molecular weight plasmids was used as marker.

The plasmids were transformed into chemically competent *E. coli* DH5 α cells. The cells were plated on LB agar supplemented with kanamycin ($50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Plasmids from different clones were extracted using the QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN), in accordance with the manufacturer's instructions, and these were visualized on 0.7% (w/v) agarose/EtBr gel.

Sequencing and analysis of clones

Clone inserts and plasmids were sequenced by the dye termination procedure using an ABI 3730XL automatic DNA sequencer at McGill University's Genome Quebec Innovation Centre, Montréal, Québec, Canada or at the University of Montréal's Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Montréal, Québec, Canada. The sequences were submitted to the National Center for

Biotechnology Information (NCBI) data banks for homology searches (Altschul *et al.*, 1997). The primers used in this study are presented in Table 1.

Statistical analysis

SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC) was used to analyze the data from plasmid profiles. Univariate analysis was performed using the exact chi-square test to compare the relationship between various categorical variables. The comparison was made between the isolates from septicemic pigs and those from healthy pigs. Another comparison was made between the isolates from phage type DT 104 and those from the group of other phage types. The statistical significance was set at a value of $P < 0.05$.

Results

Suppression subtractive hybridization (SSH)

In another study by Bergeron *et al.* (Bergeron *et al.*, 2009), the authors were able to demonstrate that isolates from diseased animals possess an increased capacity to invade intestinal cells and were phagocytized at a lower level earlier in the infection than isolates from healthy animals. In this study, genomic comparison by SSH was performed on an isolate from a septicemic pig and an isolate from a healthy pig in an attempt to identify putative virulence genes. The selected isolates both lacked the classical virulence plasmid. We sequenced 13 different specific clones and found that five had similarity with sequences of known or predicted functions. Among these inserts, two clones (#1a/1b and #2a/2b) originated from plasmids and three clones (#3, #4, and #6) had homology with genes found on the chromosome. Among clones having low or no similarity, two clones (#7 and #8) could be also related with plasmids. The results of the comparison in GenBank are summarized in Table 2.

Plasmid profiles

As SSH data indicated that several genes originated from plasmids, we decided to determine the plasmid profiles of each isolate. Among all the CS and WCS isolates, 26 different plasmid profiles were identified (Table 3), ranging from zero to nine bands. The molecular mass of the plasmids ranged from 2.1 to 165 kb. In the isolates from CS, 19 different plasmid profiles were observed, 16 in WCS. Nine

profiles were common among CS and WCS isolates. One WCS isolate had no plasmid and belonged to the DT 104. Among the *S. Typhimurium* DT 104 isolates, only four different plasmid profiles were observed in isolates from CS (PL13, PL15, PL 18, and PL20), whereas seven plasmid profiles were found in isolates from WCS (PL1, PL6, PL13, PL14, PL15, PL19, and PL20). Three profiles were common in DT 104 isolates from CS and WCS (PL13, PL15, and PL20). Five different profiles were found in DT 104 isolates only. Two profiles for CS isolates (PL15 and PL18) and four profiles for WCS isolates (PL1, PL14, PL15, and PL19) were found in DT 104 isolates only. The three non-typable isolates harbored different plasmid profiles (PL21, PL22, and PL25). Table 3 presents the particularities of the different plasmid profiles.

The most prevalent plasmid profile (PL20) was found in both CS and WCS. The PL14 and PL20 profiles were significantly more present in DT 104 as compared with the other phage types ($P = 0.01$ and $P = 0.001$, respectively). The PL7 profile was significantly more present in other phage types than in the DT 104 ($P = 0.03$). The bands included between 3.1 and 3.5 kb; 4.3 and 4.6 kb; 5.4 and 5.7 kb were significantly more present in the DT 104 as compared with other phage types ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, respectively). The bands included between 5.9 and 6.3 kb were significantly more present in other phage types than in the DT 104 ($P = 0.0006$). The bands included between 4.3 and 4.6 kb were significantly more present in WCS isolates than CS isolates ($P = 0.02$). The presence of HMWP or the virulence plasmid was significantly more present in CS isolates than WCS isolates ($P = 0.006$ and $P = 0.04$, respectively).

Plasmid characterization

When the subset of isolates without 95 kb plasmid was compared to avirulent isolates, it was noted that a 3.6 kb plasmid was present in two out of four virulent isolates, while absent in the avirulent isolates (Fig. 1). We therefore sequenced this plasmid. This isolate (#36) had the plasmid profile PL24. The profiling plasmid of the CS isolate showed eight bands with different intensities on the agarose. This isolate was very invasive and it is known that the virulence plasmid of *S. Typhimurium* is implicated in the invasion of epithelial cells (Gulig, 1990).

The plasmid pST36-4-b5 size was 3563 bp. Figure 2 shows the schematic representation of this plasmid. It contained eight open reading frames (ORF) ranging in size from 119 to 725 bp: two ORFs for plasmid mobilization, one ORF for plasmid replication, one ORF with an enzymatic function and four ORFs with genes of unknown functions.

Discussion

In this study, we have tried to identify the DNA fragments present in a CS isolate but absent in a WCS isolate in order to analyze the genetic basis of the differential virulence of these two isolates. We were particularly interested by a subset of highly virulent isolates that, based on preliminary results, did not possess the classical 95 kb plasmid associated with virulence assuming that these isolates would more likely contain new and unknown virulence factors. Using SSH, with one of these isolates and an avirulent isolate, 13 clones were obtained and some sequence homology were found in Genbank. Fragments #1a/1b and #2a/2b showed similarity with genes found on plasmids. The fragments #1a/1b were found in *Erwinia tasmaniensis* Et1/99 plasmid pET09 and the putative function is a DNA restriction subunit type III restriction and modification system. This restriction and modification system is used by bacteria for self-protection purposes against foreign DNA such as bacteriophages. This type of system is nearly ubiquitous among bacteria (Naderer *et al.*, 2002) and it possesses three types of restriction and modification systems : types I, II and III (Wilson, 1991). The other fragments, #2a/2b, were found in *Escherichia coli* SE11 Plasmid pSE11-6 and the putative function indicated that it is a protein involved in replication.

The *emrB* gene has been associated with a multidrug efflux system protein involved in fluoroquinolone resistance. There are several mechanisms for fluoroquinolone resistance in bacteria which the efflux pumps and target alterations.

In *Salmonella*, the role of these mechanisms in emerging fluoroquinolone resistance was observed (Chen *et al.*, 2007). Two studies had used the signature-tagged mutagenesis to assess the role of this gene in colonization. In the first one, no attenuation was found in the intestinal colonization in pigs by *emrA* mutant (Carnell *et al.*, 2007), even if attenuation in the colonization had been observed in calves (Morgan *et al.*, 2004).

The gene *pgtA* (phosphoglycerate transport system transcriptional regulatory protein PgtA) is involved in a two-component regulatory system PgtB/PgtA which regulates the inducible phosphoglycerate transport system associated with glycolyse. PgtA is activated by PgtB and acts in conjunction with sigma-54 as a transcriptional activator. The gene *pgtA* is present in several *Salmonella* including *S. Typhimurium*.

In another study where SSH was used to find distinct sequences between *S. Typhimurium* LT 2 and *S. Typhimurium* DT 104, the authors found that two phage associated sequences were possibly linked with virulence, one of them being involved in macrophage survival (Hermans *et al.*, 2005). Emmerth *et al.* (1999) also used SSH to identify *S. Typhimurium* genes absent in *S. Typhi*. These authors found that the majority of specific insert clones in *S. Typhimurium* were localized in several distinct regions of the genome: on the *S. Typhimurium* virulence plasmid, cryptic prophages located at cs 25 and 57 and the *stf* fimbrial operon (Emmerth *et al.*, 1999). In the present study, the clone #6 (*stbD*) was also related to a putative outer membrane fimbrial usher. *StbCD* mutants have been shown to be responsible for attenuation in the intestinal colonization in pigs (Carnell *et al.*, 2007). In another study, the *stbC*

mutant was found to be involved in intestinal colonization in chicks, but not in the intestinal colonization of calves (Morgan *et al.*, 2004). The presence of this gene could explain the higher invasion rate of the isolates from septicemic pigs. We can speculate that this gene could allow a higher colonization and indirectly facilitate the bacterial invasion of the epithelial cells. Fragments #7 to #13 have unknown functions, although their presence in the virulent strain suggests that they might be linked to putative virulence factors.

Foley *et al.* (2006) characterized *S. Typhimurium* isolates from diseased pigs submitted for diagnosis in the USA ($n = 19$) and isolates collected from healthy pigs at slaughter and processing ($n = 13$). These authors found more isolates without plasmid: nine isolates from diseased and three from healthy pigs in contrast to our observations. In a review, Rychlik *et al.* (2006) underscored the low number *S. Typhimurium* strains without any plasmid. Indeed, we found only one isolate with no plasmid out of the 66 isolates tested in our study. Overall, we found more LMWP (zero to eight) than Foley *et al.* (2006) in pigs. These authors also found more profiles in WCS isolates (11) than in CS isolates (7) (Foley *et al.*, 2006), in contrast to what was observed in our study; we observed 19 different plasmid profiles in CS isolates and 16 different plasmid profiles in WCS isolates. In addition, Foley *et al.* (2006) found only two profiles in both CS and WCS isolates in pigs. Nevertheless only, fewer isolates were characterized in the latter study.

Namimatsu *et al.* (2006) determined the prevalence of the virulence plasmid in porcine isolates of *S. Typhimurium* in Japan. They found that the virulence

plasmid was more frequently present in isolates from pigs with systemic infection (92.0%, 23/25), compared with diarrheic pigs (18.8%, 12/64) and apparently healthy pigs (17.6%, 3/17). They concluded that the virulence plasmid was observed more frequently in pigs with systemic infection ($P < 0.01$) (Namimatsu *et al.*, 2006). In our study, we also found more HMWP in isolates from CS than isolates from WCS (32/33 vs 22/33) ($P = 0.003$).

In *Salmonella*, LMWP of less than 20 kb were found only in about 10% of field strains, and are of unknown functions (Rychlik *et al.*, 2006). In contrast, we found LMWP in most isolates (23 plasmid profiles of 26). Some LMWP have been shown to increase resistance to phage infection due to the presence of restriction and modification systems (Rychlik *et al.*, 2006). In general, despite their relative instability, plasmid profiles have been widely used for strain characterization in epidemiological studies (Baggesen *et al.*, 2000, Liebana *et al.*, 2002).

The characterization of pST36-4-b5 indicates that this plasmid carries some genetic information for replication and mobilization, although it does not seem to possess all the information for a functional plasmid mobilization system. Three ORFs, that show similarities with replication and mobilization functions, were found in *S. Typhimurium* and *S. Virchow*. Other ORFs showed similarities with hypothetical proteins found in *Enterobacteriaceae* and a new genus *Sulfitobacter*. The LabA (low-amplitude and bright)-like proteins are a well conserved group of bacterial proteins with no defined function in *Enterobacteriaceae*. In cyanobacteria, the gene *labA* modulates the circadian gene expression by the negative feedback

regulation of KaiC (Taniguchi *et al.*, 2007). Beta-galactosidase- α protein, an hydrolyse enzyme, is involved in aerobic glycolyse for digestion of lactose in glucose and galactose.

The *S. Typhimurium* isolate from septicemic pig characterized in this study possesses several genes that should be further studied for their putative role in virulence. It would also be of interest to characterize other plasmids from the CS isolate. Although, the LMWP have no known function at present, further characterization of these LMWP might be of interest for a better understanding of their putative role in virulence.

Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We would like to thank Dr. J. M. Fairbrother, Dr. S. Messier and Dr. Nancy Rheault for contributing strains. We thank Guillaume Gauthier-Larivière for his technical assistance.

References

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Ausubel FM (1994) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1 (Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Sidman JG, Smith JA & Struhl K, eds.), Chap. 2.4. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York.

Baggesen DL, Sandvang D & Aarestrup FM (2000) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* **38**: 1581-1586.

Berends BR, Van Knapen F, Snijders JM & Mossel DA (1997) Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* **36**: 199-206.

Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F & Quessy S (2010) Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine. *Can J Vet Res.* (in press).

Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F & Quessy S (2009) Interaction between host cells and septicemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pigs. *J Clin Microbiol* **47**: 3413-3419.

Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H & Mulvey MR (2001) Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol* **183**: 5725-5732.

Briggs CE & Fratamico PM (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 846-849.

Carnell SC, Bowen A, Morgan E, Maskell DJ, Wallis TS & Stevens MP (2007) Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **153**: 1940-1952.

Chen S, Cui S, McDermott PF, Zhao S, White DG, Paulsen I & Meng J (2007) Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 535-542.

Emmerth M, Goebel W, Miller SI & Hueck CJ (1999) Genomic subtraction identifies *Salmonella typhimurium* prophages, F-related plasmid sequences, and a novel fimbrial operon, stf, which are absent in *Salmonella typhi*. *J Bacteriol* **181**: 5652-5661.

Foley SL, Lynne AM & Nayak R (2008) *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* **86**: E149-162.

Foley SL, White DG, McDermott PF, Walker RD, Rhodes B, Fedorka-Cray PJ, Simjee S & Zhao S (2006) Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol* **44**: 3569-3577.

Gebreyes WA & Altier C (2002) Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* **40**: 2813-2822.

Gebreyes WA, Altier C & Thakur S (2006) Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiol Infect* **134**: 187-198.

Gulig PA (1990) Virulence plasmids of *Salmonella typhimurium* and other salmonellae. *Microb Pathog* **8**: 3-11.

Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A & Bulling E (1985) Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* **48**: 175-182.

Hermans AP, Abee T, Zwietering MH & Aarts HJ (2005) Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4979-4985.

