

Université de Montréal

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DE
SALMONELLA SPP. DANS LES
TISSUS CHEZ LE PORC SUITE À
UNE INFECTION NATURELLE
ET EXPÉRIMENTALE

par

SYLVIE CÔTÉ

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2003

©Sylvie Côté, 2003



SF

607

U54

2004

V.005

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DE
SALMONELLA SPP. DANS LES
TISSUS CHEZ LE PORC SUITE À
UNE INFECTION NATURELLE
ET EXPÉRIMENTALE

présenté par

SYLVIE CÔTÉ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Serge Messier, président-rapporteur

Sylvain Quessy, directeur de recherche

Ann Letellier, codirectrice

André Broes, membre du jury

SOMMAIRE

Salmonella enterica sérotype Typhimurium est l'un des sérotypes les plus fréquemment isolés chez le porc au Canada. Depuis quelques années, cette bactérie provoque des signes cliniques qui apparaissent rapidement et, dans certains cas, qui résulte en une mort soudaine chez des porcs qui semblaient en bonne santé quelques jours plus tôt. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer les fréquences d'isolement de *Salmonella* dans divers organes chez des porcs provenant d'élevages ayant eu ou non des signes cliniques ainsi que d'étudier la distribution et la persistance dans divers tissus de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium type phagique DT104. Une épreuve de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la souche expérimentale, caractérisée par une résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et à la tétracycline (ACSSuT), a été adaptée pour permettre un diagnostic plus rapide de la condition de l'animal. Aucune différence significative au niveau statistique ($P > 0,05$) n'a été observée dans les lots avec et sans signes cliniques pour le foie, la rate, le diaphragme et les fèces. Par contre, il y a eu une différence pour les ganglions lymphatiques mésentériques, la sérologie et la surface des carcasses. Lors de l'infection expérimentale, *S. Typhimurium* DT104 a été retrouvé dans la plupart des tissus jusqu'à 7 jours post-infection. Dans les tissus intestinaux, les ganglions lymphatiques mésentériques et les amygdales, la bactérie a été isolée par bactériologie et par PCR jusqu'à 14 jours post-infection, date de la dernière nécropsie.

Mots clés : *Salmonella* Typhimurium, porc, signes cliniques, distribution, persistance.

SUMMARY

Salmonella enterica serotype Typhimurium is among the most frequent foodborne pathogens observed in swine in Canada. Until recently, this serotype was not associated with severe clinical signs in pigs. However, during the past few years clinical episodes of salmonellosis, characterized by yellowish diarrhea, septicemia and sudden death has been increasingly reported. In this study, we were first interested in determining if the tissues and carcasses from animals originating from herds with clinical salmonellosis were more likely to be contaminated by *Salmonella* than tissues from animals originating from herds without clinical signs. No significant differences were noted ($P > 0,05$) for liver, spleen, diaphragm and feces of swines from both groups of animals. On the other hand, mesenteric lymph nodes and carcasses were significantly more contaminated by *Salmonella* in animals from affected herds. Antibody titers were also higher for this group. In the second part of this study, we observed the distribution and the persistence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in various tissues after an experimental infection in piglets. A PCR test was adapted to detect rapidly the experimental strain that harboured a multiresistance to ampicilline, chloramphenicol, streptomycin, sulfamides and tetracycline (ACSSuT). *S. Typhimurium* DT104 was isolated for up to 7 days after the experimental infection in most extraintestinal tissues. The experimental strain was detected by bacteriology and PCR in feces, mesenteric lymph nodes and tonsils for the entire 14 days post challenge period.

Keywords : *Salmonella* Typhimurium, swine, clinical signs, distribution, persistence.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xi
Chapitre 1. INTRODUCTION	1
Chapitre 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1 : Caractéristiques générales de <i>Salmonella</i> spp.	4
2.1.1 : Description.....	4
2.1.2 : Classification de <i>Salmonella</i> spp.....	5
2.1.2.1 : Sérotypie	5
2.1.2.2 : Génotypie	6
2.1.2.3 : Biotypie.....	7
2.1.2.4 : Lysotypie.....	7
2.1.2.5 : Spécificité d'hôte.....	8
2.1.3 : Types de porteurs de <i>Salmonella</i> spp.	8
2.1.4 : Caractéristiques de <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104	9
2.1.5 : Impacts économiques.....	10
2.2 : Signes cliniques causés par <i>Salmonella</i> Typhimurium	10
2.2.1 : Signes cliniques chez le porc	11
2.2.1.1 : Signes cliniques de <i>Salmonella</i> Typhimurium chez le porc	11
2.2.1.2 : Signes cliniques de <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 chez le porc	13
2.2.2 : Signes cliniques chez l'humain	13
2.2.2.1 : Signes cliniques de <i>Salmonella</i> Typhimurium chez l'humain	13
2.2.2.2 : Signes cliniques de <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 chez l'humain	14
2.2.3 : Antibiothérapie contre <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	14

2.3 : Dissémination de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les organes	15
2.3.1 : Différentes voies d'entrée par <i>Salmonella</i> Typhimurium chez le porc ...	15
2.3.2 : Mécanismes de défense de l'hôte	16
2.3.2.1 : Protection contre <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les tissus	16
2.3.2.2 : Cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire	17
2.3.2.2.1 : Cytokines produites par les cellules de l'épithélium intestinal	18
2.3.2.2.2 : Cytokines produites par les leucocytes	18
2.3.3 : Pathogénie de l'infection par <i>Salmonella</i> Typhimurium	19
2.3.3.1 : Adhésion de <i>Salmonella</i> Typhimurium aux cellules non- phagocytaires	19
2.3.3.2 : Invasion de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les cellules non- phagocytaires	20
2.3.3.3 : Invasion de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les leucocytes	22
2.3.3.3.1 : Mécanismes utilisés par les macrophages pour la dégradation	22
2.3.3.3.2 : Survie de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les macrophages	23
2.3.3.3.3 : Mort des macrophages lors de l'invasion par <i>Salmonella</i> Typhimurium	24
2.3.3.3.4 : Invasion de <i>Salmonella</i> Typhimurium dans les cellules dendritiques	24
2.4 : Mécanismes de virulence de <i>Salmonella</i> Typhimurium chez le porc	25
2.4.1 : Caractéristiques des îlots de pathogénicité	25
2.4.2 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> (SPI)	26
2.4.2.1 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> Typhimurium : SPI 1	26
2.4.2.2 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> Typhimurium : SPI 2	27
2.4.2.3 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> Typhimurium : SPI 3	28
2.4.2.4 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> Typhimurium : SPI 4	29
2.4.2.5 : Îlots de pathogénicité chez <i>Salmonella</i> Typhimurium : SPI 5	29
2.4.3 : Plasmide de virulence de <i>Salmonella</i> Typhimurium	29
2.4.4 : Systèmes de régulation de la virulence de <i>Salmonella</i> Typhimurium	30
2.4.5 : Fimbriae de <i>Salmonella</i> Typhimurium	32
2.4.6 : Toxines produites par <i>Salmonella</i> Typhimurium	33

2.4.6.1 : Exotoxines.....	33
2.4.6.2 : Endotoxines.....	34
2.5 : Détection de <i>Salmonella</i> Typhimurium chez le porc	34
2.5.1 : Détection par la bactériologie	35
2.5.2 : Détection des animaux ayant été infectés par <i>Salmonella</i> par ELISA	35
2.5.3 : Détection par PCR.....	36
2.6 : Problématique et objectifs	37
2.6.1 : Problématique.....	37
2.6.2 : Objectifs.....	37
Chapitre 3. Distribution of <i>Salmonella</i> in tissues following natural and experimental infection in pigs	39
Chapitre 4. DISCUSSION.....	60
4.1 : Distribution de <i>Salmonella</i> spp. chez le porc à l'abattoir.....	61
4.1.1 : Distribution générale de <i>Salmonella</i> spp. dans les organes et sur les carcasses.....	61
4.1.2 : Distribution de <i>Salmonella</i> spp. selon le statut du troupeau à la ferme... 62	
4.1.2.1 : Prévalence de <i>Salmonella</i> spp. sur les carcasses	64
4.1.2.2 : Prévalence de la séroconversion contre <i>Salmonella</i> spp.....	65
4.1.2.3 : Prévalences de <i>Salmonella</i> spp. dans les fèces et les ganglions lymphatiques mésentériques	65
4.1.2.4 : Prévalence de <i>Salmonella</i> spp. dans les tissus extra-intestinaux.....	67
4.1.3 : Distribution à l'abattoir des sérovars et des types phagiques chez les porcs provenant d'élevages avec et sans signes cliniques	68
4.2 : Distribution et persistance de <i>S. Typhimurium</i> DT104 chez le porc suite à une infection expérimentale.....	69
4.3 : Adaptation d'un PCR multiplex pour la détection de <i>S. Typhimurium</i> DT104 dans les tissus	71
Chapitre 5. CONCLUSION.....	74
BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I : Serological and bacterial culture of *Salmonella* spp. in selected tissues and carcasses from herds with or without historic of clinical salmonellosis 55
- Tableau II : Distribution at slaughter of serotypes and phage types isolated from different tissues of pigs from herds without historic of clinical salmonellosis 56
- Tableau III : Distribution at slaughter of serotypes and phage types isolated from different tissues of pigs from herds with historic of clinical salmonellosis 57
- Tableau IV : Distribution of *S. Typhimurium* DT104 # 4393 in tissues of experimentally infected piglets following oral inoculation 58
- Tableau V : Bacteriology and multiplex PCR on selected tissues following experimental infection by *S. Typhimurium* DT104 in pigs 59

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACSSuT :	Ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamide et tétracycline; ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamides and tetracycline
ADN :	Acide désoxyribonucléique; deoxyribonucleic acid
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert; transfert ribonucleic acid
ATPase :	Adénosine triphosphatase; adenosine triphosphatase
DT104 :	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce <i>enterica</i> sérovar Typhimurium type phagique DT104; <i>Salmonella enterica</i> subspecies Typhimurium phage type DT104
ELISA :	Test immuno-enzymatique; enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC :	<i>Escherichia coli</i> entéropathogène; enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
FAE :	Épithélium associé aux follicules; follicle-associated epithelium
Fc :	Fragment cristallisable des anticorps composé uniquement de régions constantes; fragment, crystalline
GTPase :	Guanine triphosphatase
IFN γ :	Interféron- γ ; interferon- γ
IL :	Interleukine; interleukin
Kb :	Kilobase
LAMPs :	Protéines de membrane lysosomale; lysosomal membrane glycoproteins
LAP :	Phosphatases lysosomales acides; lysosomal acid phosphatases
LPS :	Lipopolysaccharides
Mda :	Mégadalton; megadalton
MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité; major histocompatibility complex
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NALT :	Tissus lymphoïdes associés au nez; nasal-associated lymphoid tissue

pag :	Gènes PhoP activés; PhoP-activated genes
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne; polymerase chain reaction
PEEC :	Agent chemoattractant épithélial provoqué par un pathogène; pathogen-elicited epithelial chemoattractant
PI :	Îlot de pathogénicité; pathogenicity island
PMN :	Cellules polymorphonucléaires; polymorphonuclear cells
prg :	Gènes PhoP réprimés; PhoP-repressed genes
R-Type :	Résistance aux antibiotiques ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamide et tétracycline; resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamides and tetracycline
SPI :	Îlot de pathogénicité de <i>Salmonella</i> ; <i>Salmonella</i> pathogenicity island
Subsp ou spp. :	Sous-espèce; subspecies
TGF β :	Facteur de croissance transformant β ; transforming growth factor β
TNF α :	Facteur de nécrose tumorale α ; tumor necrosis factor type α
ufc/cfu :	Unités formatrices de colonies; colony-forming units

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Dr Sylvain Quessy de m'avoir accueilli dans son équipe.

Je souhaiterais également remercier ma sœur Chantal, mon beau-frère Bernard et mon père Gaston pour leur sens de l'humour, leurs sages conseils, leur générosité et leur patience tout au long de mes études.

Chapitre 1.

Introduction

Depuis quelques décennies, les infections à *Salmonella* ont été reconnues comme une cause importante de gastro-entérites alimentaires chez les humains dans la plupart des pays développés. Même si la plupart des sérotypes sont considérés comme des pathogènes potentiels, seulement un nombre limité de sérotypes a été associé à l'infection chez les animaux et les humains, entraînant des pertes considérables au niveau économique. Des isolats de *S. enterica* sérotype Typhimurium DT104 ayant une résistance multiple aux antibiotiques ont été rapportés lors d'infections humaines suite à la consommation de poulet, de bœuf, de porc, de produits laitiers non pasteurisés ainsi que lors d'un contact avec des animaux malades à la ferme et à l'abattoir. Chez le porc, une hausse importante des cas de salmonellose clinique causés par *S. Typhimurium* DT104 a été observée. Chez cet animal, les principaux symptômes incluent une diarrhée jaunâtre accompagnée de fièvre et un affaiblissement général résultant parfois en une mort soudaine. Bien que cette bactérie ait été isolée dans plusieurs organes à la nécropsie, peu d'informations sont disponibles quant à sa distribution et à sa persistance dans les tissus de porcs infectés. Les objectifs principaux de cette étude consistaient à identifier les sérotypes impliqués dans les troupeaux ayant eu ou non des signes cliniques de salmonellose et à étudier la distribution et la persistance de *S. Typhimurium* DT104 dans les tissus chez le porc lors d'une infection expérimentale. Les résultats obtenus permettront de mieux caractériser les risques associés aux animaux provenant d'élevages atteints de salmonellose ainsi que d'établir un temps de retrait pour éviter la mise en marché de tissus contaminés par la salmonelle.

Chapitre 2.

Recension de la littérature

2.1 : Caractéristiques générales de *Salmonella* spp.

2.1.1 : Description

Les bactéries du genre *Salmonella* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles sont des bacilles à Gram négatif de 0,7-1,5 par 2,0-5,0 μm et ne forment pas de spore (Le Minor, 1984). Tous les sérovars, à l'exception de *S. Gallinarum* et *S. Pullorum*, sont mobiles grâce à des flagelles péritriches (Le Minor, 1984). Les différents sérovars de *Salmonella* sont retrouvés dans les environnements les plus diversifiés. Par exemple, les sous-espèces *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* et *indica* ainsi que l'espèce *S. bongori* sont surtout présentes chez les animaux à sang froid et dans l'environnement, bien que des infections humaines aient été rapportées (Brenner et al., 2000). La sous-espèce *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* est retrouvée chez les animaux à sang chaud (Brenner et al., 2000). Lors de l'infection des animaux à sang chaud et à sang froid, les salmonelles se retrouvent principalement dans le tractus intestinal (Schwartz, 1999). Les salmonelles peuvent croître entre 7 et 45° C, survivre à la congélation et à la dessiccation. Elles peuvent également résister dans un milieu contenant certains substrats organiques pendant de très longues périodes. Toutefois, elles ne supportent pas la chaleur ainsi que la présence de désinfectants à base de phénol, de chlore et d'ammonium quaternaire. En fait, la concentration de ces substances ainsi que le temps de contact influencent l'efficacité des désinfectants. Dans certains cas, des isolats de *Salmonella* spp. ont résisté à l'action de ces produits chimiques (Møretro et al., 2003). Les salmonelles peuvent être retrouvées dans les fossés, les cours d'eau pollués, chez la plupart des vertébrés, dans les aliments, la poussière, les excréments, les litières, sur les vêtements et les outils des travailleurs oeuvrant avec des animaux contaminés (Laval et al., 1991; Schwartz, 1999). La survie dans l'eau saline peut être compromise en présence de rayons ultra-violet, c'est-à-dire que les rayons ultra-violet diminuent le taux de survie de la salmonelle et que cette diminution est plus importante quand les bactéries sont placées dans l'eau saline (Davies et Evison, 1991).

2.1.2 : Classification de *Salmonella* spp.

Les bactéries appartenant au genre *Salmonella* peuvent être regroupées selon différents modes de classification, par exemple selon la sérotypie, la génotypie, la biotypie, la lysotypie et les caractères épidémiologiques (Laval et al., 1991; Le Minor, 1988). Les sérovars de *Salmonella* sont regroupés en 2 espèces officielles, soit *S. choleraesuis* et *S. bongori* (Brenner et al., 2000). L'espèce *S. choleraesuis* est subdivisé en 6 sous-espèces : I *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, II *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, IIIa *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, IIIb *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, IV *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* et VI *S. choleraesuis* subsp. *indica* (Brenner et al., 2000). L'espèce *S. bongori* est numérotée V parce qu'à l'origine, elle était incluse dans l'espèce *S. choleraesuis* lors des premières divisions en sous-espèces (Reeves et al., 1989). Le nombre de sérovars de la sous-espèce I représente 59 % des sérovars de *Salmonella* (Brenner et al., 2000). L'espèce *S. enterica* a été proposée pour remplacer l'espèce *S. choleraesuis* (Le Minor et Popoff, 1987). Toutefois, cette requête a été rejetée par la Commission Judiciaire et l'espèce *S. choleraesuis* demeure l'une des deux espèces officielles (Brenner et al., 2000). Le nom *S. enterica* est néanmoins utilisé couramment dans la littérature (Glynn et al., 1998; Scherer et Miller, 2001). Certains noms de sérovars sont abrégés pour simplifier l'écriture. Par exemple, *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérovar Typhimurium est souvent réduit comme suit : *S. Typhimurium* (Brenner et al., 2000).

2.1.2.1 : Sérotypie

Le sérotypage est une technique qui est utilisée pour différencier différents isolats selon leur composition antigénique que l'on appelle sérovars ou sérotypes (Prescott et al., 1995). La caractérisation repose principalement sur l'identification des antigènes O et H. Les antigènes O représentent les antigènes somatiques (Brenner et al., 2000). Ceux-ci sont en fait les antigènes de la paroi cellulaire, plus particulièrement la chaîne polysaccharadique O des lipopolysaccharides (LPS) (Brenner et al., 2000; Laval et al., 1991). Les antigènes H sont les antigènes

flagellaires qui sont présents uniquement chez les sérovars mobiles (Brenner et al., 2000). Les sérovars *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* sont dépourvus de ce type d'antigènes. Les antigènes flagellaires, tout comme les antigènes somatiques, sont constitués de molécules thermostables (Laval et al., 1991). La plupart des isolats des sous-espèces *enterica*, *salamae*, *diarizonae* et *indica* peuvent exprimer deux phases différentes de leurs antigènes flagellaires (Le Minor et Popoff, 1987). Les antigènes Vi sont des polysaccharides présents sur la surface de la capsule. Ceux-ci ne sont présents que chez quelques sérovars dont *S. enterica* serovar Typhi, Paratyphi C et Dublin (Neidhart, 1996). Selon ce type de classification, il y a présentement 2501 sérovars de *Salmonella* (Popoff et al., 2001).

2.1.2.2 : Génotypie

La génotypie est la caractérisation d'une bactérie selon son contenu génétique. Plusieurs techniques sont couramment utilisées pour déterminer certaines particularités d'un génome, c'est-à-dire de son contenu en acide désoxyribonucléique (ADN). Par exemple, certaines séquences recherchées dans les brins d'ADN peuvent être amplifiées par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et séparées grâce à l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique sera décrite plus en détail dans la section 2.5.3. La séparation de gros fragments de gènes nécessite une technique particulière, l'électrophorèse sur gel en champ pulsé. Cette méthode repose sur les fréquentes modifications de la direction du champ électrique pour permettre aux fragments de serpenter à travers les pores du gel. Les liens de parenté entre deux groupes de bactéries peuvent être évalués par la technique d'hybridation. Dans cette méthode, l'ADN des isolats est dénaturé par la chaleur. Ensuite, la température est abaissée sous la valeur normale de renaturation. Les brins d'ADN dont les séquences sont complémentaires s'associeront ensemble pour former un brin d'ADN bicaténaire. Plus la séquence d'ADN des isolats est divergente, plus la température pour le réappariement devra être basse (Alberts et al., 1994; Prescott et al., 1995). Les sérovars de *Salmonella* ont été séparés en deux espèces grâce à cette technique (Brenner et al., 2000). La redistribution de certains isolats de la sous-espèce IV vers la sous-espèce VII a été proposée suite à l'analyse de leur contenu génétique (Boyd et

Hartl, 1998). Toutefois, cette classification n'a pas encore été reconnue (Popoff et al., 2001).