Herrero M, de Lorenzo V & Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.

Humphrey T (2001) *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* **67**: 173-186.

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Clifton-Hadley FA, Lindsay E, Threlfall EJ, McDowell SW & Davies RH (2002) Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J Clin Microbiol* **40**: 4450-4456.

Miller VL & Mekalanos JJ (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583.

Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, Barrow PA, Maskell DJ & Wallis TS (2004) Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**: 994-1010.

Naderer M, Brust JR, Knowle D & Blumenthal RM (2002) Mobility of a restriction-modification system revealed by its genetic contexts in three hosts. *J Bacteriol* **184**: 2411-2419.

Namimatsu T, Asai T, Osumi T, Imai Y & Sato S (2006) Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella* Typhimurium isolates from pigs. *J Vet Med Sci* **68**: 187-188.

Rychlik I, Gregorova D & Hradecka H (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **112**: 1-10.

Sambrook J & Russell DW (2001) Preparation of plasmid DNA. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Vol. 1 (Sambrook J, Fritsh EF & Maniatis T, eds.), pp. 1.32-1.34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Taniguchi Y, Katayama M, Ito R, Takai N, Kondo T & Oyama T (2007) LabA: a novel gene required for negative feedback regulation of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. *Genes Dev* **21**: 60-70.

Wilson GG (1991) Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res* **19**: 2539-2566.

Table 1. Description of specific primers used in the sequencing of SSH derived clone inserts of *S. Typhimurium* isolate (#36) or plasmid (pST36-4-b5)

| Primer | Length (nt) | Sequence |
|--------------|-------------|-----------------------------|
| PCR2.SpeI -F | 18 | 5'-GTAACGGCCGCCAGTGTG-3' |
| PCR2.Xba -R | 20 | 5'-CGCCAGTGTGATGGATATCT-3' |
| Kan out | 20 | 5'-AGTTTCATTTGATGCTCGAT-3' |
| pLOF-F1 | 20 | 5'-GATGAATGTTCCGTTGCGCT-3' |
| pLOF-F2 | 20 | 5'-CCTAGGCGGCCACGCGTATT-3' |
| pLOF-out | 19 | 5'-CGGCGGCCGCACGCGTATT-3' |
| 1b6-1 | 20 | 5'-TCTGATTGTATTGATAACGC-3' |
| 1b6-2 | 20 | 5'-AACAAACCACC CGAAAAACT-3' |
| 1b6-3 | 20 | 5'-TGCTGCATCATCGCCTCTTT-3' |
| 1b6-4 | 20 | 5'-CTTCTTCCGGATTACCCTGA-3' |
| 1b6-5 | 19 | 5'-ATGCCGGGAGCAGACAAGC-3' |
| 2b3-1 | 20 | 5'-TGAGGGTGAGCAGGGAGGTA-3' |
| 2b3-2 | 20 | 5'-TGAGCTGGAAATCGACGGGG-3' |
| b3-3 | 20 | 5'-CCTGTTGGAGGAAAACCCCG-3' |
| 2b3-4 | 20 | 5'-GTACCGCAGTCACTGGATTT-3' |
| 2b3-5 | 20 | 5'-GCTGTTGCGAATCATTAGTT-3' |
| 2b3-6 | 19 | 5'-TTTTGTGATGCTCGTCAGG-3' |
| 4b5-1 | 20 | 5'-ACGCATTTGCCCAAATGTT-3' |
| 4b5-2 | 20 | 5'-ATTGTAATAGCGTGCATGTA-3' |
| 4b5-3 | 20 | 5'-CCTTTCTCCCTTCGGGAAGC-3' |

| | | |
|-------|----|----------------------------|
| 4b5-4 | 20 | 5'-GCACGTTACATTCTTTTTTT-3' |
| 4b5-5 | 20 | 5'-AGCTTTATTACCAGTCTCTT-3' |

Table 2. SSH insert clones identified in CS isolate but not in WCS isolate of *S. Typhimurium*

| Clone | Length (bp) | Similarity (%) | e-value | Potential product | Potential function | Source and reference number |
|--------------------------|-------------|------------------|-------------|----------------------------|--|---|
| 1a* | 473 | 351/394 (89) | $4e^{-134}$ | Gene res, similar to L1aFI | DNA restriction subunit type III restriction and modification system | <i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99 plasmid pET09 NC_010695.1 |
| 1b | 283 | 173/189 (91) | $1e^{-66}$ | Idem | Idem | Idem |
| 2a* (2X) [†] | 371 | 267/307 (86) | $6e^{-81}$ | Gene ECSE | Replication protein | <i>Escherichia coli</i> SE11 Plasmid pSE11-6 NC_011411.1 |
| 2b | 337 | 249/274 (90) | $9e^{-89}$ | _____ | ECSE-P6-0002 hypothetical protein | Idem |
| 3 | 215 | 135/135 (100) | $6e^{-64}$ | Gene emrB | Multidrug resistance protein B | <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar 4,[5],12:i str CVM23701 NZ_ABAO10000014.1 |
| 4 | 302 | 215/217 (99) | $2e^{-105}$ | Gene pgtA | Phosphoglycerate transport system transcriptional regulatory | <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar 4,[5],12:i str CVM23701 |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|------|-----------------|-------------|-----------|--|---|
| 5 | 393 | 255/287 (88) | $3e^{-94}$ | _____ | protein PgtA SeAg_B2805 hypothetical protein | NZ_ABAO0100020.1 <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Agona str SL483 NC_011149.1 |
| 6 | 379 | 306/309 (99) | $3e^{-154}$ | Gene stbD | Putative fimbrial usher | <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> serovar Saintpaul str SARA23 NZ_ABAM02000001.1 |
| 7 [§] (6X) [†] | 280 | 31/32 (96) | $6e^{-5}$ | _____ | _____ | Gemmata obscuriglobus UQM2249 ABGO01000767.1 |
| 8 [§] (4X) [†] | 287 | | | NSS | NSS | |
| 9 | 281 | | | NSS | NSS | |
| 10 | 1376 | | | NSS | NSS | |
| 11 | 855 | | | NSS | NSS | |
| 12 | 430 | | | NSS | NSS | |
| 13 | 448 | | | NSS | NSS | |

NSS, no significant similarity found.

*Clones having a continuation.

[†]Number of identical insert clones for this potential function.

[§]Possibility that these clones have a continuation with 1a and 1b and/or 2a and 2b.

Table 3. Plasmid profiles, number and description of each plasmid profile from *S.*

Typhimurium isolates from pigs

| Plasmid profile | No. of plasmids in each profile | Description of plasmids* | No. of DT 104 isolates | | No. of other phage type isolates | |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
| | | | CS isolates | WCS isolates | CS isolates | WCS isolates |
| | | | PL1 | 0 | | |
| PL2 | 1 | 1-LMWP | | | 1 | 1 |
| PL3 | 1 | 1-HMWP | | | 1 | 2 |
| PL4 | 2 | 1-HMWP and 1-LMWP | | | 1 | |
| PL5 | 2 | 1-HMWP and 1-LMWP | | | 2 | |
| PL6 | 2 | 2-HMWP | | 1 | 1 | 1 |
| PL7 | 2 | 1-HMWP and 1-LMWP | | | 4 | 2 |
| PL8 | 3 | 2-HMWP and 1-LMWP | | | 1 | 2 |
| PL9 | 3 | 2-HMWP and 1-LMWP | | | | 3 |
| PL10 | 3 | 2-HMWP and 1-LMWP | | | 1 | 1 |
| PL11 | 3 | 2-HMWP and 1-LMWP | | | 1 | |
| PL12 | 4 | 2-HMWP and 2-LMWP | | | 1 | |
| PL13 | 4 | 1-HMWP and 3-LMWP | 4 | 1 | 1 | |
| PL14 | 4 | 4 -LMWP | | 5 | | |
| PL15 | 4 | 1-HMWP and 3-LMWP | 2 | 1 | | |
| PL16 | 4 | 2-HMWP and 2-LMWP | | | 1 | |
| PL17 | 5 | 1-HMWP and 4-LMWP | | | 1 | |
| PL18 | 5 | 2-HMWP and 3-LMWP | 2 | | | |

| | | | | | | |
|------|---|-------------------|---|---|---|---|
| PL19 | 5 | 5-LMWP | | 1 | | |
| PL20 | 5 | 1-HMWP and 4-LMWP | 4 | 7 | 1 | 1 |
| PL21 | 6 | 6-LMWP | | | | 1 |
| PL22 | 6 | 1-HMWP and 5-LMWP | | | 1 | |
| PL23 | 8 | 8-LMWP | | | | 1 |
| PL24 | 8 | 2-HMWP and 7-LMWP | | | 1 | |
| PL25 | 8 | 1-HMWP and 7-LMWP | | | 1 | |
| PL26 | 9 | 1-HMWP and 8-LMWP | | | | 1 |

*High molecular weight plasmids (> 20 kb) (HMWP) and low molecular weight plasmids (< 20 kb) (LMWP)

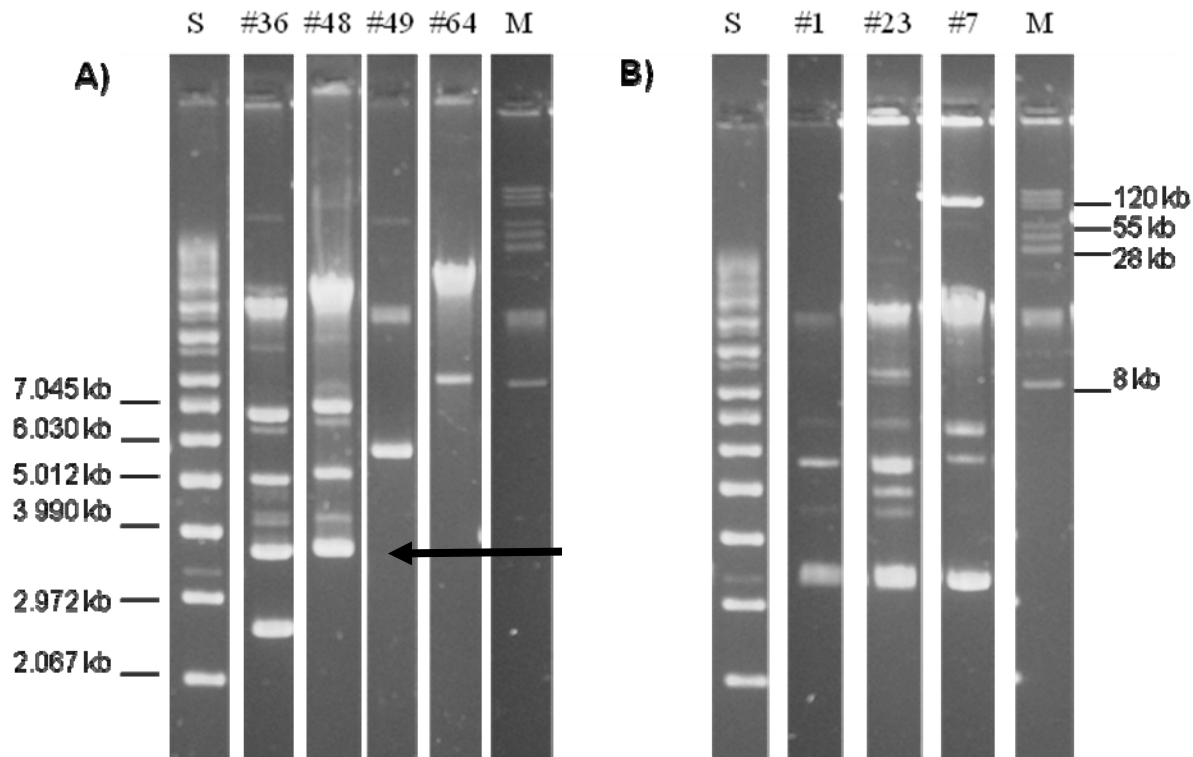


Fig. 1. (A) Plasmid profiles of CS isolates without the virulence plasmid and (B) different plasmid profiles of WCS isolates on 0.8% agarose gel. Two ladders were used Supercoiled DNA Ladder (S) and Marker Bac Tracker Supercoiled DNA Ladder (M). Each lane contains plasmid profile of *S. Typhimurium* isolate. The black arrow represent the sequenced plasmid.

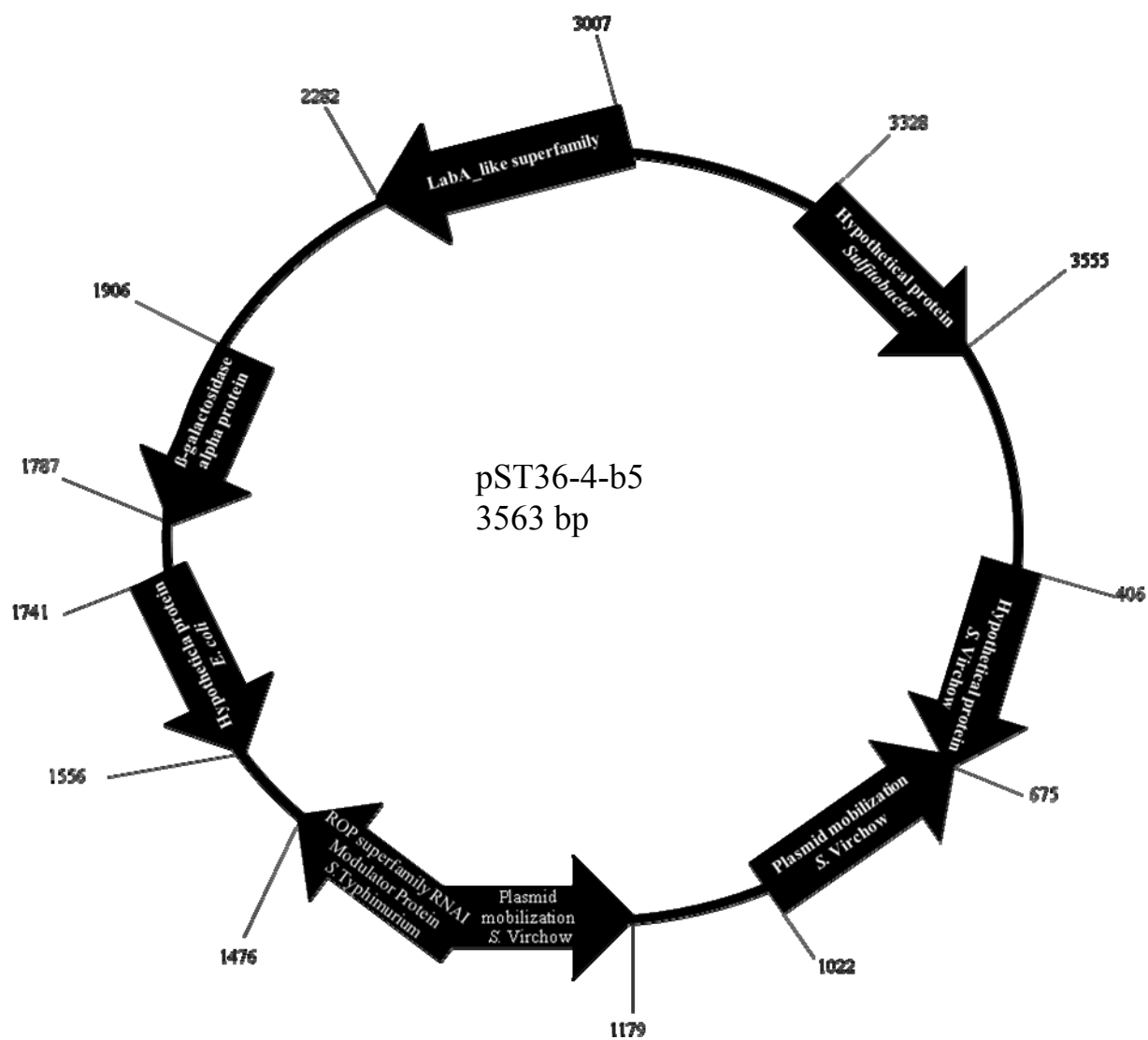


Fig. 2. Map of the *S. Typhimurium* plasmid pST36-4-b5 from CS isolate. The position, orientation, and numbering of the open reading frames are shown by arrows.

CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis quelques années, une nouvelle forme d'épisodes cliniques associés avec *Salmonella* Typhimurium est observée chez l'espèce porcine. Ce sérovar est en effet responsable de septicémies chez des porcs en engraissement (57, 142) en plus de provoquer des signes de gastroentérite chez cette espèce. De plus, les porcs constituent un réservoir de l'infection pour l'humain (20). *S.* Typhimurium, en particulier le lysotype (LT) 104, démontre une multirésistance aux antimicrobiens ce qui représente une préoccupation majeure pour la santé publique et l'industrie porcine. *S.* Typhimurium n'entraîne pas toujours des signes cliniques chez les porcs et ceux-ci peuvent être des porteurs asymptomatiques, ce qui complique l'identification de ces porcs et leur dépistage. Les carcasses peuvent être contaminées parce que les salmonelles persistent plusieurs jours dans les tissus des animaux infectés (49). Il apparaît donc important de contrôler l'infection au niveau du troupeau pour éviter que ces souches ne contaminent les viandes.

Nous avons émis l'hypothèse que les isolats provenant de porcs septicémiques possèdent des gènes de virulence qui ne sont pas présents chez les isolats provenant de porcs cliniquement sains. Dans cette étude, nous avons étudié les étapes importantes de l'infection par les salmonelles : l'adhésion et l'invasion aux cellules épithéliales, la phagocytose et la survie intracellulaire et l'apoptose.

6.1 Choix des isolats

Une banque d'isolats provenant de porcs septicémiques et de porcs sains était déjà disponible dans notre laboratoire. Les isolats retrouvés chez des porcs septicémiques provenaient de porcs ayant eu de la diarrhée ou une septicémie et pour lesquels un diagnostic de salmonellose avait été établi à partir d'observations en pathologie et en bactériologie. L'isolement en culture pure des différents isolats ainsi que des lésions macroscopiques et microscopiques étaient des critères de sélection pour les isolats inclus dans ce groupe (93). Tous ces paramètres nous permettaient d'avancer que ces porcs étaient morts d'une salmonellose.

Les isolats de porcs sains ont été prélevés de ceacum à l'abattoir. Ceux-ci provenaient de porcs n'ayant ni signe clinique ni lésion macroscopique visible à ce moment et provenaient de fermes sans histoire de salmonellose depuis au moins deux ans. Bien qu'il semble raisonnable d'affirmer que la grande majorité de ces isolats soient avirulents, étant donné la faible présence d'épidémies associées avec *S. Typhimurium* au Québec (3 à 6 % des cas ont été diagnostiqués suite à une nécropsie ou une biopsie dans les laboratoires provinciaux chez l'espèce porcine entre 2003 et 2007) (123); ces critères de sélection ne nous permettent pas d'affirmer sans équivoque que ces isolats ne pourraient pas provoquer éventuellement des signes cliniques de salmonellose. En effet, ces isolats peuvent avoir été isolés d'animaux ayant survécu à une infection antérieure ou provenant de porcs démontrant une résistance génétique à *Salmonella* (revu par Boyen *et al* (27)) (140). Une façon possible de confirmer la virulence de ces souches est de vérifier la LD50 chez des

souris. Cependant, cette méthode n'a pas été utilisée dans cette étude parce que les souris ne sont pas un bon modèle pour le porc. En effet, les signes cliniques ne sont pas les mêmes suite à une infection par *S. Typhimurium* chez les souris et les porcs et la pathogénie lors d'une infection septicémique est différente. Les infections à *S. Typhimurium* chez les souris sont surtout utilisées comme modèle pour *S. Typhi* chez l'humain.

Le seul sérovar étudié dans cette étude est Typhimurium. En effet, on remarque de plus en plus de cas de septicémie chez des porcs en engraissement causés par ce sérovar (27, 57, 141). Des études rapportent une plus grande proportion du sérovar Typhimurium chez des animaux à l'abattoir ou lors de programmes de surveillance (7, 247), mais d'autres auteurs rapportent que *S. Typhimurium* peut aussi ne pas être le sérovar le plus prévalent dans une population, mais un des plus importants (142). Dans cette étude, il a été possible de caractériser de nouveaux isolats potentiellement virulents et importants pour la santé publique.

Parmi les différents lysotypes de *S. Typhimurium*, on accorde de plus en plus d'importance au LT 104 comparativement aux autres lysotypes présents chez ce sérovar. En effet, on rapporte dans plusieurs études que ce lysotype est résistant à plusieurs antimicrobiens. De plus, il est reconnu comme étant un pathogène alimentaire fréquent qui possède une plus grande virulence comparé aux autres lysotypes ; certains auteurs ont observé une origine clonale chez des isolats LT 104 (10, 120, 144, 180). Toutes ces raisons nous ont amené à prêter une attention

particulière à ce lysotype et à réaliser des comparaisons entre les isolats LT 104 et les autres lysotypes tout au long de cette étude.

6.2 Protéines immunogènes et vaccination

Dans notre étude, nous avons l'opportunité de comparer les profils protéiques d'isolats provenant de porcs septicémiques avec des isolats de porcs sains pour identifier un ou des facteurs de virulence. Bien qu'il y ait des différences dans les profils de protéines selon les différentes conditions de croissance, il n'a pas été possible d'associer une protéine immunogène en particulier aux isolats septicémiques. Une protéine d'environ 33 kDa a été observée lors de croissance dans des conditions limitées en fer. Une protéine d'environ 37 kDa était aussi présente chez tous les isolats septicémiques et chez la plupart des animaux sains. Celle-ci a été fortement reconnue par l'antisérum porcin dans toutes les conditions de croissance étudiées (chapitre 1). L'antisérum porcin provenait de cinq porcs qui ont été injectés de façon intra-musculaire une fois par semaine pendant six semaines avec un isolat de *S. Typhimurium* LT 104 provenant d'un porc septicémique. Le sang de ces porcs a été récolté une semaine après la dernière injection.

La protéine d'environ 37 kDa pourrait être considérée pour la production d'un vaccin et serait intéressante puisqu'elle est présente chez les deux types d'isolats et dans toutes les conditions de croissance. Des essais vaccinaux pourraient être réalisés en inoculant des porcs avec une souche virulente de *S. Typhimurium*. Un bon vaccin permettrait de diminuer les signes cliniques et le portage asymptomatique chez les

porcs et la transmission aux humains. De plus, en utilisant un vaccin sous-unitaire à base de protéines et non un vaccin vivant modifié, on pourrait éliminer les risques de retour à la virulence par *S. Typhimurium*. On pourrait notamment utiliser cette protéine dans des vaccins oraux, ce qui est la méthode de choix pour favoriser l'immunité mucoale et systémique (93).

Le vaccin idéal contre *S. Typhimurium* n'existe pas encore, mais il devrait prévenir : 1) la colonisation, 2) l'excrétion de *Salmonella* dans l'environnement, 3) le développement de porteurs et 4) la salmonellose clinique et promouvoir l'élimination des *Salmonella* chez les porcs infectés (104). Dans cette étude, nous avons évalué différentes conditions, mimant les différents milieux rencontrés par la bactérie lors de l'infection, pour détecter une protéine immunogène qui pourrait être administrée oralement afin de protéger le porc contre les infections à *Salmonella*. De plus, dans notre laboratoire, un véhicule de livraison membranaire a été mis au point permettant à la protéine vaccinale de se rendre aux plaques de Peyer en passant le milieu acide plus facilement (56). Des microphères d'acide poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) seraient le véhicule de livraison membranaire. La protéine est donc encapsulée dans les microphères polymériques pour permettre à la protéine d'atteindre les cellules M des plaques de Peyer (146). Les particules de 10 μm et moins peuvent atteindre les plaques de Peyer (62). Un relâchement continu et soutenu de l'antigène encapsulé permet une stimulation du système immunitaire.

Le SDS-PAGE est une manière de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Nous l'avons choisi parce que c'est une technique facile, rapide et peu

dispendieuse pour cibler des protéines immunogènes associées à la virulence. Nous sommes toutefois conscients que la méthode du SDS-PAGE a ses limites. En effet, selon le pourcentage du gel de polyacrylamide, les protéines auront une séparation différente et seulement certaines protéines, selon leur poids, seront présentes. Nous avons donc fait des essais préliminaires avec la spectrométrie de masse pour évaluer une plus grande proportion de protéines. Cependant, les résultats préliminaires ont été décevants. Les profils observés par cette technique n'ont pas relevé de différences marquées associées aux différents groupes d'isolats. Nous avons donc décidé de ne pas investiguer d'autres techniques telle l'électrophorèse en 2D, mais plutôt se tourner vers des méthodes génotypiques.

6.3 Caractérisation des isolats

Pour caractériser les différents isolats de *S. Typhimurium*, il est recommandé d'utiliser plusieurs méthodes phénotypiques et génotypiques. De façon générale, il existe une faible corrélation entre les différentes méthodes phénotypiques et génotypiques utilisées pour *Salmonella* (75, 144). Il faut donc choisir plus d'une techniques pour différencier les souches, spécialement en présence d'isolats qui semblent avoir la même origine (10, 75, 144, 231). Dans notre étude, nous avons utilisé plusieurs méthodes phénotypiques et génotypiques, soit pour différencier les isolats présents dans la banque.

Le profil de résistance aux antimicrobiens n'est pas considéré comme une technique performante de discrimination pour séparer les isolats comparé à d'autres

méthodes de typage moléculaire (75). Cependant, en le combinant avec d'autres techniques, il peut être utile dans l'évaluation d'un ensemble d'isolats.

Le nombre de résistance aux antimicrobiens chez *S. Typhimurium* LT 104 a augmenté depuis les dernières années occasionnant une problématique à la fois chez les humains et les animaux. Plusieurs études réalisées dans différentes régions géographiques ont rapporté que la très grande majorité des isolats de *S. Typhimurium* LT 104 sont résistants à l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et la tétracycline (50, 75, 82, 89, 117, 120, 170, 180, 233). Il est décrit que les gènes codant pour la pentarésistance chez les isolats LT 104 sont situés sur le chromosome, localisé dans des intégrons et donc rarement transmissible (120, 192, 209, 233). L'origine de l'ADN qui contient les gènes codant pour la pentarésistance est inconnue ; des études précédentes ont suggéré une dissémination clonale de *S. Typhimurium* LT 104 dans la population (10, 144, 170, 192). Nos résultats suggèrent par contre que plus qu'une lignée génétique peut être retrouvée chez les isolats LT 104 chez les porcs au Québec, particulièrement chez des animaux en bonne santé. Dans notre étude, le phénotype de la pentarésistance est présent chez 90 % des isolats LT 104.