2.1.2.3 : Biotypie

Les salmonelles peuvent être différenciés selon leur biotype, c'est-à-dire leurs caractères biochimiques (Le Minor, 1988). La majorité des salmonelles est uréase-négative, anaérobie facultative, mobile et ne fermente pas le lactose. De plus, il y a formation de gaz lors de la fermentation du glucose, le citrate est habituellement utilisé comme seule source de carbone, les nitrates sont réduits en nitrites et le sulfite d'hydrogène est produit lorsque les isolats croissent sur les géloses aux trois sucres et au fer (Le Minor, 1984). Toutefois, certains sérovars ont des traits particuliers. Par exemple, *S. Typhi*, qui est isolé presque exclusivement chez l'Homme (Scherer et Miller, 2001), ne produit pas de gaz lors de la fermentation de sucres. *S. Choleraesuis* ne crée pas de sulfite d'hydrogène à partir du thiosulfate (Le Minor, 1984; Le Minor et Popoff, 1987).

2.1.2.4 : Lysotypie

La lysotypie est un autre mode de classification qui est habituellement utilisé en complément de la sérotypie. La lysotypie repose sur la sensibilité des bactéries à certains bactériophages (Le Minor, 1988). Les récepteurs phagiques de certains bactériophages peuvent se lier à des récepteurs bactériens spécifiques (Prescott et al., 1995). Les phages qui se sont liés aux récepteurs de surface pourront ensuite infecter les bactéries et causer la lyse cellulaire (Felix, 1956; Prescott et al., 1995). Les isolats sont donc soumis à une panoplie de types phagiques. Une des techniques courantes de lysotypie est celle qui a été mise au point par Anderson et Williams (Anderson et Williams, 1956). L'isolat à tester est ensemencé dans un bouillon pour obtenir une suspension bactérienne. Cette suspension est ensuite transférée uniformément sur une gélose contenant du Bacto nutrient broth et du sel. Quand la gélose inoculée est sèche, chacun des différents types phagiques à tester est ensemencé sur la gélose de façon à ce qu'ils soient isolés les uns des autres. Après une incubation à 38,5 °C

pendant 24 heures, des plaques de lyse cellulaire apparaîtront dans les zones correspondant aux types phagiques pour lesquels la salmonelle est sensible (Anderson et Williams, 1956). Un des types phagiques d'intérêt au niveau de la santé publique est *Salmonella* Typhimurium type phagique ou type définitif 104, dont le nom est souvent abrégé comme suit : *S. Typhimurium* DT104 (Poppe et al., 1998).

2.1.2.5 : Spécificité d'hôte

Les sérovars, pathogènes intracellulaires facultatifs, peuvent être regroupés selon leur spécificité d'hôte. Il y a trois catégories écologiques : les sérovars adaptés uniquement à l'Homme, les sérovars adaptés à des espèces animales particulières et les sérovars sans spécificité d'hôte. La première classe inclut *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B, C, et *S. Sendai*. Le deuxième groupe est composé, entre autres, des pathogènes *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* pour les oiseaux, *S. Choleraesuis* et *S. Typhisuis* pour les porcs, *S. Dublin* pour les bovins, *S. Abortusovis* chez les ovins. La troisième classe est composée de pathogènes pour les Hommes et pour les animaux, par exemple *S. Typhimurium* (Gray et Fedorka-Cray, 1996; Laval et al., 1991). Les divers sérovars de *Salmonella* peuvent provoquer des symptômes comme la fièvre typhoïde, la gastro-entérite et la septicémie (Schwartz, 1999). Les différents facteurs de virulence de *Salmonella* spp. et leurs rôles lors d'une infection chez le porc seront traités dans la section 2.4.

2.1.3 : Types de porteurs de *Salmonella* spp.

Salmonella peut être transmis de plusieurs façons, notamment par des animaux contaminés qui sont porteurs. Plusieurs facteurs, dont la susceptibilité et l'âge de l'hôte, le sérovar, le nombre de bactéries ingérées et la voie d'entrée peuvent transformer des animaux infectés en porteurs. En conséquence, il y a plusieurs types de porteurs. Les porteurs passifs sont les animaux qui ingèrent les bactéries et qui les excrètent dans leurs fèces sans qu'il y ait une invasion des ganglions lymphatiques mésentériques (Gray et Fedorka-Cray, 1996). Ces animaux cesseront d'excréter ces bactéries dès que la source de *Salmonella* sera retirée (Gray et Fedorka-Cray, 1996).

Les porteurs latents sont des animaux qui ont une infection de leurs tissus, mais qui n'excrètent pas la bactérie dans leurs fèces. Ceux-ci pourront recommencer à excréter la salmonelle lors de situations stressantes, par exemple lors du transport des animaux porteurs vers l'abattoir, de l'apparition d'autres maladies, du manque de nourriture, de la surpopulation et de la redistribution des porcs dans les parcs (Gray et Fedorka-Cray, 1996; Schwartz, 1999). Par ailleurs, les salmonelles peuvent être transmises rapidement dans l'environnement en infectant une grande variété d'animaux à sang chaud et à sang froid. Si des antibiotiques sont présents, des passages successifs dans divers milieux augmenteront la résistance d'un isolat pour ces antibiotiques en plus de perturber la flore normale et de faciliter un transfert horizontal de la résistance pour ces antibiotiques à des bactéries commensales du tractus digestif (Gebreyes et Altier, 2002; Glynn et al., 1998).

2.1.4 : Caractéristiques de *Salmonella* Typhimurium DT104

Ce type phagique a été isolé pour la première fois chez les humains en Angleterre en 1984 (Threlfall et al., 1994). Depuis, le DT104 a été détecté dans plusieurs pays, dont les États-Unis, le Royaume-Uni, la France, l'Allemagne, le Danemark, l'Italie, la Grèce, Israël, la Belgique et le Canada (Baggesen et al., 2000; Hogue et al., 1997; Imberechts et al., 1998; Markogiannakis et al., 2000; Metzger et al., 1998; Poppe et al., 2002; Rubino et al., 1998). Contrairement aux autres types phagiques de *S. Typhimurium*, le type phagique DT104 a une résistance multiple aux antibiotiques qui est codée sur le chromosome (Gebreyes et Altier, 2002; Threlfall et al., 1994). La résistance est habituellement dirigée contre l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, le sulfamide et la tétracycline (ACSSuT) (Poppe et al., 1998). En outre, certaines souches de DT104 ont, en plus de la résistance à ACSSuT (R-Type), un plasmide de 4,6 Mda qui code pour la résistance au triméthoprime, au sulfamide et parfois à l'apramycine et à la gentamicine (Low et al., 1997; Threlfall et al., 1996b). La résistance chromosomique a été découverte en tentant, mais sans succès, de transférer les gènes de résistance à une souche sensible de *Escherichia coli* K12 ne possédant pas de plasmide (Threlfall et al., 1994). La résistance au triméthoprime pourrait résulter de l'utilisation excessive de cet

antibiotique pour combattre les isolats DT104 R-Type dans les élevages (Threlfall et al., 1996a). Bien que ce type phagique ait été isolé principalement chez l'humains, le bœuf, le porc et le poulet, il a aussi été retrouvé chez plusieurs espèces animales dont le mouton, le cheval, la chèvre, le chat, le chien, la souris l'écureuil et le raton-laveur (Besser et al., 1997; Poppe et al., 2002). Le nombre de cas de salmonellose humaine au DT104 R-Type a augmenté de façon spectaculaire depuis quelques années. Par exemple, au Royaume-Uni, il y a eu 259 cas en 1990 comparativement 4006 en 1996 (Hogue et al., 1997). Aux États-Unis, le nombre de DT104 R-Type a augmenté de 7 cas en 1985 à 275 en 1995 (Ribot et al., 2002). Aucune évidence n'a encore pu être démontrée quant aux caractéristiques distinctes, soit une hyper-virulence ou une résistance aux antibiotiques accrue, des isolats ayant causé la mort.

2.1.5 : Impacts économiques

Les coûts pour le traitement des humains et des animaux infectés par *Salmonella* spp. sont considérables. Ceux-ci peuvent être divisés en plusieurs catégories : les frais pour les soins médicaux et l'hospitalisation des humains, les pertes pour les producteurs et les transformateurs dues à la maladie, à l'état de porteur possible ainsi qu'aux retards de croissance des animaux et les coûts associés à l'investigation pour les épisodes de salmonellose (Todd, 1989). Sur une base annuelle, les salmonelles causent entre 0,8 et 4 millions d'infections chez les humains aux États-Unis (Buzby et Roberts, 1996). Les coûts estimés pour les salmonelloses humaines dans ce pays varient entre 0,9 et 3,5 milliards de dollars américains par an (Hogue et al., 1997). Au Canada, il y a eu entre 0,2 et 8,9 millions d'infections humaines. Les coûts engendrés pour les salmonelloses humaines au Canada se sont situés aux environs de 846 millions de dollars (Todd, 1989). Chez le porc, *S. Typhimurium* est le deuxième sérovar le plus fréquemment isolé (Schwartz, 1999).

2.2 : Signes cliniques causés par *Salmonella* Typhimurium

Les conséquences de l'infection dépendent en grande partie de la quantité de bactéries ingérées, de la virulence de l'isolat de *Salmonella*, des soins médicaux et de

l'efficacité du système immunitaire de l'hôte (Jones et Falkow, 1996). Chez la souris, *S. Typhimurium* cause des symptômes semblables à la fièvre typhoïde humaine caractérisés par une forte fièvre, une diarrhée et une constipation, une anorexie et l'apparition occasionnelle d'ulcères sévères de la muqueuse intestinale et de plaques rougeâtres (Salyers et Whitt, 1994; Scherer et Miller, 2001). Cette particularité peut s'avérer importante lors de l'analyse du rôle des différents facteurs de virulence dans l'évolution de la maladie, étant donné que de nombreuses recherches ont été effectuées chez les souris.

2.2.1 : Signes cliniques chez le porc

2.2.1.1 : Signes cliniques de *Salmonella* Typhimurium chez le porc

La transmission de la salmonelle à des porcelets peut être causée par une hygiène déficiente, une nourriture contaminée, de l'eau non traitée, des insectes, des oiseaux, des rongeurs et des animaux domestiques (Schwartz, 1999). Chez le porc, l'entrée de *S. Typhimurium* dans l'organisme se fait principalement par la transmission fécale-orale (Schwartz, 1999). Toutefois, la bactérie peut entrer dans l'hôte par l'inspiration d'aérosols contaminés. Dans ce cas, elle infectera l'animal en passant par les amygdales, les tissus lymphoïdes associés au nez (NALT) et les poumons (Fedorka-Cray et al., 1995). Le nombre de *S. Typhimurium* nécessaire pour provoquer la maladie chez le porc n'a pas vraiment été déterminé. Les doses utilisées varient souvent entre 1×10^8 et 1×10^{11} unités formatrices de colonies (ufc) (Gray et Fedorka-Cray, 1996). Toutefois, lors de situations stressantes, par exemple lors du transport avant l'abattage, une dose très faible, de l'ordre de $4,5 \times 10^2$ ufc, pourrait être suffisante pour causer une infection (Hurd et al., 2001a; Hurd et al., 2001b). Par ailleurs, l'ingestion d'une dose de 1×10^4 de *S. Typhimurium* résultera en un état de porteur à court terme chez le porcelet (Gray et Fedorka-Cray, 1996).

L'état de santé de l'hôte est affecté peu de temps après l'entrée de la salmonelle. En effet, après l'invasion des cellules de l'hôte par les bactéries, les principaux signes cliniques rapportés chez le porc sont une hyperthermie, souvent

supérieure à 40 °C, une diminution significative de l'appétit, une déshydratation et un abattement (Laval et al., 1991; Schwartz, 1999; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). De plus, une diarrhée très liquide et jaunâtre est habituellement présente chez ces porcs (Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). Il n'y a pas de sang ou de mucus dans la diarrhée au début de l'infection, mais des traces de sang pourront apparaître dans les stades plus avancés de la maladie (Laval et al., 1991; Schwartz, 1999). La diarrhée persiste environ de trois à sept jours, mais les porcs atteints peuvent avoir des diarrhées à répétition. Dans ce cas, les symptômes reliés à la diarrhée pourront persister pendant des semaines (Schwartz, 1999; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). Par ailleurs, la sécrétion des fluides est indépendante des dommages occasionnés aux muqueuses. En effet, au début de la maladie, la diarrhée semble être causée par une diminution du passage du sodium à travers les membranes intestinales et par une augmentation de la sécrétion de chlore ionique provoquée, entre autres, par des entérotoxines semblables aux toxines cholérique et Shiga-toxine (Gray et Fedorka-Cray, 1996; Schwartz, 1999). Dans la phase aiguë, les porcs peuvent excréter jusqu'à 10^7 *S. Typhimurium* par gramme de fèces (Schwartz, 1999).

Les cas de mortalité reliés à ce sérovar sont assez rares et surviennent habituellement après plusieurs jours de diarrhée (Schwartz, 1999; Wood et Rose, 1992). Lors d'infections expérimentales avec *S. Typhimurium*, des ulcères et des lésions de nécrose dans le petit et/ou le gros intestin sont observés à la nécropsie (Schwartz, 1999; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989;). En général, *S. Typhimurium* semble affecter les porcelets surtout peu après la période de sevrage, c'est-à-dire lorsqu'ils sont âgés entre 6 et 12 semaines. Durant cette période, les porcelets sont soumis à des changements radicaux pour le type de nourriture. Les anticorps maternels provenant du sérum et du colostrum et présents dans leur sérum décroissent rapidement pour être graduellement remplacés par ceux du système immunitaire du porcelet et par l'apparition des composantes de l'immunité à médiation cellulaire (Vega-López et al., 1995). Par ailleurs, les différents facteurs de virulence des sérovars spécifiques à certains hôtes semblent mieux adaptés que les sérovars sans spécificité d'hôte pour contourner les mécanismes de défense des animaux matures (Bäumler et al., 1998). Chez les sérovars sans spécificité d'hôte

comme *S. Typhimurium*, de nouvelles études suggèrent que ce sérovar serait divisé en variantes qui auraient une spécificité d'hôte restreinte (Rabsch et al., 2002).

2.2.1.2 : Signes cliniques de *Salmonella* Typhimurium DT104 chez le porc

Les signes cliniques associés à *S. Typhimurium* DT104 sont plus inquiétants. En effet, les porcelets de neuf semaines infectés avec ce sérovar de type phagique 104 ont développé plusieurs symptômes, dont une diarrhée jaunâtre, des vomissements et une température corporelle allant jusqu'à 41 °C (Marg et al., 2001). L'infection a résulté en une mort soudaine dans plusieurs cas (Poppe et al., 1998). La nécropsie des porcelets suite à la contamination au DT104 a révélé la présence d'entérocolite fibrino-nécrotique, d'hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques et de splénomégalie (Poppe et al., 1998). La bactérie a été retrouvée dans le caecum, le colon, l'iléon, le jéjunum, les ganglions lymphatiques mésentériques, la rate, les amygdales, mais rarement dans les muscles (Marg et al., 2001; Poppe et al., 1998). Aucune étude n'a rapporté la distribution et la persistance dans les tissus et dans le temps suite à une infection naturelle avec ce type phagique.

2.2.2 : Signes cliniques chez l'humain

2.2.2.1 : Signes cliniques de *Salmonella* Typhimurium chez l'humain

L'infection des humains par *S. Typhimurium* peut aussi causer des signes cliniques importants. En général, les symptômes reliés à ce sérovar apparaissent entre 6 et 74 heures après l'ingestion de produits contaminés et sont caractérisés par des nausées, des diarrhées et des vomissements (Buzby et Roberts, 1996; Hersh et al., 1999). L'infection dure environ entre 5 et 7 jours lorsque les patients ne sont pas traités et qu'il n'y a pas de complications (Scherer et Miller, 2001). Les décès reliés à ce pathogène sont rares (Buzby et Roberts, 1996; Hersh et al., 1999). Cependant, certains cas ont été observés chez des personnes âgées, de jeunes enfants et des

immuno-compromis (Buzby et Roberts, 1996). Pour le dernier groupe, cette bactérie peut causer une maladie semblable à la fièvre typhoïde (Groisman et al., 1992).

2.2.2.2 : Signes cliniques de *Salmonella* Typhimurium DT104 chez l'humain

Chez les humains, l'infection par *S. Typhimurium* DT104 est généralement associée à la consommation de nourriture contaminée ou au contact direct avec des animaux infectés (Hogue et al., 1997). Les symptômes reliés à une infection par ce type phagique sont des douleurs abdominales, de la diarrhée qui peut être sanguinolente, des vomissements et de la fièvre (Poppe et al., 1998; Threlfall et al., 1998). Les signes cliniques associés à une infection par *S. Typhimurium* DT104 semblent plus sévères comparativement aux infections par les autres sérovars et types phagiques de *Salmonella* ne causant pas la fièvre typhoïde. Par exemple, au Royaume-Uni, 41 % des patients infectés par ce type phagique ont dû être hospitalisés et 3 % en sont morts. En comparaison, 0,1% des salmonelloses qui ne causent pas la fièvre typhoïde ont provoqué la mort (Hogue et al., 1997).

2.2.3 : Antibiothérapie contre *Salmonella* Typhimurium

L'usage d'antibiotiques dans le cas des patients ayant une gastro-entérite causée par *S. Typhimurium* n'est pas particulièrement essentiel, voire déconseillé. Les antibiotiques de choix pour le traitement d'une salmonellose avec un isolat ayant un patron de résistance R-Type sont les fluoroquinolones et les céphalosporines (Glynn et al., 1998). En fait, les fluoroquinolones sont utilisés dans les cas d'infections extra-intestinales par *Salmonella* et dans le cas de gastro-entérites chez des patients ayant déjà des troubles de santé (Mølbak et al., 1999). Toutefois, les fluoroquinolones ne devraient être administrés qu'en dernier recours. En effet, au Danemark, plusieurs isolats de *S. Typhimurium* DT104 ayant une résistance multiple aux antibiotiques ont été testés pour le ciprofloxacine et le fleroxacin (Mølbak et al., 1999). Les isolats résistants à ces deux antibiotiques avaient une mutation dans le gène de la gyrase, ce qui aurait diminué l'efficacité des fluoroquinolones pour ces

isolats. Quelques patients sont morts des suites de l'infection par ces isolats (Mølbak et al., 1999).

2.3 : Dissémination de *Salmonella* Typhimurium dans les organes

Salmonella spp. est un pathogène intracellulaire facultatif, ayant acquis divers mécanismes pour survivre dans les phagocytes, s'en évader et parfois même s'y répliquer (Abbas et al., 1997; Ohl et Miller, 2001; Salyers et Whitt, 1994). Contrairement aux bactéries extracellulaires, ces pathogènes ont plusieurs stratégies pour trouver des endroits inaccessibles aux anticorps qui voyagent dans l'hôte (Abbas et al., 1997). Les pathogènes qui résistent au système immunitaire inné provoquent une activation de la production des cytokines et de l'inflammation (Ohl et Miller, 2001).

2.3.1 : Différentes voies d'entrée par *Salmonella* Typhimurium chez le porc

Lors d'une infection initiée dans les voies respiratoires, les salmonelles se disséminent rapidement dans tout l'organisme. En effet, environ trois heures après le début de l'infection, les bactéries ont colonisé les amygdales, les ganglions lymphatiques bronchiques et les poumons. En empruntant les systèmes lymphatique et sanguin, les salmonelles ont aussi envahi, entre autres, le thymus, la trachée, le foie, la rate, l'iléon, le caecum et le colon (Fedorka-Cray et al., 1995). Entre six et douze heures après l'inhalation des bactéries, celles-ci sont isolées, en plus des tissus déjà mentionnés, dans la jonction iléo-caecale, les ganglions lymphatiques iléo-coliques et le contenu du caecum (Fedorka-Cray et al., 1995). Peu de données sont disponibles sur la vitesse d'invasion de la salmonelle lors d'une contamination orale. Néanmoins, *S. Typhimurium* a été détecté dans les fèces environ deux heures après l'exposition (Hurd et al., 2001a; Hurd et al., 2001b). Deux jours après l'infection, les salmonelles ont été isolées, entre autres, dans l'iléon, le caecum, le colon, les ganglions lymphatiques mésentériques, les amygdales, l'estomac, les ganglions lymphatiques cervicaux et le cœur. Quatre jours après l'infection, la bactérie a été retrouvée dans la rate et dans tous les autres tissus mentionnés à l'exception du cœur.