Parmi les méthodes génotypiques, le PFGE est considéré comme la méthode de référence pour déterminer l'empreinte de l'ADN chez *Salmonella* et chez d'autres pathogènes alimentaires (228). L'utilisation du PFGE avec l'enzyme *Xba*I est considérée comme un bon outil épidémiologique pour *S. Typhimurium* (60). Le pouvoir de discrimination de la méthode peut être augmenté pour mieux discriminer

les isolats de *Salmonella* en utilisant deux enzymes ou plus pour les analyses de PFGE (193). Par contre, quelques auteurs ont mentionné que le PFGE n'a pas un pouvoir discriminant suffisant pour distinguer les différents lysotypes (254). Nous aurions pu utiliser la méthode du MLST (*Multilocus Sequence Typing*) comme alternative pour différencier les isolats de *S. Typhimurium*. Le MLST est une méthode de typage moléculaire qui est basé sur les différences alléliques lors du séquençage de gènes conservés parmi les isolats chez une espèce bactérienne (151). Cependant, même si les études ne concordent pas sur le pouvoir de discrimination du MLST, le PFGE est généralement considéré comme plus discriminant. Afin d'augmenter le pouvoir discriminant du MLST, le choix et la quantité des gènes seraient des facteurs importants (65, 75, 221).

D'une manière générale, dans notre étude, le PFGE a été utile pour démontrer une variabilité génétique parmi les isolats de *S. Typhimurium*. Nous avons aussi démontré que quelques groupes génétiques sont associés à des isolats de porcs malades. La présence de plus d'une lignée génétique parmi les isolats de porcs septicémiques suppose que plusieurs lignées peuvent être responsables des épisodes cliniques dans les troupeaux porcins. Ceci est en accord avec les études de Markogiannakis et coll (152). Une étude récente dans notre laboratoire a comparé la variabilité génétique des deux groupes d'isolats à l'intérieur d'un troupeau et une diversité génétique significative des isolats provenant des porcs sains a été observée suggérant qu'une souche virulente s'établisse dans un troupeau et que cette lignée génétique puisse persister pour une période prolongée (177). De plus, la présence de groupes génétiques communs chez les deux types d'isolats (ASC vs SSC) pourrait

être expliqué par le transport jusqu'à la période d'abattage par des isolats de porcs septicémiques qui persistent chez des animaux suivant la convalescence.

6.4 Pathogénie des infections à *Salmonella*

Le patron d'infection de l'hôte par *Salmonella* débute par l'ingestion orale de la bactérie qui doit traverser l'acidité gastrique de l'estomac et la couche muqueuse recouvrant les cellules épithéliales pour envahir celles-ci et causer une maladie (248). Le mucus intestinal sert de site initial de liaison qui peut être réversible ou non. Les premières étapes dans l'infection au niveau intestinal sont l'adhésion et l'invasion de *Salmonella* aux cellules épithéliales de l'hôte. L'invasion des cellules épithéliales est une étape importante chez les souches virulentes de *Salmonella* permettant une infection de l'hôte (28).

Après l'invasion, *Salmonella* atteint les tissus lymphoïdes sous-épithéliaux et la lamina propria où elle rencontre les cellules immunitaires de l'hôte (166). *Salmonella* entre dans les macrophages par phagocytose, ce processus peut-être divisé en deux étapes : adhésion aux phagocytes et ingestion de la bactérie adhérente. Les salmonelles qui entrent dans les macrophages par phagocytose sont capables de réplication intracellulaire (166) et d'induire l'apoptose (241). En survivant dans les phagocytes, *Salmonella* peut induire une septicémie chez les porcs et les humains. Nous avons étudié, dans cette étude, l'ensemble de ces étapes pour déterminer à quelle étape pouvait se différencier les isolats septicémiques des isolats nonsepticémiques.

Dans notre étude, aucune différence n'a pu être observée entre les deux groupes lors de l'adhésion de *S. Typhimurium* aux cellules épithéliales et cette observation est en accord avec la littérature. L'adhésion apparaît donc plutôt comme une étape de préparation à l'étape cruciale qui serait l'invasion chez le porc et ne semble pas déterminante dans le processus de l'infection par les isolats virulents.

Les isolats de porcs septicémiques ont envahi les cellules intestinales épithéliales humaines à un taux plus élevé que les isolats de porcs sains. Ces résultats suggèrent que l'invasion est une étape cruciale dans la pathogénie de *S. Typhimurium* chez le porc. Quand les isolats réussissent à envahir les cellules épithéliales, le système immunitaire du porc n'est plus en mesure de gérer l'invasion par les bactéries et une maladie se produit chez le porc. Une étude a démontré que l'adhérence est faite préférentiellement aux cellules M et que l'invasion apicale se produit dans les cellules M, les entérocytes et les cellules à gobelets (161). L'entrée des *Salmonella* dans les cellules épithéliales se fait via les cellules M comme *Yersinia*, *Listeria* et *Shigella* (48). *Salmonella* et *Shigella* utilisent le *trigger mechanism*, il s'agit d'un SST3 qui permet l'activation des composés du cytosquelette par la sécrétion d'effecteurs bactériens. Chez *Salmonella*, le SST3 est codé par le SPI-1 et chez *Shigella* par un îlot de pathogénicité situé sur un plasmide (48). *Yersinia* et *Listeria* utilisent le *zipper mechanism*, ce mécanisme consiste à utiliser des protéines d'adhérence cellulaires transmembranaires comme des récepteurs pour entrer dans les cellules des mammifères (48).

Cependant, quelques isolats isolés de porcs cliniquement sains possèdent également un taux élevé d'invasion, suggérant que les animaux sains peuvent transporter des isolats potentiellement virulents. Il est aussi possible que certains isolats ayant un potentiel de septicémie soient retrouvés chez des animaux en santé. Il existe toujours la possibilité d'une résistance génétique chez certains porcs pour *Salmonella*, ce sujet sera discuté plus loin. Une autre possibilité est la contamination pendant le transport ou la période d'attente à l'abattoir.

Les isolats ASC sont moins phagocytés à 15 minutes par les monocytes porcins que les isolats SSC. Ceci suggère que la phagocytose serait retardée chez les isolats septicémiques et on peut émettre l'hypothèse que les isolats utiliseraient ce délai pour se multiplier et se disperser dans les tissus environnants. Une étude compare les interactions entre *S. Typhimurium* et des cellules phagocytaires chez le porc (190). Celle-ci rapporte que des isolats de *S. Typhimurium*, isolés de porcs ayant une infection sous-clinique et tués à la chaleur avant de procéder à la phagocytose, démontre une augmentation du taux de phagocytose entre 15 et 40 minutes. Par contre, la même expérience avec des particules de zymosan démontre une faible augmentation du taux de phagocytose dans le temps et la plupart des particules sont ingérées à 15 minutes. On pourrait aussi éventuellement étudier le rôle des neutrophiles de façon plus approfondie puisqu'une étude rapporte que chez des souris infectées par *S. Typhimurium*, *Salmonella* est présente dans les neutrophiles, mais se réplique aussi dans ces cellules (84).

Les isolats ASC sont plus phagocytés par les monocytes humains que les isolats SSC à tous les temps. Ces observations pourraient être associées au fait qu'environ 5% des individus avec une gastroentérite par une *Salmonella* non-typhoïde vont développer une bactériémie. Le système immunitaire de l'homme serait plus efficace pour reconnaître les isolats les plus virulents de *S. Typhimurium*. De plus, les bactériémies se développent principalement chez les patients immunocompromis et ils sont plus à risque de développer des infections locales (113).

La survie dans les macrophages est essentielle pour la virulence de *S. Typhimurium* (71). Certains auteurs, utilisant la culture de macrophages, ont démontré que les isolats invasifs de *S. Typhimurium* envahissent les macrophages dix fois plus que les isolats qui ont un phénotype non-invasif (166). Les isolats de *S. Typhimurium* invasifs peuvent causer une mort cellulaire programmée des macrophages ou l'apoptose, alors que les mutants non-invasifs sont incapables (166). Dans notre étude, nous n'avons remarqué aucune différence entre les deux groupes d'isolats dans leur habilité à induire l'apoptose. Ces résultats suggèrent que le processus d'apoptose n'est pas associé à la virulence chez les isolats de *S. Typhimurium* qui induisent la maladie chez les porcs. Nous pouvons spéculer que ces isolats prennent plutôt avantage de la réplication intracellulaire et utilisent ce mécanisme pour se disperser dans l'hôte.

La liaison au mucus intestinal a aussi été étudiée puisque cette étape est décrite comme étant importante dans le processus de colonisation. Une étude indique

que les isolats virulents et avirulents de *S. Typhimurium* sont capables de lier le mucus intestinal chez des rats : chez cette espèce animale, la souche virulente montre une liaison six fois plus importante comparé aux souches avirulentes (248). Les auteurs proposent que les salmonelles virulentes sont avantagées lors de la présence d'une interaction spécifique avec le mucus, ce qui favorise la colonisation des cellules épithéliales. Nos résultats suggèrent que chez le porc, la colonisation au mucus intestinal n'est pas une étape qui favoriserait l'invasion.

La méthode MATS est utilisée pour évaluer les propriétés électron donneur/électron accepteur (acide-base) des bactéries. De plus, cette méthode est utile pour confirmer l'adhésion à une interface étant le résultat d'un échange entre les interactions de van der Waals, acide-base de Lewis et électrostatiques (17). Les isolats possèdent une plus grande affinité pour le chloroforme, un solvant acide, dû au caractère basique de la bactérie. Ce caractère basique peut être attribué à la présence de groupes carboxyliques à la surface microbienne (17) ou encore à la charge négative à la surface des microorganismes. De plus, la plupart des bactéries que l'on rencontre dans la nourriture sont chargées négativement ($\text{pH} < 7$) (178). Le fait que les deux types d'isolats semblent posséder des propriétés de surface similaires suggère que la virulence de *S. Typhimurium* chez les porcs n'est pas liée à la variation de leurs propriétés de surface.

Il est fort possible que la virulence de *S. Typhimurium* soit affectée par une combinaison de facteurs présents chez la bactérie et les cellules de l'hôte. Lacey et

coll ont remarqué chez les porcs que certains phénotypes du complexe majeur d'histocompatibilité favorise l'assimilation et la mort de *S. Typhimurium* (133).

La résistance naturelle associée aux protéines des macrophages (NRAMP1) est rapportée et jouerait un rôle dans le contrôle de la croissance de plusieurs pathogènes intracellulaires. Chez les porcs, NRAMP1 est très exprimée dans les macrophages et les neutrophiles suite à une stimulation avec le LPS (267) et cette protéine est significativement augmentée dans les nœuds lymphatiques de porcs inoculés avec *S. Typhimurium* (240, 251). Présentement, aucun gène de résistance contre les infections à *Salmonella* n'a été identifié et il n'y a aucune lignée porcine qui semble plus sensible aux infections à *Salmonella*.

6.5 Le porc comme modèle d'infection pour l'humain

Les signes cliniques et les lésions observés suggèrent que le porc infecté par *S. Typhimurium* pourrait être utilisé comme modèle d'infection chez l'humain. En effet, les salmonelles non-typhoïdes chez l'humain peuvent causer, tout comme chez le porc, quatre syndromes cliniques différents : une diarrhée, une bactériémie, une infection locale et un état de porteur asymptomatique (90). Les humains immunocompétents présentent habituellement une diarrhée auto-limitante, alors que les humains immunocompromis vont développer une bactériémie. Par exemple, des études rapportent une association entre des patients ayant le VIH et des signes de bactériémie reliés à *S. Typhimurium* (25, 45, 173). L'absence de diarrhée et la possible pathogénie des septicémies par des salmonelles non-typhoïdes chez des

humains infectés au VIH (90) suggèrent donc que le porc serait un modèle approprié d'infection. Dans notre étude, les cellules phagocytaires porcines et humaines présentent le même comportement dans leur capacité à phagocyter les isolats de *S. Typhimurium*. En effet, les mêmes tendances se dessinent entre les deux types de monocytes, par exemple les isolats les plus phagocytés le sont par les monocytes porcins et humains.

6.6 Étude du génome à l'aide du SSH

À la suite de ces différentes analyses, nous avons obtenu une différence significative pour l'invasion sur des cellules épithéliales intestinales. En effet, les isolats provenant de porcs septicémiques avaient un taux d'invasion plus élevé que les isolats provenant de porcs sains. Nous avons donc décidé de procéder à un criblage différentiel par la méthode SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*). Le SSH a été choisi parce qu'il permet d'analyser tout le génome, et pour la facilité et la rapidité d'exécution. Nous avons aussi tenté d'utiliser la méthode de SCOTS (*Selective Capture of Transcribed Sequences*), qui est une excellente méthode pour comparer tout le génome dans des conditions *in vivo*, mais malgré des essais répétés le cDNA n'était pas complexe. Cela pourrait être dû à la faible quantité de matériel génétique au départ, mais la cause exacte n'a pu être identifiée.

Un sous-groupe d'isolats ASC (#36, #48, #49 et #64) a attiré notre attention parce que ceux-ci ne possédaient pas le plasmide de virulence spécifique à *S. Typhimurium* lors d'une étude préliminaire. De plus, les isolats de ce sous-groupe ne montraient pas de résistance aux antimicrobiens testés (sauf les cinq résistances naturelles) (chapitre 1). Ceci nous permettait d'envisager plus facilement l'identification d'un nouveau gène associé à la virulence et/ou à l'invasion. Un isolat (#36) provenant de ce sous-groupe a été sélectionné pour faire la technique du SSH. Cet isolat était un des plus invasif sur des cellules intestinales épithéliales humaines.

L'isolat le moins invasif (#1) parmi les isolats de porcs sains, a été choisi pour augmenter les chances que cet isolat soit vraiment avirulent malgré la présence de résistance aux antimicrobiens. L'isolat SSC ne possédait pas le plasmide de virulence.

Un des clones mis en évidence par la technique du SSH code pour le gène *pgtA* (*phosphoglycerate transport system transcriptional regulatory protein PgtA*). Ce gène fait partie d'un système de régulation à deux composantes PgtB/PgtA qui règle le système de transport du phosphoglycérate qui est impliqué dans la glycolyse. PgtB active PgtA et il agit en conjonction avec le facteur sigma-54 comme un activateur transcriptionnel. Ce gène est présent chez plusieurs salmonelles dont *S. Choleraesuis* et *S. Typhimurium*. Ce mécanisme impliqué dans la glycolyse devrait être davantage étudié afin de vérifier son importance chez les isolats de porcs

septicémiques. Il pourrait par exemple être associé à l'expression et la régulation d'un facteur de virulence.

Un deuxième clone code pour le gène *stbD* (*putative fimbrial usher*). Une étude rapporte une diminution de la colonisation dans le tractus intestinal chez un modèle porcin d'infection avec des mutants *stbCD* (37). Cette information est très intéressante puisque ce gène pourrait expliquer le taux d'invasion plus élevé chez les isolats de porcs septicémiques. On peut émettre l'hypothèse que même s'il n'y a aucune différence dans l'expression des propriétés de surface, ce gène pourrait permettre une plus grande colonisation et favoriser indirectement l'invasion bactérienne des cellules épithéliales. Chez le porc, les fimbriae de type 1 sont les seuls dont la contribution à l'attachement aux entérocytes et à la colonisation de l'intestin ont pu être démontré (5). L'identification de ce gène *stbD* indiquerait qu'un deuxième fimbria pourrait être impliqué dans la pathogénie chez le porc.

Un autre clone code pour le gène *emrB* (*multidrug efflux system protein*) qui est associé à la résistance aux fluoroquinolones. Dans notre étude, nous avons vérifié la résistance aux antimicrobiens par une méthode phénotypique. Pour évaluer les fluoroquinolones, nous avons testé deux antimicrobiens de cette classe : la ciprofloxacine et l'enrofloxacin. Tous les isolats de notre banque étaient sensibles à ces deux antimicrobiens. Le PICRA classe la ciprofloxacine dans la catégorie I, qui est celle des antimicrobiens de très grande importance en médecine humaine. Pour l'année 2006, aucun isolat n'est résistant à la ciprofloxacine chez les isolats porcins et

humains analysés par le PICRA (91). Il est possible que des isolats possèdent un gène de résistance, mais que le phénotype ne soit pas exprimé à la concentration testée. Ce résultat suggère qu'il faudra continuer à utiliser les antimicrobiens de classe I soit l'amoxicilline-acide clavulanique, le ceftiofur, le ceftriaxone et la ciprofloxacine avec prudence pour éviter l'apparition de résistances. Une étude ne rapporte aucune atténuation dans la colonisation intestinale chez le porc par le mutant *emrA*, même si une atténuation de la colonisation avait été observée chez des veaux (37, 167).

6.7 Les plasmides comme facteurs de virulence

Nous avons aussi trouvé des éléments plasmidiques suite à l'analyse des clones du SSH ; il s'agit, entre autre, d'un système de restriction et de modification de type III. Quelques plasmides de faible poids moléculaire ont été associés avec une augmentation de la résistance lors d'infection par des phages à cause de la présence de systèmes de restriction et de modification (199). Le système de restriction et de modification est presque omniprésent parmi les bactéries (168) et la majorité de celles-ci possèdent plus d'un type de système. Il existe trois types de système de restriction et de modification : types I, II et III (258). Le système de type III possède les protéines R (restriction) et M (modification) qui forment un complexe de restriction et de modification (258). Les gènes pour la restriction et la modification des enzymes semblent toujours être étroitement liés. La fonction principale de ce système de restriction et de modification est de protéger les bactéries de l'ADN

étranger comme les bactériophages (ce système pourrait être comparé au système immunitaire chez les procaryotes). Les endonucléases (protéines R) digèrent l'ADN étranger qui entre dans les bactéries et ainsi assure la protection de la cellule de changements génétiques. Les méthyltransférases (protéines M) modifient l'ADN de la bactérie en la protégeant de digestion semblable (258).

Nous avons ensuite fait l'analyse des profils plasmidiques de tous les isolats pour évaluer la présence de plasmides. Nous avons remarqué que la plupart des isolats de porcs septicémiques (possédant un taux d'invasion plus élevé) avaient un plasmide de haut poids moléculaire compris entre 90 et 165 kb. Par contre, chez les isolats SSC, les dix isolats les moins invasifs ont aussi tous un plasmide de haut poids moléculaire sauf l'isolat ayant le taux d'invasion le plus faible ; ce qui suggère que la présence de plasmides de haut poids moléculaire ne serait pas reliée à la virulence des isolats chez le porc.

Nous avons considéré que les isolats aient pu perdre le plasmide de virulence associé à *S. Typhimurium* pendant leur conservation à -80°C ; cette hypothèse étant toutefois peu probable puisqu'une étude rapporte que des isolats de *Salmonella* ont gardé leurs plasmides lors d'une conservation des isolats à -80°C sur une période de 2.5 ans (174). Dans cette même étude, le plasmide de virulence associé à *S. Enteritidis* est présent chez toutes les colonies examinées à toutes les températures. *S. Choleraesuis* possède un plasmide de virulence spécifique de 50 kb, l'isolat #36 a un plasmide de faible intensité d'environ 50 kb. Ce plasmide ne semble pas correspondre

au plasmide de virulence de *S. Choleraesuis* puisque le plasmide de virulence de *S. Choleraesuis* possède des délétions et des mutations au niveau des gènes *tra* ce qui exclus toute conjugaison (105, 199). De plus, ce plasmide n'est pas mobilisable.

Habituellement, chez *Salmonella*, les plasmides de faible poids moléculaire sont trouvés chez seulement 10% des souches de terrain et possèdent des fonctions inconnues (199). Foley et coll ont caractérisé des isolats de *S. Typhimurium* provenant de laboratoires de diagnostic animal ($n = 19$) et des isolats provenant de l'abattoir ($n = 13$) chez des porcs aux États-Unis (75). Ces auteurs ont également trouvé plusieurs isolats n'ayant aucun plasmide. Dans notre étude, nous avons pourtant trouvé des plasmides de faible poids moléculaire chez la plupart des profils plasmidiques (23 profils sur 26). Ceci pourrait expliquer une distribution différente des isolats de *S. Typhimurium* entre le Québec et les États-Unis.

Le sous-groupe de quatre isolats ne possédant pas le plasmide de 95 kb a été comparé aux isolats SSC. Nous avons remarqué la présence d'un plasmide de 3.6 kb qui était présent chez deux des quatre isolats ASC, mais absent chez les isolats SSC. Nous avons donc décidé de séquencer ce plasmide.

La caractérisation du plasmide pST36-4-b5 a démontré que celui-ci possède de l'information génétique pour la réplication et la mobilisation, cependant, il ne semble pas posséder toute les informations pour avoir un système fonctionnel de mobilisation. Les ORFs montrant des similarités avec les fonctions de réplication et

de mobilisation sont retrouvés chez *S. Typhimurium* et *S. Virchow*. Les protéines LabA (*low-amplitude and bright*)-like sont un groupe conservé de protéines bactériennes n'ayant aucune fonction définie chez les *Enterobacteriaceae*. Par contre, chez les cyanobactéria, le gène *labA* régule l'expression des gènes circadiens par une régulation rétroactive négative de KaiC. Finalement, une protéine beta-galactosidase- α , impliquée dans la glycolyse aérobie pour la digestion du lactose en glucose et galactose, se retrouve également sur le plasmide. Il serait intéressant de caractériser les autres plasmides qui se trouvent dans l'isolat ASC (#36) puisque celui-ci est associé à un taux d'invasion élevé et qu'il ne possède pas le plasmide de virulence spécifique à *S. Typhimurium*. De plus, les plasmides de faible poids moléculaire n'ont pas de fonctions connues présentement et la caractérisation de ces plasmides nous permettrait de mieux comprendre leur rôle possible dans la virulence.

CHAPITRE 7. CONCLUSIONS

Le but de ce projet était d'identifier un ou des attributs ou facteurs de virulence potentiels pouvant être impliqué dans l'invasion des tissus par *S. Typhimurium* qui permettrait de développer un vaccin à livraison membranaire ciblée contre les infections à *S. Typhimurium* chez le porc.

D'une manière générale, cette étude a permis d'améliorer les connaissances sur la pathogénie de *S. Typhimurium* chez le porc puisque les données sont moins fréquentes que chez les souris. À notre connaissance, il existe peu d'étude qui ont rapporté des comparaisons entre des isolats de porcs septicémiques et des isolats de porcs sains.

D'une manière spécifique, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- 1- Il n'y a pas de différence notable du point de vue phénotypique et génotypique entre les isolats du lysotype 104 et les autres lysotypes.
- 2- Les isolats du lysotype 104 retrouvés au Québec appartiennent à plusieurs lignées génétiques.
- 3- Les isolats du lysotype 104 ne démontrent pas un pouvoir de virulence plus élevé que les autres lysotypes.
- 4- Les isolats de porcs septicémiques démontrent un taux d'invasion plus élevé que les isolats provenant de porcs sains sur des cellules intestinales humaines.

- 5- Les isolats de porcs septicémiques démontrent un taux plus faible de phagocytose à 15 minutes que les isolats de porcs sains lors de la phagocytose avec des monocytes porcins.

- 6- Le plasmide de virulence spécifique à *S. Typhimurium* n'est pas essentiel à la phase septicémique chez le porc, mais les plasmides de faible poids moléculaire pourraient être impliqués dans la virulence.

Il serait aussi intéressant d'étudier plus en profondeur la protéine de 37 kDa qui est présente chez la majorité des isolats (ASC et SSC) pour confirmer son immunogénicité chez le porc et la possibilité d'être utilisé dans un vaccin mucosal.

Des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer l'importance des clones isolés lors du SSH. En effet, la mutation de ces gènes pourrait indiquer si ceux-ci ont un impact dans la pathogénie des infections à *S. Typhimurium* chez le porc. Des études épidémiologiques sur une banque d'isolats pourraient indiquer la présence ou l'absence de ces gènes. Il sera important de continuer l'investigation sur les plasmides de faible poids moléculaire pour expliquer leur présence en si grande quantité autant chez les isolats ASC que SSC. La présence de gènes sur les clones du SSH et/ou du plasmide de faible poids moléculaire pourraient permettre d'expliquer le taux d'invasion plus élevé chez les isolats provenant de porcs septicémiques.

CHAPITRE 8. BIBLIOGRAPHIE

1. **Ahmed, A. M., Y. Ishida, and T. Shimamoto.** 2009. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *J Appl Microbiol* **106**:402-409.
2. **Ahmer, B. M., M. Tran, and F. Heffron.** 1999. The virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium is self-transmissible. *J Bacteriol* **181**:1364-1368.
3. **Ahmer, B. M., J. van Reeuwijk, P. R. Watson, T. S. Wallis, and F. Heffron.** 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* **31**:971-982.
4. **Allen, G., V.R. Bruce, P. Stephenson, F.B. Satchell, and W.H. Andrews.** 1991. Recovery of *Salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. *J Food Prot* **54**:492-495.
5. **Althouse, C., S. Patterson, P. Fedorka-Cray, and R. E. Isaacson.** 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun* **71**:6446-6452.
6. **Arshad, M. M., M. J. Wilkins, F. P. Downes, M. H. Rahbar, R. J. Erskine, M. L. Boulton, and A. M. Saeed.** 2007. A registry-based study on the association between human salmonellosis and routinely collected parameters in Michigan, 1995-2001. *Foodborne Pathog Dis* **4**:16-25.
7. **Asai, T., H. Esaki, A. Kojima, K. Ishihara, Y. Tamura, and T. Takahashi.** 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first stage of Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (JVARM). *J Vet Med Sci* **68**:881-884.

8. **Ascenzi, J. M., and M. S. Favero.** 2005. Disinfectants and antiseptics, modes of action, mechanisms of resistance and testing, p. 615-653. *In* V. Lorian (ed), Antibiotics in laboratory medicine, Fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
9. **Bager, F., and R. Helmuth.** 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. *Vet Res* **32**:285-290.
10. **Baggesen, D. L., D. Sandvang, and F. M. Aarestrup.** 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* **38**:1581-1586.
11. **Baggesen, D. L., H. C. Wegener, F. Bager, H. Stege, and J. Christensen.** 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev Vet Med* **26**:201-213.
12. **Bairey, M. H.** 1978. Immunization of calves against salmonellosis. *JAVMA* **173**:610-613.
13. **Baquar, N., E. J. Threlfall, B. Rowe, and J. Stanley.** 1994. Phage type 193 of *Salmonella* Typhimurium contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. *FEMS Microbiol Lett* **115**:291-295.
14. **Barnes, D. M., and M. E. Bergeland.** 1968. *Salmonella* Typhisuis infection in Minnesota swine. *JAVMA* **152**:554-564.
15. **Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun* **64**:1862-1865.

16. **Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis, p. 57-72. In C. Wray, A. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI publishing, New York.
17. **Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault, and C. J. Van Oss.** 1996. Microbial adhesion to solvents : a novel method to determine the electron donor/electron acceptor or Lewis acid-base properties of microbials cells. *Colloids Surfaces B : Biointerfaces* **7**:47-53.
18. **Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, and F. Van Knapen.** 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol* **30**:37-53.
19. **Berends, B. R., F. Van Knapen, D. A. Mossel, S. A. Burt, and J. M. Snijders.** 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int J Food Microbiol* **44**:219-229.
20. **Berends, B. R., F. Van Knapen, J. M. Snijders, and D. A. Mossel.** 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int J Food Microbiol* **36**:199-206.
21. **Berk, P. A., R. Jonge, M. H. Zwietering, T. Abee, and J. Kieboom.** 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *J Appl Microbiol* **99**:859-866.
22. **Bhan, M. K., R. Bahl, and S. Bhatnagar.** 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* **366**:749-762.