Environ deux semaines post-infection, la salmonelle a été isolée uniquement dans les amygdales, l'iléon, le caecum, le colon et les ganglions lymphatiques mésentériques (Wood et al., 1989). La bactérie a été retrouvée dans ces tissus vingt-huit semaines après l'infection, bien que leur concentration ait diminué huit à douze semaines post-infection (Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989;). La bactérie n'a pas été isolée dans la vésicule biliaire lors d'une infection orale (Wood et al., 1989). Il peut y avoir une réinfection orale lors du contact entre les porcs et les fèces contaminées (Wood et Rose, 1992).

2.3.2 : Mécanismes de défense de l'hôte

Le système immunitaire est divisé en deux, soit le système inné et le système acquis. Le système immunitaire inné est caractérisé par une faible spécificité pour les pathogènes, une spécialisation et une diversité limitées ainsi qu'une absence de mémoire lors de rencontres successives avec un pathogène. Les principales composantes de ce système incluent la peau, les muqueuses et les agents chimiques antimicrobiens comme les défensines, le système du complément et les phagocytes, c'est-à-dire les macrophages, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques et les cellules tueuses naturelles (natural killer cells) (Abbas et al., 1997; Benjamini et al., 1996). Le système immunitaire acquis a une grande spécificité pour les microbes, une grande diversité, une forte spécialisation ainsi qu'une mémoire immune lors de rencontres subséquentes. Ce système est composé des lymphocytes T et B et des anticorps produits par les cellules B (Abbas et al., 1997).

2.3.2.1 : Protection contre *Salmonella* Typhimurium dans les tissus

Les neutrophiles et les macrophages sont très importants pour la défense précoce contre les salmonelles (Conlan, 1996; Sirard et al., 1999). En début d'infection, les neutrophiles protègent l'hôte en limitant la croissance des bactéries jusqu'à ce que les autres défenses de l'organisme soient recrutées au site (Conlan, 1996). Les neutrophiles sont des cellules polymorphonucléaires (PMN) pourvues de

granules (lysosomes) contenant des enzymes hydrolytiques et autres protéines bactéricides dont les lactoferrines et les défensines (Benjamini et al., 1996; Prescott et al., 1995). Lorsque ces cellules rencontrent un pathogène, elles libèrent les défensines dans l'espace extracellulaire pour détruire le micro-organisme par la perméabilisation des parois cellulaires (Prescott et al., 1995). Tout comme les macrophages, les neutrophiles produisent des radicaux peroxydes et superoxydes et des intermédiaires d'azote réactifs (Benjamini et al., 1996). Les salmonelles ayant traversé la barrière intestinale envahissent, entre autres, les ganglions lymphatiques mésentériques, le foie et la rate (Wick, M. J. 2003). Arrivées dans un organe, les bactéries qui proviennent du sérum sont phagocytées par les macrophages résidents (Conlan, 1997; Nnalue et al., 1992). Ces cellules sont présentes principalement dans le foie (cellules de Kupffer), la rate (spléniques), les poumons (alvéolaires), l'intestin (cellules M) et le système nerveux central (microgliales) (Benjamini et al., 1996; Jepson et Clark, 1998; Prescott et al., 1995). Dans le foie, les neutrophiles tuent les salmonelles extracellulaires et ils détruisent les hépatocytes infectés afin d'exposer les bactéries aux défenses bactéricides de l'hôte dont les phagocytes professionnels et le système du complément (Conlan, 1996; Salyers et Whitt, 1994). Cette action limite la dispersion des bactéries vers d'autres organes (Conlan, 1997).

2.3.2.2 : Cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire

Les cellules de l'épithélium réagissent aux pathogènes de l'environnement en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des chemokines (Sirard et al., 1999). Les cytokines sont des hormones protéiques qui servent à réguler les réponses immunes et inflammatoires (Abbas et al., 1997). Les cytokines sont classées selon les cellules qui les produisent et leur rôle dans la réponse innée et acquise (Abbas et al., 1997). Les chemokines sont une sous-classe de cytokines qui stimulent la motilité des leucocytes (monocytes, macrophages, éosinophiles, basophiles, neutrophiles, mastocytes et cellules T et B) et dirigent leurs mouvements (Abbas et al., 1997; Benjamini et al., 1996).

2.3.2.2.1 : Cytokines produites par les cellules de l'épithélium intestinal

Lors d'une infection, *Salmonella* envahit les entérocytes par leur face apicale et basolatérale soit directement, soit indirectement suite à la destruction des cellules M (Finlay et Cossart, 1997). Le contact entre la bactérie et les cellules de l'épithélium intestinal stimule la production et la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) par leur surface basolatérale et d'un agent chemoattractant épithélial provoqué par un pathogène (PEEC) par leur côté apical (Gewirtz et al., 1999). Un des rôles de l'IL-8 est d'attirer les PMN au travers la lamina propria vers l'espace subépithélial (Gewirtz et al., 1999). La migration de ces PMN au travers l'épithélium pour atteindre la lumière intestinale est dirigée par le PEEC (Gewirtz et al., 1999). La présence de phagocytes sur la surface apicale de l'épithélium limiterait l'invasion des cellules intestinales par les pathogènes (Sirard et al., 1999).

2.3.2.2.2 : Cytokines produites par les leucocytes

Les phagocytes mononucléaires activés par le LPS des bactéries à Gram négatif sécrètent plusieurs cytokines dont le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) (Abbas et al., 1997). La présence d'une faible quantité de TNF α stimule le relâchement d'autres cytokines par les phagocytes mononucléaires, l'expression de molécules d'adhésion sur la surface des leucocytes et l'activation de ces leucocytes pour détruire les pathogènes (Abbas et al., 1997). L'importance de cette voie d'activation ne semble pas être la même pour les leucocytes des mammifères infectés par *S. Typhimurium*. Par exemple, le TNF α est très impliqué dans le début de l'infection chez la souris, hôte chez qui les symptômes s'apparentent à la fièvre typhoïde humaine (Ohl et Miller, 2001; Scherer et Miller, 2001). Par contre, la concentration de TNF α ne varie pas beaucoup dans les plaques de Peyer de veaux âgés de 4 à 5 semaines (Santos et al., 2002). Chez les porcelets, une étude a rapporté que la concentration de TNF α demeure plutôt stable, mais qu'il y a une augmentation dans la concentration du facteur de croissance transformant β (TGF- β) dans les plaques de Peyer (Trebichavský et al., 1997). Le TGF- β a des effets très variés qui ont principalement pour but d'arrêter les réponses inflammatoires et immunes en

inhibant la prolifération et la maturation des lymphocytes T ainsi que l'activation des macrophages (Abbas et al., 1997). Une autre étude a observé une augmentation dans la concentration de $\text{TNF}\alpha$, d'interféron- γ (IFN- γ) et d'IL-1 β dans les plaques de Peyer et une augmentation de la concentration d'IFN- γ et d'IL-10 dans le sérum (Šplíchal et al., 2002). Étant donné que le TGF- β et l'IL-10 empêchent la sécrétion d'autres cytokines comme l'IFN- γ , le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 (Abbas et al., 1997; Trebichavský et al., 1997), d'autres recherches seront nécessaires pour évaluer la distribution et les effets des cytokines lors d'une infection par *S. Typhimurium*.

2.3.3 : Pathogénie de l'infection par *Salmonella Typhimurium*

2.3.3.1 : Adhésion de *Salmonella Typhimurium* aux cellules non-phagocytaires

Lors de l'ingestion de la bactérie, celle-ci doit survivre aux conditions extrêmes de température, de pH, d'oxygène, de sels biliaires, d'enzymes digestives et d'une multitude de micro-organismes en compétition pour les ressources nutritionnelles qui sont retrouvées dans le tractus gastro-intestinal (McCormick et al., 1996). La résistance au pH acide est assurée, en autres, par les protéines Fur, Ada et les systèmes RpoS et PhoPQ (Bearson et al., 1998). La capacité des salmonelles à envahir les cellules épithéliales dépend, entre autres, du stade de croissance de la bactérie et de la faible concentration en oxygène (Lee et Falkow, 1990). L'infection débute généralement par l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales de la muqueuse, soit les cellules M et les entérocytes (Frost et al., 1997; Meyerholz et al., 2002). Cette étape est accomplie grâce aux différents types de fimbriae présents sur la surface de la bactérie : *lpf* (long polar), *fim* (type 1), *agf* (thin aggregative) et *pef* (plasmid encoded) (van der Velden et al., 1998). Les cellules M sont des cellules épithéliales qui ont des jonctions serrées avec les entérocytes voisins et qui ont une capacité intense d'endocytose par leur surface apicale (Finlay et Cossart, 1997; Jepson et Clark, 1998). De plus, les cellules M possèdent une bordure en brosse peu organisée à leur surface apicale et une poche cytoplasmique contenant des lymphocytes à leur surface basolatérale (Jepson et Clark, 1998). Par ailleurs, elles

sont situées dans l'épithélium associé aux follicules (FAE). Ces cellules sont donc juste au-dessus des follicules lymphoïdes (plaques de Peyer) et sont dispersées dans le tractus intestinal (Jepson et Clark, 1998; Sirard et al., 1999). Un des rôles des cellules M est de transporter les antigènes à travers la muqueuse de l'intestin vers les tissus lymphoïdes afin d'activer les réponses immunes (Finlay et Cossart, 1997; Jepson et Clark, 1998). La proportion des cellules M dans les FAE varie, passant de 10% chez les humains, 50% chez les lapins et à près de 100% dans l'iléon terminal des porcs et des veaux (Jepson et Clark, 1998).

2.3.3.2 : Invasion de *Salmonella* Typhimurium dans les cellules non-phagocytaires

L'absorption de particules par les cellules est accomplie grâce à une invagination de leur membrane cytoplasmique, processus appelé endocytose (Prescott et al., 1995). La pinocytose diffère légèrement de l'endocytose dans la manière d'absorber les particules extracellulaires. Dans le cas de la pinocytose, les particules sont capturées dans de petites vésicules (Prescott et al., 1995). Peu après son adhésion sur la surface cellulaire, *S. Typhimurium* induit son internalisation dans la cellule par un autre procédé, soit la macropinocytose (Finlay et Cossart, 1997; Galán, 2001). Pour ce faire, il doit modifier le cytosquelette de la cellule de façon à être enroulé dans la membrane cytoplasmique et à créer une sorte de vacuole à l'intérieur de la cellule (Galán, 2001). Lors du contact entre la bactérie et la cellule-hôte, un système de sécrétion de type III, codé dans l'îlot de pathogénicité 1 (SPI I), est activé (Brumell et al., 1999; Hueck, 1998). Le rôle principal de ce système est d'injecter des protéines bactériennes directement dans les cellules eucaryotes (Hueck, 1998). Ce système est sec-indépendant, c'est-à-dire qu'il sécrète des protéines qui ne possèdent pas de séquence signal qui peut être clivée dans l'espace périplasmique (Galán, 2001). Par ailleurs, le système sec-dépendant nécessite la présence de plusieurs protéines accessoires pour accomplir le processus d'exportation, c'est-à-dire le transport des protéines cibles au travers des membranes internes et externes. Il a aussi besoin de signaux extracellulaires pour permettre le fonctionnement complet du système (Galán, 2001; Galán, 1996). Les principaux changements provoqués par le système de sécrétion de type III du SPI 1 sont : la stimulation de la cellule-hôte pour

réorganiser le cytosquelette d'actine, la modulation directe des mouvements de l'actine et la régulation inverse des stimuli bactériens pour permettre à la cellule-hôte de retrouver son aspect normal (Galán, 2001).