23. **Boehringer Ingelheim (Canada) Ltée.** (2009). *Vaccin contre Salmonella Choleraesuis, culture vivante avirulente, Enterisol SC-54*. Retrieved November 5, 2009, from <ftp://ftp.boehringer-ingelheim.ca/vetcatalog/734.pdf>.
24. **Botteldoorn, N., M. Heyndrickx, N. Rijpens, K. Grijspeerdt, and L. Herman.** 2003. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J Appl Microbiol* **95**:891-903.
25. **Bottone, E. J., G. P. Wormser, and F. P. Duncanson.** 1984. Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia as an early infection in acquired immunodeficiency syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2**:247-250.
26. **Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng, and M. R. Mulvey.** 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* **189**:285-291.
27. **Boyen, F., F. Haesebrouck, D. Maes, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, and F. Pasmans.** 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* **130**:1-19.
28. **Boyen, F., F. Pasmans, E. Donne, F. Van Immerseel, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2006. Role of SPI-1 in the interactions of *Salmonella* Typhimurium with porcine macrophages. *Vet Microbiol* **113**:35-44.
29. **Boyen, F., F. Pasmans, F. Van Immerseel, E. Donne, E. Morgan, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2009. Porcine *in vitro* and *in vivo* models to assess the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for pigs. *Lab Anim* **43**:46-52.

30. **Boyen, F., F. Pasmans, F. Van Immerseel, E. Morgan, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, A. Decostere, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2006. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microbes Infect* **8**:2899-2907.
31. **Boyen, F., F. Pasmans, F. Van Immerseel, E. Morgan, N. Botteldoorn, M. Heyndrickx, J. Volf, H. Favoreel, J. P. Hernalsteens, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2008. A limited role for SsrA/B in persistent *Salmonella* Typhimurium infections in pigs. *Vet Microbiol* **128**:364-373.
32. **Briggs, C. E., and P. M. Fratamico.** 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:846-849.
33. **Brown, D. J., E. J. Threlfall, and B. Rowe.** 1991. Instability of multiple drug resistance plasmids in *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry. *Epidemiol Infect* **106**:247-257.
34. **Brumme, S., T. Arnold, H. Sigmarsson, J. Lehmann, H. C. Scholz, W. D. Hardt, A. Hensel, U. Truyen, and U. Roesler.** 2007. Impact of *Salmonella* Typhimurium DT104 virulence factors *invC* and *sseD* on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. *Vet Microbiol* **124**:274-285.
35. **Burch, D. G. S., C. O. Duran, and F. M. Aarestrup.** 2008. Guidelines for antimicrobial use in swine, p. 102-125. *In* L. Guardabassi, L. B. Jensen, H. Kruse (ed.), *Guide to antimicrobial use in animals*. Blackwell Publishing, Ames.

36. **Call, D. R., M. S. Kang, J. Daniels, and T. E. Besser.** 2006. Assessing genetic diversity in plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* using a mixed-plasmid microarray. *J Appl Microbiol* **100**:15-28.
37. **Carnell, S. C., A. Bowen, E. Morgan, D. J. Maskell, T. S. Wallis, and M. P. Stevens.** 2007. Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **153**:1940-1952.
38. **Cattoir, V.** 2004. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris)* **52**:607-616.
39. **Chan, K., S. Baker, C. C. Kim, C. S. Detweiler, G. Dougan, and S. Falkow.** 2003. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* **185**:553-563.
40. **Charles, S., E. Trigo, T. Settje, A. Abraham, and P. Johnson.** 1999. Evaluation of a *cya* (*crp-cdt*) *Salmonella* Choleraesuis commercial vaccine to protect against clinical signs caused by and reduce shedding of *Salmonella* Typhimurium in pigs. Presented at the third international symposium on the epidemiology and control of *Salmonella* in pork, Washington, D.C..
41. **Chen, L. M., S. Hobbie, and J. E. Galan.** 1996. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* **274**:2115-2118.
42. **Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2

- type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**:175-188.
43. **Cloekaert, A., and S. Schwarz.** 2001. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet Res* **32**:301-310.
44. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition [CLSI Document M31-A2] Wayne, Pennsylvania.
45. **Clumeck, N., F. Mascart-Lemone, J. de Maubeuge, D. Brenez, and L. Marcelis.** 1983. Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans. *Lancet* **1**:642.
46. **Coe, N. E., and R. L. Wood.** 1992. The effect of exposure to a delta cya/delta crp mutant of *Salmonella* Typhimurium on the subsequent colonization of swine by the wild-type parent strain. *Vet Microbiol* **31**:207-220.
47. **Collier-Hyams, L. S., H. Zeng, J. Sun, A. D. Tomlinson, Z. Q. Bao, H. Chen, J. L. Madara, K. Orth, and A. S. Neish.** 2002. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* **169**:2846-2850.
48. **Cossart, P., and P. J. Sansonetti.** 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**:242-248.
49. **Côté, S., A. Letellier, L. Lessard, and S. Quessy.** 2004. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can J Vet Res* **68**:241-248.

50. **Daly, M., J. Buckley, E. Power, C. O'Hare, M. Cormican, B. Cryan, P. G. Wall, and S. Fanning.** 2000. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* **66**:614-619.
51. **Daly, M., and S. Fanning.** 2000. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* **66**:4842-4848.
52. **Darwin, K. H., and V. L. Miller.** 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**:405-428.
53. **Davies, J., and S. O'Connor.** 1978. Ezymatic modification of aminoglycoside antibiotics : 3-N-acetyltransferase with broad specificity that determines resistance to the novel aminoglycoside apramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **14**:69-72.
54. **Davis, M. A., D. D. Hancock, T. E. Besser, and D. R. Call.** 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* **41**:1843-1849.
55. **de la Cruz, F., and J. Davies.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**:128-133.
56. **Desautels, A.** 2005. Mise au point d'un prototype de vaccin mucosal contre les infections à *Salmonella* chez le porc. Mémoire présenté à l'Université de Montréal, Montréal.

57. **Desrosiers, R.** 1999. Les maladies en émergence chez le porc. *Le Médecin Vétérinaire du Québec* **29**:185-188.
58. **Dlabac, V., I. Trebichavsky, Z. Rehakova, B. Hofmanova, I. Splichal, and B. Cukrowska.** 1997. Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infect Immun* **65**:5238-5243.
59. **Donne, E., F. Pasmans, F. Boyen, F. Van Immerseel, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 2005. Survival of *Salmonella* serovar Typhimurium inside porcine monocytes is associated with complement binding and suppression of the production of reactive oxygen species. *Vet Microbiol* **107**:205-214.
60. **Doran, G., D. Morris, C. O'Hare, N. DeLappe, B. Bradshaw, G. Corbett-Feeney, and M. Cormican.** 2005. Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* **71**:8236-8240.
61. **Drahovska, H., E. Mikasova, T. Szemes, A. Ficek, M. Sasik, V. Majtan, and J. Turna.** 2007. Variability in occurrence of multiple prophage genes in *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Slovak Republic. *FEMS Microbiol Lett* **270**:237-244.
62. **Eldridge, J. H., J. K. Staas, J. A. Meulbroek, T. R. Tice, and R. M. Gilley.** 1991. Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* **59**:2978-2986.

63. **Eriksson, S., S. Lucchini, A. Thompson, M. Rhen, and J. C. Hinton.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**:103-118.
64. **Esaki, H., A. Morioka, A. Kojima, K. Ishihara, T. Asai, Y. Tamura, H. Izumiya, J. Terajima, H. Watanabe, and T. Takahashi.** 2004. Epidemiological characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 prevalent among food-producing animals in the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (1999-2001). *Microbiol Immunol* **48**:553-556.
65. **Fakhr, M. K., L. K. Nolan, and C. M. Logue.** 2005. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* **43**:2215-2219.
66. **Farzan, A., R. M. Friendship, C. E. Dewey, A. C. Muckle, J. T. Gray, and J. Funk.** 2008. Distribution of *Salmonella* serovars and phage types on 80 Ontario swine farms in 2004. *Can J Vet Res* **72**:1-6.
67. **Farzan, A., R. M. Friendship, C. E. Dewey, K. Warriner, C. Poppe, and K. Klotins.** 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Prev Vet Med* **73**:241-254.
68. **Fedorka-Cray, P. J., L. C. Kelley, T. J. Stabel, J. T. Gray, and J. A. Laufer.** 1995. Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium in swine. *Infect Immun* **63**:2658-2664.

69. **Fedorka-Cray, P. J., J. T. Gray, and C. Wray.** 2000. *Salmonella* infections in pigs, p. 191-207. In C. Wray, A. Wray (ed.) *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
70. **Fernandez, J., A. Fica, G. Ebensperger, H. Calfullan, S. Prat, A. Fernandez, M. Alexandre, and I. Heitmann.** 2003. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. *J Clin Microbiol* **41**:1617-1622.
71. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5189-5193.
72. **Figuroa-Bossi, N., and L. Bossi.** 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol Microbiol* **33**:167-176.
73. **Figuroa-Bossi, N., E. Coissac, P. Netter, and L. Bossi.** 1997. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* **25**:161-173.
74. **Finlay, B. B.** 1994. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **192**:163-185.
75. **Foley, S. L., D. G. White, P. F. McDermott, R. D. Walker, B. Rhodes, P. J. Fedorka-Cray, S. Simjee, and S. Zhao.** 2006. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. *J Clin Microbiol* **44**:3569-3577.
76. **Folkesson, A., A. Advani, S. Sukupolvi, J. D. Pfeifer, S. Normark, and S. Lofdahl.** 1999. Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the

- evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol Microbiol* **33**:612-622.
77. **Folkesson, A., S. Lofdahl, and S. Normark.** 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**:537-545.
78. **Fone, D. L., and R. M. Barker.** 1994. Associations between human and farm animal infections with *Salmonella* Typhimurium in Herefordshire. *Commun Dis Rep CDR Rev* **4**:R136-R140.
79. **Foster, N., M. A. Lovell, K. L. Marston, S. D. Hulme, A. J. Frost, P. Bland, and P. A. Barrow.** 2003. Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **71**:2182-2191.
80. **Galan, J. E.** 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:53-86.
81. **Garcia-Feliz, C., J. A. Collazos, A. Carvajal, A. B. Vidal, A. Aladuena, R. Ramiro, M. de la Fuente, M. A. Echeita, and P. Rubio.** 2007. *Salmonella enterica* infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses Public Health* **54**:294-300.
82. **Gebreyes, W. A., and C. Altier.** 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* **40**:2813-2822.

83. **Gebreyes, W. A., C. Altier, and S. Thakur.** 2006. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiol Infect* **134**:187-198.
84. **Geddes, K., F. Cruz, and F. Heffron.** 2007. Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* **3**:e196.
85. **Gerner-Smidt, P., K. Hise, J. Kincaid, S. Hunter, S. Rolando, E. Hyytia-Trees, E. M. Ribot, and B. Swaminathan.** 2006. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis* **3**:9-19.
86. **Gianella, R. A., S. A. Broitman, and N. Zamcheck.** 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms : studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut* **13**:251-256.
87. **Ginocchio, C. C., S. B. Olmsted, C. L. Wells, and J. E. Galan.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella* Typhimurium. *Cell* **76**:717-24.
88. **Giraud, E., A. Cloeckert, D. Kerboeuf, and E. Chaslus-Dancla.** 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Tphimurium. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1223-1228.
89. **Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* **338**:1333-1338.
90. **Gordon, M. A.** 2008. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J Infect* **56**:413-422.

91. **Gouvernement du Canada.** (2006). *Programme intégré canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (PICRA), 2006 Guelph (Ontario) : Agence de la santé publique du Canada*, Retrieved October 22, 2009, from <http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/pdf/cipars-picra-2006-fra.pdf>.
92. **Gray, J. T., and P. J. Fedorka-Cray.** 1996. Salmonellosis in swine : a review of significant areas affecting the carrier state. Presented at the the first international symposium on ecology of *Salmonella* in pork production., Ames, Iowa.
93. **Griffith, R. W., K. J. Schwartz, and D. K. Meyerholz.** 2006. *Salmonella*, p. 739-754. In B.E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 9 th Edition. Blackwell Publishing, Ames.
94. **Griggs, D. J., M. C. Hall, Y. F. Jin, and L. J. Piddock.** 1994. Quinolone resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother* **33**:1173-1189.
95. **Grimont, P. A. D., F. Grimont, and P. Bouvet.** 2000. Taxonomy of the genus *Salmonella*, p. 1-17. In A. Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
96. **Guardabassi, L., and P. Courvalin.** 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, p. 1-18. In F. M. Aarestrup (ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, D.C.
97. **Guardabassi, L. and H. Kruse.** 2008. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals, p. 1-12. In L. Guardabassi, L.B. Jensen, and H.