Une déformation de la bordure en brosse cellulaire est observée lors du contact entre la bactérie et la cellule-hôte. Ce mécanisme conduit à une invagination de la membrane cellulaire à l'endroit où la bactérie a établi le contact avec la cellule-hôte (Brumell et al., 1999). Les diverses étapes entraînant l'internalisation ne sont pas toutes élucidées. Pour l'instant, certaines études suggèrent que les signaux transmis par la bactérie initient une internalisation par la transformation de l'actine. Pour ce faire, ces signaux se lieraient aux microfilaments et à leurs protéines de liaison α -actinine, tropomyosine et probablement myosine. Bien qu'il y ait aussi une accumulation de tubuline, d'ezrin et de taline, leurs rôles dans l'internalisation ne sont pas encore connus (Finlay et Cossart, 1997; Finlay et al., 1991). Cette étape permettrait de créer des appendices qui se rejoindraient éventuellement en entourant la bactérie (Finlay et Cossart, 1997; Finlay et al., 1991). D'autres événements surviennent lors de l'internalisation, dont la stimulation de tyrosines kinases et de phospholipase A2 et le flot rapide de calcium et de métabolites d'acide arachidonique (Pace et al., 1993).

La membrane est ensuite rompue et elle roule sur elle-même pour former une vésicule autour de la bactérie (Ohl et Miller, 2001). Quand le phénomène d'internalisation est complété, les structures qui ont servi à la formation de la vacuole disparaissent et la cellule retrouve son aspect normal, c'est-à-dire que les microvilli se sont régénérés (McCormick et al., 1996). Dans les cellules, ces bactéries résident dans de larges phagosomes où elles survivent et se répliquent (Finlay et Cossart, 1997; Sukhan, 2000). Différentes vacuoles peuvent fusionner ensemble pour former de larges vésicules contenant plusieurs bactéries (Salyers et Whitt, 1994). Contrairement à *Shigella* spp. et *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ne tentera pas de s'échapper des vacuoles pour entrer dans le cytoplasme de l'hôte (Galán, 1996; Salyers et Whitt, 1994). Les conditions présentes à l'intérieur de la vacuole sont plutôt extrêmes pour la bactérie quant à la faible concentration de Mg^{2+} et Fe^{2+} et au pH acide (Garcia-del Portillo et al., 1992). Toutefois, la bactérie survit à cet

environnement grâce à plusieurs systèmes de régulation, dont Fur, Ada, RpoS et PhoPQ (Bearson et al., 1998). Les mécanismes d'action de ces systèmes de régulation seront décrits à la section 2.4.4.

2.3.3.3 : Invasion de *Salmonella* Typhimurium dans les leucocytes

Éventuellement, la vacuole contenant les bactéries quittera la surface apicale pour se rendre jusqu'à la surface baso-latérale de la cellule-hôte (Ohl et Miller, 2001). À cet instant, les bactéries s'échapperont de la vacuole en détruisant la cellule M pour envahir les cellules voisines par leurs surfaces basolatérale et apicale (Finlay et Cossart, 1997; Frost et al., 1997). Pendant ce processus, certaines bactéries seront relâchées dans les tissus lymphoïdes subépithéliaux et dans la lamina propria (Frost et al., 1997; Guiney et al., 1995). À cet endroit, les salmonelles devront survivre parmi les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les neutrophiles (Monack et al., 1996). Les salmonelles seront phagocytées par les macrophages résidents et les cellules dendritiques où elles devront éviter leurs mécanismes de défense pour survivre et être disséminés dans l'organisme (Sirard et al., 1999).

2.3.3.3.1 : Mécanismes utilisés par les macrophages pour la dégradation

En général, les macrophages protègent l'hôte en phagocytant les particules étrangères et en les gardant dans des vacuoles nommées phagosomes (Prescott et al., 1995). À mesure que le phagosome évolue, les protéines initiales qui composent sa paroi disparaissent et sont remplacées par d'autres, d'abord par les protéines des endosomes précoces, puis par les protéines présentes dans les endosomes tardifs et les prélysosomes, par exemple les protéines de membrane lysosomale (LAMPs) (Rathman et al., 1997). Le phagosome mature fusionne ensuite avec un lysosome et les particules étrangères sont digérées (Prescott et al., 1995). La dégradation est assurée par plusieurs mécanismes dont les défensines (protéines importantes dans la lutte antimicrobienne), les réactifs d'oxygène libres (peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyl, hypochlorites et superoxide), les intermédiaires d'azote réactifs, la limitation des nutriments, l'acidification du compartiment et l'action d'enzymes

hydrolytiques (hydrolases) présentes dans les lysosomes (Jones et Falkow, 1996; Ohl et Miller, 2001; Prescott et al., 1995). Ces enzymes incluent les cathepsines, phosphatases lysosomales acides (LAP) et les β -glucuronidases (Rathman et al., 1997).

2.3.3.3.2 : Survie de *Salmonella* Typhimurium dans les macrophages

La survie des salmonelles dans les macrophages dépend en grande partie de l'évitement de la fusion du phagosome avec le lysosome (Brumell et al., 1999; Jones et Falkow, 1996; Rathman et al., 1997; Uchiya et al., 1999). Les phagosomes contenant des salmonelles vivantes sont dépourvus des récepteurs cathepsins D et L et mannose 6-phosphate (Brumell et al., 1999; Rathman et al., 1997). Selon l'étude de Rathman et collaborateurs, les phagosomes contenant des billes de latex ou des salmonelles tuées par la chaleur ont ces récepteurs, ils fusionnent avec les lysosomes et la dégradation des particules étrangères a lieu (Rathman et al., 1997). L'absence de ces récepteurs semble donc être suffisante pour empêcher la fusion du phagosome et du lysosome (Brumell et al., 1999; Rathman et al., 1997). Toutefois, certains chercheurs ont découvert que des phagosomes se fusionnent avec des lysosomes 20 minutes après le début de l'infection. Ces résultats divergents pourraient être causés par une différence dans les définitions de l'état de fusion des phagosomes avec les lysosomes. De plus, les méthodes utilisées pour différencier les lysosomes pourraient compromettre les fonctions des ceux-ci (Oh et al., 1996; Rathman et al., 1997). L'opsonisation des salmonelles ne semble pas avoir d'influence sur la survie des bactéries dans les macrophages (Rathman et al., 1997). Par ailleurs, *S. Typhimurium* a une multitude de gènes qui sont impliqués dans la survie et la réplication dans un environnement acide et la plupart de ceux-ci sont activés par RpoS ou PhoPQ (Bearson et al., 1998; Jones et Falkow, 1996). Les mécanismes d'action de ces systèmes de régulation seront décrits à la section 2.4.4.

2.3.3.3.3 : Mort des macrophages lors de l'invasion par *Salmonella Typhimurium*

Dans les macrophages, la réplication des salmonelles a lieu principalement dans des phagosomes. Une fois le processus de multiplication bactérienne terminé, il y a une lyse des macrophages pour permettre le relâchement des salmonelles dans l'environnement (Lindgren et al., 1996). Les mécanismes impliqués dans la mort des macrophages ne sont pas totalement élucidés. Certaines études suggèrent un arrêt de la machinerie cellulaire 6 à 14 heures après la formation des phagosomes alors que d'autres proposent un suicide par surproduction d'interleukine 1 et de TNF α (Lindgren et al., 1996; Monack et al., 1996). Les bactéries demeurent dans les macrophages même après la mort de ceux-ci, peut-être pour absorber les nutriments qui y étaient emmagasinés (Lindgren et al., 1996). Après un certain temps, les bactéries quittent les macrophages morts et infectent les cellules adjacentes pour se disséminer dans les différents organes de l'hôte tout en évitant son système immunitaire (Lindgren et al., 1996).

2.3.3.3.4 : Invasion de *Salmonella Typhimurium* dans les cellules dendritiques

Chez le porc, des cellules dendritiques ont été isolées dans les plaques de Peyer du petit intestin (Makala et al., 1998). Bien que leurs rôles n'aient pas encore été totalement élucidés lors d'une infection à *Salmonella*, elles pourraient prendre des spécimens des bactéries intestinales, facilitant ainsi leur pénétration au travers des parois intestinales (Wick, 2003). Les cellules dendritiques sont des phagocytes et des cellules présentatrices d'antigènes qui sont importantes pour la stimulation du système immunitaire acquis (Wick, 2003). Ces cellules sont situées dans des endroits stratégiques où elles peuvent rencontrer des antigènes, par exemple dans l'espace sous la peau, les surfaces mucosales et sous les cellules M (García-del Portillo et al., 2000; Niedergang et al., 2000; Wick, 2003). Lorsque les cellules dendritiques capturent un antigène, elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour interagir avec les cellules T (Wick, 2003). Les cellules dendritiques sont impliquées, entre autres, dans l'activation des cellules T par la présentation des antigènes par leur complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) classe I et II (Abbas et al., 1997).

L'invasion de cellules dendritiques est accomplie par un procédé similaire à celui utilisé pour les macrophages, c'est-à-dire par la formation d'une vacuole spéciale (Richter-Dahlfors et al., 1997). L'évolution de la vacuole dans ces cellules n'entraîne pas la fusion avec les lysosomes ou les endosomes tardifs (Richter-Dahlfors et al., 1997). De plus, ces vacuoles ne contiennent pas de glycoprotéines membranaires lysosomales, par opposition aux vacuoles présentes dans les macrophages et les cellules non-phagocytaires (Richter-Dahlfors et al., 1997). Les bactéries peuvent atteindre les différents organes de l'hôte en se dispersant dans le système réticulo-endothélial à l'aide des phagocytes infectés (Ohl et Miller, 2001).