- Kruse (ed.), Guide to Antimicrobial Use in Animals. Blackwell Publishing, Ames.
98. **Guiney, D. G., F. C. Fang, M. Krause, and S. Libby.** 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. FEMS Microbiol Lett **124**:1-9.
 99. **Gulig, P. A., and T. J. Doyle.** 1993. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. Infect Immun **61**:504-511.
 100. **Gunn, J. S., and S. I. Miller.** 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol **178**:6857-6864.
 101. **Guthrie, R. K.** 1992. Taxonomy and grouping of the *Salmonella*, p. 23-40, *In Salmonella*. CRC Press Inc, Boca Raton.
 102. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol **23**:1089-1097.
 103. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol **54**:641-679.
 104. **Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, and A. Decostere.** 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol **100**:255-268.
 105. **Haneda, T., N. Okada, N. Nakazawa, T. Kawakami, and H. Danbara.** 2001. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase

- virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Infect Immun* **69**:2612-2620.
106. **Haraga, A., and S. I. Miller.** 2003. A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun* **71**:4052-4058.
 107. **Heinzelmann, M., M. Scott, and T. Lam.** 2002. Factors predisposing to bacterial invasion and infection. *Am J Surg* **183**:179-190.
 108. **Helander, I. M., I. Kilpelainen, and M. Vaara.** 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella* Typhimurium: a ³¹P-NMR study. *Mol Microbiol* **11**:481-487.
 109. **Helms, M., P. Vastrup, P. Gerner-Smidt, and K. Molbak.** 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg Infect Dis* **8**:490-495.
 110. **Helms, M., J. Simonsen, and K. Molbak.** 2004. Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. *J Infect Dis* **190**:1652-1654.
 111. **Helmuth, R.** 2000. Antibiotic resistance in *Salmonella*, p. 89-106. In A, Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
 112. **Henry, D. P., A. J. Frost, J. L. Samuel, D. A. O'Boyle, and R. H. Thomson.** 1983. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. *J Appl Bacteriol* **55**:89-95.

113. **Hohmann, E. L.** 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* **32**:263-269.
114. **Hoorfar, J., A. Wedderkopp, and P. Lind.** 1996. Comparison between persisting anti-lipopolysaccharide antibodies and culture at postmortem in *salmonella*-infected cattle herds. *Vet Microbiol* **50**:81-94.
115. **Hopkins, K. L., R. H. Davies, and E. J. Threlfall.** 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* **25**:358-373.
116. **Horter, D. C., K. J. Yoon, and J. J. Zimmerman.** 2003. A review of porcine tonsils in immunity and disease. *Anim Health Res Rev* **4**:143-155.
117. **Hosek, G., D. D. Leschinsky, S. Irons, and T. J. Safranek.** 1997. Multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium-United States. *Morbidity Mortality Weekly Report* **46**:308-310.
118. **Hueffer, K., and J. E. Galan.** 2004. *Salmonella*-induced macrophage death: multiple mechanisms, different outcomes. *Cell Microbiol* **6**:1019-1025.
119. **Humphrey, T.** 2000. Public-health aspects of *Salmonella* infection, p. 245-263. In A. Wray, C. Wray (ed.), *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, New York.
120. **Humphrey, T.** 2001. *Salmonella* Typhimurium definitive type 104. A multi-resistant *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* **67**:173-186.
121. **Hurd, H. S., J. K. Gailey, J. D. McKean, and M. H. Rostagno.** 2001. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Am J Vet Res* **62**:1194-1197.

122. **Hurd, H. S., J. D. McKean, I. V. Wesley, and L. A. Karkiker.** 2001. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J Food Prot* **64**:939-944.
123. **Institut National de Santé Animale, Centre Québécois d'Inspection des Aliments et de Santé Animale.** 2007. Revue d'épidémiologie animale du RAIZO.
124. **Intervet Schering-Plough Animal Health, Intervet Canada Corp.** (2009). *Argus SC/ST*. Retrieved Novembre 5, 2009, from <http://ispah.naccvp.com/?u=country&p=msds>.
125. **Jacoby, G. A.** 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 2**:S120-126.
126. **Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore, and J. A. Lake.** 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor Popul Biol* **61**:489-495.
127. **Kauffmann, F.** 1966. On the history of *Salmonella* research. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **201**:44-48.
128. **Kawagoe, K., H. Mine, T. Asai, A. Kojima, K. Ishihara, K. Harada, M. Ozawa, H. Izumiya, J. Terajima, H. Watanabe, E. Honda, T. Takahashi, and T. Sameshima.** 2007. Changes of multi-drug resistance pattern in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci* **69**:1211-1213.
129. **Keteran, K., J. Brown, and Jr. E. B Shotts.** 1982. *Salmonella* in the mesenteric lymph nodes of healthy sows and hogs. *Am J Vet Res* **43**:706-707.
130. **Kraehenbuhl, J. P., and M. R. Neutra.** 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:301-332.

131. **Kramer, T. T., M. B. Roof, and R. R. Matheson.** 1992. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. *Am J Vet Res* **53**:444-448.
132. **Kranker, S., L. Alban, J. Boes, and J. Dahl.** 2003. Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *J Clin Microbiol* **41**:2282-2288.
133. **Lacey, C., B. N. Wilkie, B. W. Kennedy, and B. A. Mallard.** 1989. Genetic and other effects on bacterial phagocytosis and killing by cultured peripheral blood monocytes of SLA-defined miniature pigs. *Anim Genet* **20**:371-381.
134. **Lailier, R., F. Grimont, Y. Jones, P. Sanders, and A. Brisabois.** 2002. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathol Biol (Paris)* **50**:361-368.
135. **Le Minor, L.** 1984. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900, 389, p. 427-458. *In* N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, London.
136. **Le Minor, L., and M. Y. Popoff.** 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol* **37**:465-468.
137. **Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, and J. W. Foster.** 1995. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* **17**:155-167.

138. **Lesnick, M. L., N. E. Reiner, J. Fierer, and D. G. Guiney.** 2001. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**:1464-1470.
139. **Letellier, A., S. Messier, L. Lessard, S. Chénier, and S. Quessy.** 2001. Host response to various treatments to reduce *Salmonella* infections in swine. *Can J Vet Res* **65**:168-172.
140. **Letellier, A., S. Messier, L. Lessard, and S. Quessy.** 2000. Assessment of various treatments to reduce carriage of *Salmonella* in swine. *Can J Vet Res* **64**:27-31.
141. **Letellier, A., S. Messier, J. Paré, J. Ménard, and S. Quessy.** 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* **67**:299-306.
142. **Letellier, A., S. Messier, and S. Quessy.** 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. *J Food Prot* **62**:22-25.
143. **Libby, S. J., T. A. Halsey, C. Altier, J. Potter, and C. L. Gyles.** 2004. *Salmonella*, p. 143-167. In C. L. Gyles, J. F. Prewscott, J. G. Songer, and C.O. Thoen, (ed.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Blackwell Publishing, Ames.
144. **Liebana, E., L. Garcia-Migura, C. Clouting, F. A. Clifton-Hadley, E. Lindsay, E. J. Threlfall, S. W. McDowell, and R. H. Davies.** 2002. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and

- humans in England, Wales, and Northern Ireland. *J Clin Microbiol* **40**:4450-4456.
145. **Lindstedt, B. A., E. Heir, T. Vardund, and G. Kapperud.** 2000. A variation of the amplified-fragment length polymorphism (AFLP) technique using three restriction endonucleases, and assessment of the enzyme combination *Bgl*III-*Mfe*I for AFLP analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates. *FEMS Microbiol Lett* **189**:19-24.
146. **Liu, W., Y. Yang, N. Chung, and J. Kwang.** 2001. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against *Salmonella* Enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. *Avian Dis* **45**:797-806.
147. **Low, J. C., M. Angus, G. Hopkins, D. Munro, and S. C. Rankin.** 1997. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 isolates and investigation of strains with transferable apramycin resistance. *Epidemiol Infect* **118**:97-103.
148. **Lumsden, J. S., B. N. Wilkie, and R. C. Clarke.** 1991. Resistance to fecal shedding of salmonellae in pigs and chickens vaccinated with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium. *Am J Vet Res* **52**:1784-1787.
149. **Lumsden, J. S., and B.N. Wilkie.** 1992. Immune response of pigs to parenteral vaccination with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium. *Can J Vet Res* **56**:296-302.
150. **Lundberg, U., U. Vinatzer, D. Berdnik, A. von Gabain, and M. Baccarini.** 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage

- apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**:3433-3437.
151. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-3145.
 152. **Markogiannakis, A., P. T. Tassios, M. Lambiri, L. R. Ward, J. Kourea-Kremastinou, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos.** 2000. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. The Greek Nontyphoidal *Salmonella* Study Group. *J Clin Microbiol* **38**:1269-1271.
 153. **Martineau, G. P.** 1997. Contrôle de la pression d'infection : évolutions normale et pathologique, p. 466-469. *In* Maladies d'élevage des porcs. Manuel pratique. Éditions France Agricole, Paris.
 154. **Martineau, G. P.** 1997. La salmonellose à *Salmonella Typhimurium*, p. 40-43. *In* Maladies d'élevage du porc. Éditions France Agricole, Paris.
 155. **Maskell, D. J., and C. E. Hormaeche.** 1986. Genes within the major histocompatibility complex influence the response to ampicillin therapy and severity of relapse in H-2 congenic, susceptible Itys mice infected with virulent *Salmonella* Typhimurium. *J Immunogenet* **13**:451-457.
 156. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E.**

- Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
157. **McCormick, B. A., P. M. Hofman, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1995. Surface attachment of *Salmonella* Typhimurium to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. *J Cell Biol* **131**:1599-1608.
158. **McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray.** 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* **34 Suppl 3**:S93-S106.
159. **Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* **5**:607-625.
160. **Mejia, W., J. Casal, D. Zapata, G. J. Sanchez, M. Martin, and E. Mateu.** 2006. Epidemiology of *Salmonella* infections in pig units and antimicrobial susceptibility profiles of the strains of *Salmonella* species isolated. *Vet Rec* **159**:271-276.
161. **Meyerholz, D. K., T. J. Stabel, M. R. Ackermann, S. A. Carlson, B. D. Jones, and J. Pohlenz.** 2002. Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Vet Pathol* **39**:712-720.
162. **Miao, E. A., C. A. Scherer, R. M. Tsolis, R. A. Kingsley, L. G. Adams, A. J. Baumler, and S. I. Miller.** 1999. *Salmonella* Typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**:850-864.

163. **Mills, D. M., V. Bajaj, and C. A. Lee.** 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.
164. **Miold, S., W. Rabsch, M. Rohde, S. Stender, H. Tschape, H. Russmann, E. Igwe, and W. D. Hardt.** 1999. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* Typhimurium strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9845-9850.
165. **Monack, D. M., W. W. Navarre, and S. Falkow.** 2001. *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* **3**:1201-1212.
166. **Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, and S. Falkow.** 1996. *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9833-9838.
167. **Morgan, E., J. D. Campbell, S. C. Rowe, J. Bispham, M. P. Stevens, A. J. Bowen, P. A. Barrow, D. J. Maskell, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**:994-1010.
168. **Naderer, M., J. R. Brust, D. Knowle, and R. M. Blumenthal.** 2002. Mobility of a restriction-modification system revealed by its genetic contexts in three hosts. *J Bacteriol* **184**:2411-2419.
169. **Nataro, J. P., C. H. Bopp, P. I. Fields, J. B. Kaper, and N. A. Strockbine.** 2007. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*, p. 670-687. In P. R. Murray, E.J.

- Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), Manual of clinical microbiology, 9th Edition, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
170. **Ng, L. K., M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters, and W. Johnson.** 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:3018-3021.
171. **Nielsen, B., L. Alban, H. Stege, L. L. Sorensen, V. Mogelmoose, J. Bagger, J. Dahl, and D. L. Baggesen.** 2001. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **114**:323-326.
172. **Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**:299-304.
173. **Offenstadt, G., P. Pinta, P. Hericord, M. Jagueux, F. Jean, P. Amstutz, S. Valade, and P. Lesavre.** 1983. Multiple opportunistic infection due to AIDS in a previously healthy black woman from Zaire. *N Engl J Med* **308**:775.
174. **Olsen, J. E., D. J. Brown, D. L. Baggesen, and M. Bisgaard.** 1994. Stability of plasmids in five strains of *Salmonella* maintained in stab culture at different temperatures. *J Appl Bacteriol* **77**:155-9.
175. **Pang, T., Z. A. Bhutta, B. B. Finlay, and M. Altwegg.** 1995. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* **3**:253-255.
176. **Parry, C. M., and E. J. Threlfall.** 2008. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis* **21**:531-538.

177. **Perron, G. G., S. Quessy, A. Letellier, and G. Bell.** 2007. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *Infect Genet Evol* **7**:223-228.
178. **Planchon, S., B. Gaillard-Martinie, S. Leroy, M. N. Bellon-Fontaine, S. Fadda, and R. Talon.** 2007. Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiol* **24**:44-51.
179. **Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and L. L. Gheesling.** 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **155**:568-570.
180. **Poppe, C., N. Smart, R. Khakhria, W. Johnson, J. Spika, and J. Prescott.** 1998. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet J* **39**:559-565.
181. **Prouty, A. M., and J. S. Gunn.** 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* **68**:6763-6769.
182. **Proux, K., R. Cariolet, P. Fravalo, C. Houdayer, A. Keranflech, and F. Madec.** 2001. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Res* **32**:591-600.
183. **Public Health Agency of Canada.** (2001). *Salmonella spp. (à l'exception de S. typhi, S. choleraesuis et S. paratyphi) - Fiches techniques santé/sécurité (FTSS)*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds135f-fra.php>.

184. **Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* **70**:2249-2255.
185. **Ravel, A.** 2000. Enquête sur la santé et la salubrité dans les élevages porcins québécois. *Épidémio-Qualité*, mars 2000.
186. **Rayamajhi, N., S. G. Kang, M. L. Kang, H. S. Lee, K. Y. Park, and H. S. Yoo.** 2008. Assessment of antibiotic resistance phenotype and integrons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from swine. *J Vet Med Sci* **70**:1133-1137.
187. **Recchia, G. D., and R. M. Hall.** 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141 (Pt 12)**:3015-3027.
188. **Reed, W. M., H. J. Olander, and H. L. Thacker.** 1986. Studies on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Choleraesuis var kuzendorf infection in weanling pigs. *Am J Vet Res* **47**:75-83.
189. **Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer, 3rd.** 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* **27**:313-320.
190. **Riber, U., and P. Lind.** 1999. Interaction between *Salmonella* Typhimurium and phagocytic cells in pigs. Phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **67**:259-270.