2.4 : Mécanismes de virulence de *Salmonella Typhimurium* chez le porc

S. Typhimurium est un pathogène intracellulaire facultatif (Ohl et Miller, 2001; Salyers et Whitt, 1994). Cette bactérie s'est donc adaptée à différentes situations incluant l'invasion, la survie et la réplication dans divers milieux incluant les cellules de l'hôte (Ohl et Miller, 2001). Plusieurs des gènes nécessaires à l'accomplissement de ces actions sont situés dans des régions spécifiques du chromosome nommées îlots de pathogénicité (PI) (Shea et al., 1999).

2.4.1 : Caractéristiques des îlots de pathogénicité

Les îlots de pathogénicité sont présents chez de nombreuses espèces à Gram négatif et à Gram positif incluant *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes* et *Streptococcus pyogenes* (Groisman et Ochman, 1996; Hacker et al., 1997; Sirard et al., 1999). Ces îlots sont caractérisés, entre autres, par la présence d'au moins un gène de virulence, un contenu en G + C différent de la bactérie-hôte, une association avec des gènes d'ARNt et/ou des séquences d'insertion à leurs extrémités, la présence de gènes mobiles, d'intégrases, de transposases. De plus, ils sont présents chez les isolats pathogènes et absents chez les isolats moins pathogènes, occupent de larges parties du chromosome et sont instables (Hacker et al., 1997). Ces îlots seraient transmis par un transfert horizontal

grâce à des bactériophages ou des plasmides, c'est-à-dire que l'échange de matériel génétique est accompli par transformation, conjugaison ou transduction (Sukhan, 2000). Les PI des bactéries à Gram positif n'ont pas tous les critères énumérés plus haut. En effet, ils n'ont pas de sites de jonction spécifiques à la fin de l'îlot comme les répétitions directes ou les locus d'ARNt, ils ne transportent pas de gènes mobiles et semblent s'être intégrés de manière stable dans le génome (Hacker et al., 1997).

2.4.2 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella* (SPI)

S. choleraesuis a cinq îlots de pathogénicité : SPI 1, 2, 3, 4 et 5. *S. bongori*, pour sa part, possède les îlots SPI 1, 3, 4 et 5 (Groisman et al., 1999). SPI 1 et SPI 2 codent, entre autres, pour un système de sécrétion de type III. Étant donné que le SPI 2 est absent chez *S. bongori*, cette espèce ne peut survivre dans les macrophages ni causer d'infection systémique (Sukhan, 2000). Les fonctions des protéines codées dans chaque îlot ainsi que les interactions entre les îlots ne sont pas encore totalement élucidées, mais certaines évidences ont été notées.

2.4.2.1 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella* Typhimurium : SPI 1

SPI 1 est présent dans la région du centisome 63, il mesure environ 40 kb et code au moins 31 protéines (Groisman et Ochman, 1996; Groisman et al., 1999). Les protéines du SPI 1 sont impliquées dans la déformation de la membrane des cellules-hôtes non-phagocytaires lors de l'invasion des bactéries, dans l'interférence avec les mécanismes de transduction et dans l'induction de la mort des macrophages par apoptose (Groisman et al., 1999). Le système de sécrétion de type III, nommé Inv-Spa, sécrète les protéines dans la cellule-hôte et le relâchement de celles-ci est directement régulé, entre autres, par les protéines HilA, InvF, InvJ, SpaO, SipB et SipD (Eichelberg et Galán, 1999; Sukhan, 2000). HilA est régulé par des protéines régulatrices globales comme PhoP/PhoQ et certains facteurs environnementaux dont le stade de croissance et les stress oxydatif et osmolaire (Eichelberg et Galán, 1999). HilA est impliqué dans la régulation de InvF et des machineries nécessaires à la sécrétion et à la translocation des molécules effectrices du SPI 1 (Eichelberg et Galán,

1999). Les molécules effectrices impliquées dans la machinerie servant à la translocation sont codées dans le SPI 1, quoique certaines protéines comme SopB sont codées dans des régions à l'extérieur de cet îlot. La régulation de ces molécules effectrices est assurée en partie par InvF (Eichelberg et Galán, 1999). L'adhérence et l'entrée dans les cellules non-phagocytaires est effectuée, entre autres, par la protéine membranaire InvH (Sukhan, 2000). Les changements observés lors de l'invasion des cellules non-phagocytaires nécessitent l'action de la plupart des gènes présents dans le SPI 1 (Groisman et al., 1999). Toutefois, certaines protéines, dont SopE, SipA, SipC, SptP, AvrA, SipB, SopB et SopD, provoquent les transformations les plus spectaculaires. Par exemple, SopE (protéine dont le gène est situé à l'extérieur du SPI 1) stimule les GTPases qui activent le remaniement du cytosquelette. SipA et SipC se lient à l'actine. L'action de ces trois protéines provoque la réorganisation du cytosquelette (Sukhan, 2000). SptP inhibe l'activité des GTPases initiée par SopE, permettant ainsi le rétablissement du cytosquelette (Ohl et Miller, 2001). La protéine AvrA pourrait causer une réponse de type hypersensible, causant la mort de la cellule infectée (Groisman et al., 1999). La mort des macrophages est induite lors de l'activation de la caspase-1 par SipB (Hersh et al., 1999). SopB (dont le gène est codé dans le SPI 5) et SopD sont impliquées dans la sécrétion de chlore sous forme ionique (Cl⁻) par les cellules infectées (Groisman et al., 1999). Rappelons qu'il y a une augmentation de la sécrétion de chlore ionique au début de l'infection (Gray et Fedorka-Cray, 1996; Schwartz, 1999).

2.4.2.2 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella Typhimurium* : SPI 2

SPI 2 est situé sur le centisome 30,7, il mesure environ 40 kb et il code au moins 32 protéines (Groisman et al., 1999; Shea et al., 1996). SPI 2 est utilisé pour la survie et la multiplication dans les macrophages ainsi que lors de l'infection systémique chez la souris (Shea et al., 1999; Sukhan, 2000; Uchiya et al., 1999). Le système de sécrétion de type III, nommé Spi-Ssa, est activé lorsque la bactérie est entrée dans un macrophage. Ce système est régulé en partie par le système de régulation à deux composantes SsrA/SsrB (Cirillo et al., 1998; Groisman et al., 1999). Peu de données sont actuellement disponibles concernant d'autres

mécanismes de régulation du SPI 2. L'inhibition de la fusion entre le phagosome et le lysosome est assurée par SpiC, bien que les mécanismes biochimiques impliquant cette protéine soient encore inconnus (Galán, 2001; Sukhan, 2000). Cette protéine, excrétée dans le cytoplasme des macrophages, empêche aussi la voie normale de transport de vésicules ne contenant pas de salmonelles (Uchiya et al., 1999). Les protéines du SPI 2 ne sont pas impliquées dans la diminution de la production d'intermédiaires d'azote réactif. Toutefois, l'enzyme responsable de la production d'azote réactif, « inducible nitric oxide synthase » est rarement présente dans les vacuoles contenant des salmonelles possédant le SPI 2 (Chakravorty et al., 2002). Les protéines du SPI 2 préviennent aussi la co-localisation des vacuoles contenant la salmonelle avec les oxydases NADPH-dépendantes qui catalysent la production d'oxygène réactif (Vasquez-Torres et al., 2000). Par ailleurs, la dissémination dans les ganglions lymphatiques mésentériques, puis dans les organes comme le foie et la rate, semble nécessiter certaines protéines du SPI 2 (Cirillo et al., 1998; Shea et al., 1999). D'autres recherches seront nécessaires pour relier les protéines du SPI 2 avec les phénotypes observés.

2.4.2.3 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella Typhimurium* : SPI 3

Cet îlot est situé juste derrière le locus de l'ARNt *selC* au centisome 82, il mesure 17 kb et il contient au moins 10 gènes (Blanc-Potard et Groisman, 1997; Blanc-Potard et al., 1999). La survie dans les phagosomes des macrophages de la souris dépend en partie du SPI 3. Contrairement au SPI 1 et au SPI2, il ne semble pas y avoir de régulation directe à l'intérieur de cet îlot à l'exception du système global de régulation à deux composantes PhoP/PhoQ. Les mécanismes d'action de ce système de régulation seront décrit à la section 2.4.4. Le transport de l'ion magnésium (Mg^{2+}) à l'intérieur du phagosome est médié par les protéines MgtC et MgtB (Blanc-Potard et Groisman, 1997; Blanc-Potard et al., 1999).

2.4.2.4 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella* Typhimurium : SPI 4

L'îlot de pathogénicité 4 est situé au centisome 92, il mesure environ 25 kb et il code au moins 18 protéines (Wong et al., 1998). La sécrétion de toxines pourrait être accomplie en partie par le SPI 4 (Wong et al., 1998). Les mécanismes de régulation agissant sur cet îlot n'ont pas encore été élucidés. Certaines protéines du SPI 4 semblent former un système de sécrétion de type I (Wong et al., 1998). Ce système est composé de trois protéines : une enzyme adénosine triphosphate (ATPase) localisée dans la membrane interne, une protéine localisée dans la membrane externe formant un pore dans la membrane et une protéine située dans la membrane interne et reliant les deux autres protéines (Sukhan, A. 2000). Ce système de sécrétion serait impliqué dans la sécrétion de toxines (Wong et al., 1998).

2.4.2.5 : Îlots de pathogénicité chez *Salmonella* Typhimurium : SPI 5

L'îlot de pathogénicité 5 est situé juste derrière le locus de l'ARNt *serT*, environ au centisome 20, il mesure 7 kb et il code au moins 6 protéines (Sirard et al., 1999; Wood et al., 1998). Les protéines de cet îlot sont impliquées dans l'entéropathogénicité (Wood et al., 1998). Les mécanismes de régulation agissant sur cet îlot n'ont pas encore été élucidés. L'excrétion de chlore sous forme ionique (Cl⁻) par les cellules infectées est causée en partie par SopB (Groisman et al., 1999). La surface des cellules-hôtes pourrait être attaquée par PipD, une protéine ayant une structure similaire aux dipeptidases présentes chez *Lactobacillus* spp. qui sont impliquées dans la dégradation des polypeptides présents dans le fromage pour obtenir les acides aminés nécessaires pour les bactéries (Fernandez-Espla et Martin-Hernandez, 1997; Wood et al., 1998).