191. **Rice, L. B., and R. A. Bonomo.** 2007. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, p. 1114-1145. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th Edition, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
192. **Ridley, A., and E. J. Threlfall.** 1998. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104. *Microb Drug Resist* **4**:113-118.
193. **Ridley, A. M., E. J. Threlfall, and B. Rowe.** 1998. Genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **36**:2314-2321.
194. **Rodriguez, M., I. de Diego, and M. C. Mendoza.** 1998. Extraintestinal salmonellosis in a general hospital (1991 to 1996): relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical presentations. *J Clin Microbiol* **36**:3291-3296.
195. **Roesler, U., H. Marg, I. Schroder, S. Mauer, T. Arnold, J. Lehmann, U. Truyen, and A. Hensel.** 2004. Oral vaccination of pigs with an invasive *gyrA-cpxA-rpoB* *Salmonella* Typhimurium mutant. *Vaccine* **23**:595-603.
196. **Rosenshine, I.** 1998. Cytoskeletal rearrangements induced by bacterial pathogens, p. 499-507. *In* P. Williams, J. Ketley, and G. Salmon (ed.), *Methods in microbiology*, vol. 27. Academic Press, San Diego.
197. **Roy, M. F., and D. Malo.** 2002. Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun* **3**:381-393.

198. **Ruiz, J., D. Castro, P. Goni, J. A. Santamaria, J. J. Borrego, and J. Vila.** 1997. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *J Med Microbiol* **46**:623-628.
199. **Rychlik, I., D. Gregorova, and H. Hradecka.** 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* **112**:1-10.
200. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. Antimicrobial compounds, p. 150-167. *In* Bacterial pathogenesis : a molecular approach. ASM Press, Washington, DC.
201. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. How bacteria become resistant to antibiotics, p. 168-184. *In* Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D.C.
202. **Salyers, A. A., and D. D. Whitt.** 2002. *Salmonella* species, p. 381-397. *In* Bacterial pathogenesis : a molecular approach. ASM Press, Washington, D.C.
203. **Sanchez, S., C. L. Hofacre, M. D. Lee, J. J. Maurer, and M. P. Doyle.** 2002. Animal sources of salmonellosis in humans. *J Am Vet Med Assoc* **221**:492-497.
204. **Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen.** 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* **160**:37-41.
205. **Santé Canada.** (2005). *Prévention de la salmonellose*. Retrieved October 23, 2009, from http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/alt_formats/pacrb-dgapcr/pdf/iyh-vsv/food-aliment/salmonella-fra.php.

206. **Saroj, S. D., R. Shashidhar, M. Karani, and J. R. Bandekar.** 2008. Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. *J Med Microbiol* **57**:424-427.
207. **Schauser, K., J. E. Olsen, and L. I. Larsson.** 2004. Immunocytochemical studies of *Salmonella* Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells. *J Med Microbiol* **53**:691-695.
208. **Schicklmaier, P., and H. Schmieger.** 1995. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella* Typhimurium complex. *Appl Environ Microbiol* **61**:1637-1640.
209. **Schmieger, H., and P. Schicklmaier.** 1999. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* **170**:251-256.
210. **Schwartz, K. J.** 1991. Diagnosing and controlling *Salmonella* Cholerasuis in swine. *Vet Med* **86**:1041-1048.
211. **Schwartz, S., A. Cloeckert, and M. C. Roberts.** 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents, p. 73-98. *In* F. M. Aarestrup (ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, D. C..
212. **Schwarz, S., and E. Chaslus-Dancla.** 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* **32**:201-225.
213. **Shea, J. E., C. R. Beuzon, C. Gleeson, R. Mundy, and D. W. Holden.** 1999. Influence of the *Salmonella* Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect Immun* **67**:213-219.

214. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2593-2597.
215. **Shi, J., G. Zhang, H. Wu, C. Ross, F. Blecha, and T. Ganz.** 1999. Porcine epithelial beta-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infect Immun* **67**:3121-3127.
216. **Shirazi, T., R. J. Longman, A. P. Corfield, and C. S. Probert.** 2000. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* **76**:473-478.
217. **Sirinavin, S., P. Jayanetra, and A. Thakkinstian.** 1999. Clinical and prognostic categorization of extraintestinal nontyphoidal *Salmonella* infections in infants and children. *Clin Infect Dis* **29**:1151-1156.
218. **Sivapalasingam, S., C. R. Friedman, L. Cohen, and R. V. Tauxe.** 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Prot* **67**:2342-2353.
219. **Smith, R. L., M. T. Kaczmarek, L. M. Kucharski, and M. E. Maguire.** 1998. Magnesium transport in *Salmonella* Typhimurium: regulation of *mgtA* and *mgtCB* during invasion of epithelial and macrophage cells. *Microbiology* **144**:1835-1843.
220. **Soncini, F. C., E. Garcia Vescovi, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella* Typhimurium: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* **178**:5092-5099.
221. **Soyer, Y., A. Moreno Switt, M. A. Davis, J. Maurer, P. L. McDonough, D. J. Schoonmaker-Bopp, N. B. Dumas, T. Root, L. D. Warnick, Y. T.**

- Grohn, and M. Wiedmann.** 2009. *Salmonella* 4,5,12:i:-: an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J Clin Microbiol **47**:3546-3556.
222. **Splichal, I., I. Trebichavsky, Y. Muneta, and Y. Mori.** 2002. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Vet Res **33**:291-297.
223. **Springer, S., T. Lindner, G. Steinbach, and H. J. Selbitz.** 2001. Investigation of the efficacy of a genetically-stabile live *Salmonella* Typhimurium vaccine for use in swine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **114**:342-345.
224. **Stabel, T. J., P. J. Fedorka-Cray, and J. T. Gray.** 2002. Neutrophil phagocytosis following inoculation of *Salmonella* Choleraesuis into swine. Vet Res Commun **26**:103-109.
225. **Stanley, T. L., C. D. Ellermeier, and J. M. Slauch.** 2000. Tissue-specific gene expression identifies a gene in the lysogenic phage Gifsy-1 that affects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium survival in Peyer's patches. J Bacteriol **182**:4406-4413.
226. **Stege, H., J. Christensen, J. P. Nielsen, D. L. Baggesen, C. Enoe, and P. Willeberg.** 2000. Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. Prev Vet Med **44**:175-188.
227. **Sulavik, M. C., M. Dazer, and P. F. Miller.** 1997. The *Salmonella* Typhimurium mar locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. J Bacteriol **179**:1857-1866.

228. **Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter, and R. V. Tauxe.** 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* **7**:382-389.
229. **Tezcan-Merdol, D., T. Nyman, U. Lindberg, F. Haag, F. Koch-Nolte, and M. Rhen.** 2001. Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* **39**:606-619.
230. **The EFSA Journal (2009), 223.** (2009). *The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007.* Retrieved October 22, 2009, from http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Report/zoonoses_report_2007,4.pdf?ssbinary=true.
231. **Threlfall, E. J.** 2000. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother* **46**:7-10.
232. **Threlfall, E. J., and J. A. Frost.** 1990. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. *J Appl Bacteriol* **68**:5-16.
233. **Threlfall, E. J., J. A. Frost, L. R. Ward, and B. Rowe.** 1994. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT 104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet Rec* **134**:577.
234. **Threlfall, E. J., J. A. Frost, L. R. Ward, and B. Rowe.** 1996. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium. *Lancet* **347**:1053-1054.
235. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5638-5642.

236. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:118-125.
237. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3050-3052.
238. **Tukel, C., M. Raffatellu, D. Chessa, R. P. Wilson, M. Akcelik, and A. J. Bäumlner.** 2006. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**:320-329.
239. **United States Department of Agriculture; Economic Research Service; The Economics of Food, Farming, Natural Resources, and Rural America.** (2009). *Data sets: Foodborne illness cost calculator*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>.
240. **Uthe, J. J., A. Royae, J. K. Lunney, T. J. Stabel, S. H. Zhao, C. K. Tuggle, and S. M. Bearson.** 2007. Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol Immunol* **44**:2900-2914.
241. **van der Velden, A. W., S. W. Lindgren, M. J. Worley, and F. Heffron.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun* **68**:5702-5709.
242. **van Loosdrecht, M. C., J. Lyklema, W. Norde, and A. J. Zehnder.** 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* **54**:75-87.

243. **van Winsen, R. L., A. van Nes, D. Keuzenkamp, H. A. P. Urlings, L. J. A. Lipman, S. Biesterveld, J. M. A. Snijders, J. H. M. Verheijden, and F. van Knapen**, 2001. Monitoring of transmission of *Salmonella enterica* serovars in pigs using bacteriological and serological detection methods. *Vet Microbiol* **80**:267-274.
244. **Veldhuizen, E. J., M. Rijnders, E. A. Claassen, A. van Dijk, and H. P. Haagsman**. 2008. Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol* **45**:386-394.
245. **Veldhuizen, E. J., A. van Dijk, M. H. Tersteeg, S. I. Kalkhove, J. van der Meulen, T. A. Niewold, and H. P. Haagsman**. 2007. Expression of beta-defensins pBD-1 and pBD-2 along the small intestinal tract of the pig: lack of upregulation in vivo upon *Salmonella* Typhimurium infection. *Mol Immunol* **44**:276-283.
246. **Vescovi, E. G., Y. M. Ayala, E. Di Cera, and E. A. Groisman**. 1997. Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Biol Chem* **272**:1440-1443.
247. **Vieira-Pinto, M., P. Temudo, and C. Martins**. 2005. Occurrence of *Salmonella* in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**:476-481.
248. **Vimal, D. B., M. Khullar, S. Gupta, and N. K. Ganguly**. 2000. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella* Typhimurium. *Mol Cell Biochem* **204**:107-117.

249. **Volf, J., F. Boyen, M. Faldyna, B. Pavlova, J. Navratilova, and I. Rychlik.** 2007. Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its hilA and ssrA mutants. *Zoonoses Public Health* **54**:286-293.
250. **Wain, J., N. T. Hoa, N. T. Chinh, H. Vinh, M. J. Everett, T. S. Diep, N. P. Day, T. Solomon, N. J. White, L. J. Piddock, and C. M. Parry.** 1997. Quinolone-resistant *Salmonella* Typhi in Viet Nam: molecular basis of resistance and clinical response to treatment. *Clin Infect Dis* **25**:1404-1410.
251. **Wang, Y., L. Qu, J. J. Uthe, S. M. Bearson, D. Kuhar, J. K. Lunney, O. P. Couture, D. Nettleton, J. C. Dekkers, and C. K. Tuggle.** 2007. Global transcriptional response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genomics* **90**:72-84.
252. **Waterman, S. R., and D. W. Holden.** 2003. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**:501-511.
253. **Wegener, H. C., T. Hald, D. Lo Fo Wong, M. Madsen, H. Korsgaard, F. Bager, P. Gerner-Smidt, and K. Molbak.** 2003. *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis* **9**:774-780.
254. **Weill, F. X., F. Guesnier, V. Guibert, M. Timinouni, M. Demartin, L. Polomack, and P. A. Grimont.** 2006. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *J Clin Microbiol* **44**:700-708.
255. **Welliver, R. C., and P. L. Ogra.** 1978. Importance of local immunity in enteric infection. *JAVMA* **173**:560-564.

256. **WHO Global Salm-Surv.** (2009). *Progress report (2000-2005) : Building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response/WHO Global Salm-Surv.* Retrieved October 23, 2009, from <http://www.who.int/salmsurv/links/GSSProgressReport2005.pdf>.
257. **Wilcock, B., and H. Olander.** 1978. Influence of oral antibiotic feeding on the duration and severity of clinical disease, growth performance, and pattern of shedding in swine inoculated with *Salmonella* Typhimurium. *J Am Vet Med Assoc* **172**:472-477.
258. **Wilson, G. G.** 1991. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res* **19**:2539-2566.
259. **Wong, K. K., M. McClelland, L. C. Stillwell, E. C. Sisk, S. J. Thurston, and J. D. Saffer.** 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.
260. **Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, and E. E. Galyov.** 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* **29**:883-891.
261. **Wood, R. L., A. Pospischil, and R. Rose.** 1989. Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res* **50**:1015-1021.
262. **World Health Organization.** (2003). *Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance : Scientific*

- assessment*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/amr.pdf>.
263. **World Health Organization.** (2005). *Fact Sheet no 139*. Retrieved October 23, 2009, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/fr/>.
264. **Wray, C., I. McLaren, R. Wise, and L. J. Piddock.** 1990. Nalidixic acid-resistant salmonellae. *Vet Rec* **126**:489.
265. **Wray, C., and Sojka, W. J.** 1977. Reviews of the progress of dairy science : bovine salmonellosis. *J Dairy Res* **44**:383-425.
266. **Yao, J. D. C., and R. D. Jr. Moellering.** 2007. Antibacterial agents p. 1077-1113. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th Edition, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
267. **Zhang, G., H. Wu, C. R. Ross, J. E. Minton, and F. Blecha.** 2000. Cloning of porcine NRAMP1 and its induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta: role of CD14 and mitogen-activated protein kinases. *Infect Immun* **68**:1086-1093.
268. **Zhang, X., B. McEwen, E. Mann, and W. Martin.** 2005. Detection of clusters of *Salmonella* in animals in Ontario from 1991 to 2001. *Can Vet J* **46**:517-519, 522-523.
269. **Zhao, S., P. F. McDermott, D. G. White, S. Qaiyumi, S. L. Friedman, J. W. Abbott, A. Glenn, S. L. Ayers, K. W. Post, W. H. Fales, R. B. Wilson, C. Reggiardo, and R. D. Walker.** 2007. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. *Vet Microbiol* **123**:122-132.