2.4.3 : Plasmide de virulence de *Salmonella* Typhimurium

Un plasmide de virulence est présent chez la plupart des sérotypes de *Salmonella* qui ne causent pas la fièvre typhoïde et il mesure entre 50 et 100 kb (Bauerfeind et al., 2001; Groisman et al., 1999). Il y a au moins un plasmide mesurant environ 90 kb chez la plupart des isolats de *S. Typhimurium*, bien qu'il ne

semble pas être transféré de façon systématique lors de la réplication de ce sérovar (Chu et al., 2002; Guerra et al., 2002). Les protéines codées par le plasmide sont impliquées dans la croissance intracellulaire dans les tissus extra-intestinaux, dans la mort des macrophages par apoptose, dans la résistance à la lyse bactérienne causée par le système du complément, l'invasion des cellules eucaryotes, la formation d'un pilus de conjugaison et le fimbriae *pef* (Bäumler et al., 1996a; Camacho et Casadesús, 2002; Guiney et al., 1995; Libby et al., 2000). Chez quelques sérotypes de la sous-espèce I, dont *S. Typhimurium* et *S. Choleraesuis*, le plasmide code pour les gènes *spv* et *rep* (Boyd et Hartl, 1998). Le plasmide de *S. Typhimurium* contient aussi les gènes *rck*, *tra* et *pef* (Bäumler et al., 1996a; Chu et al., 2002; Cirillo et al., 1996). L'opéron *spv*, d'une longueur approximative de 8 kb, est retrouvé dans le chromosome de certains sérotypes des sous-espèces II, IIIa, IV et VII (Boyd et Hartl, 1998). Cet opéron n'a pas été détecté dans les sous-espèces IIIb, V et VI (Boyd et Hartl, 1998). Les protéines SpvR et RpoS agissent comme un activateur pour stimuler la transcription des gènes *spvABCD* (Guiney et al., 1995). L'expression des gènes de cet opéron est à son maximum à la fin de la phase exponentielle, alors que les nutriments sont limités (Guiney et al., 1995). L'opéron *spv* est impliqué lors de la croissance intracellulaire dans les tissus extra-intestinaux et dans la mort des macrophages par apoptose (Guiney et al., 1995; Libby et al., 2000). Les gènes *repABC* sont importants pour la réplication du plasmide (Boyd et Hartl, 1998). La résistance au complément et l'invasion des cellules eucaryotes sont conférées en partie par la protéine Rck. Les mécanismes exacts régissant cette protéine n'ont pas encore été démontrés. L'opéron *tra* code pour des protéines nécessaires à la formation d'un pilus de conjugaison (Camacho et Casadesús, 2002). L'opéron *pef* code pour un fimbriae qui est important lors de l'adhésion sur la surface de l'intestin et lors de l'accumulation des fluides chez la souris (Bäumler et al., 1996a).

2.4.4 : Systèmes de régulation de la virulence de *Salmonella Typhimurium*

La réussite d'une infection par *Salmonella* spp. dépend de la capacité de la bactérie à survivre dans des conditions diverses, parfois extrêmes. L'activation et la répression des facteurs de virulence sont régies par plusieurs systèmes de régulation à

deux composantes. Parmi ceux-ci, notons OmpR/EnvZ, SsrA/SsrB et PhoP/PhoQ. EnvZ est une protéine membranaire qui est sensible au pH acide ainsi qu'à une faible osmolarité. Ces conditions surviennent entre autre à l'intérieur des vacuoles des macrophages et elles stimulent EnvZ. Cette protéine activera alors OmpR. OmpR agit comme activateur pour la transcription d'un autre système à deux composantes présent dans le SPI 2 : *ssrA/ssrB* (Lee et al., 2000). Les autres gènes régulés par OmpR/EnvZ ne sont pas encore connus. La protéine SsrA est une protéine membranaire qui est stimulée en présence d'un pH acide ou d'un milieu ayant une faible osmolarité. Elle active la protéine SsrB qui déclenchera à son tour la transcription du système de sécrétion de type III présent dans le SPI 2 (Cirillo et al., 1998; Lee et al., 2000). Le facteur RpoS est activé lors d'une carence nutritionnelle en phosphate, carbone et azote, de la présence d'acide organique, d'un endommagement de l'ADN ou d'un stress oxydatif (Bearson et al., 1998; Fang et al., 1992; O'Neal et al., 1994). L'activité de RpoS augmente en fin de phase post-exponentielle (Guiney et al., 1995). Bien que ce facteur soit présent chez de nombreuses bactéries, son activité a été principalement décrite chez *E. coli* (Ibanez-Ruiz et al., 2000). Chez *S. Typhimurium*, RpoS est impliqué, entre autre, dans la régulation des gènes *spv* et d'une méthyl-transférase *ogt* (Guiney et al., 1995; Ibanez-Ruiz et al., 2000).

Les protéines PhoP/PhoQ sont impliquées dans la régulation globale des facteurs de virulence comme la survie intracellulaire, l'induction de la macropinocytose et la formation de phagosome (Ernst et al., 1999). PhoQ est une protéine membranaire sensible à des signaux extérieurs. Une fois stimulée, elle active la protéine PhoP qui va ensuite activer et réprimer l'expression d'au moins 40 gènes, nommés gènes PhoP activés (*pag*) et gènes PhoP réprimés (*prg*) (Ernst et al., 1999; Scherer et Miller, 2001). Parmi les *pag*, il y a plus de 10 protéines de la membrane externe et certaines sont sécrétées : une phosphatase acide non spécifique, des transporteurs de magnésium du SPI 3 et des protéines chargées de la modification de la portion du lipide A des lipopolysaccharides (LPS) (Eichelberg et Galán, 1999; Ernst et al., 1999). Peu de données sont actuellement disponibles sur les gènes régulés par les *prg* à l'exception du régulateur des gènes d'invasion du SPI 1 HilA

(Eichelberg et Galán, 1999; Scherer et Miller, 2001). L'action des *prg* a été notée lorsque la bactérie est en milieu riche, acide ou très alcalin, en présence comme en absence d'oxygène. Le gène *prgH* est en cause lors du pH alcalin de même qu'en condition aérobie alors que le gène *prgB* est activé en pH acide et en condition anaérobie. Les *prg* semblent exprimés quand la bactérie est dans le milieu extracellulaire, alors qu'elle entre en contact avec une cellule-hôte pour induire l'endocytose (Behlau et Miller, 1993). Le système de régulation Fur est impliqué, entre autres, dans les mécanismes de régulation du fer et dans la tolérance au choc acide. Les protéines Fur sont importantes pour la synthèse, l'excrétion et la récupération des sidérophores qui chélatent les ions de fer. Quand la concentration en fer est trop élevée, les protéines Fur vont se lier au promoteur Fur et empêcher la transcription des gènes *fur*. Quand la concentration en fer diminue, les protéines Fur quittent le promoteur pour aller capturer les ions de fer (Hall et Foster, 1996). Les protéines du système de régulation Ada sont impliquées dans la réponse à des agents alcalins en enlevant des groupes méthyl des résidus O⁶-méthylguanine et il est un activateur transcriptionnel potentiel pour ses propres gènes et d'autres gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Saget et Walker, 1994).

2.4.5 : Fimbriae de *Salmonella* Typhimurium

L'adhésion des bactéries sur la muqueuse intestinale et les cellules M de la souris est accomplie par les fimbriae (Bäumler et al., 1996b; van der Velden et al., 1998). *S. Typhimurium* a plusieurs sortes de fimbriae dont : *lpf* (long polar), *fim* (type I), *agf* (thin aggregative) et *pef* (plasmid-encoded) (van der Velden et al., 1998). Chez la souris, l'opéron *lpf* est impliqué dans l'adhésion aux cellules M, le fimbriae type 1 codé par l'opéron *fim* se lie aux entérocytes par leurs résidus mannoses présents à leur surface, l'opéron *agf* provoque l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales du petit intestin et l'opéron *pef* est important pour l'adhésion au petit intestin et pour l'accumulation de fluides chez le souriceau (Bäumler et al., 1996a; Bäumler et al., 1996b; Sukupolvi et al., 1997; Thankavel et al., 1999). Les effets observés lors de l'adhérence d'une souche ayant perdu une sorte de fimbriae aux cellules de l'intestin de souris sont minimes. La diminution de l'adhérence a été

notée chez des souches dont au moins deux sortes de fimbriae étaient absents. La colonisation de l'intestin de la souris serait donc possible même si l'un des types fimbriae n'est pas fonctionnel (van der Velden et al., 1998).

2.4.6 : Toxines produites par *Salmonella* Typhimurium

Une toxine est une molécule spécifique qui est synthétisée par l'agent pathogène et qui nuit à l'hôte. Les toxines sont regroupées selon deux catégories : les exotoxines et les endotoxines (Prescott et al., 1995).

2.4.6.1 : Exotoxines

Les exotoxines sont des protéines solubles sensibles à la chaleur, fortement immunogènes et qui sont généralement relâchées par le pathogène pendant sa croissance (Prescott et al., 1995). Bien que plusieurs types de toxines aient été détectés chez *S. Typhimurium*, aucun n'a encore été caractérisé. Certaines études mentionnent que ce sérotype produit des entérotoxines semblables à la Choléra-toxine et à la Shiga-toxine alors que d'autres prétendent que le type phagique DT104 sécréterait une collagénase (Gray et Fedorka-Cray, 1996; Wu et al., 2002). La toxine cholérique, composée de deux protéines, agit sur les cellules mucosales pour produire les symptômes sévères de la diarrhée, c'est-à-dire la sécrétion d'importantes quantités d'eau et d'électrolytes (Prescott et al., 1995; Salyers et Whitt, 1994). La toxine Shiga, composée de deux protéines, provoque la mort des cellules en arrêtant la synthèse protéique de la cellule-hôte, causant des symptômes allant d'une diarrhée à une paralysie (Prescott et al., 1995; Salyers et Whitt, 1994). La collagénase est une enzyme qui dégrade le collagène qui entoure les tissus conjonctifs (Prescott et al., 1995). Cette enzyme permettrait donc une meilleure pénétration dans les tissus de l'hôte (Carlson et al., 2002).

2.4.6.2 : Endotoxines

L'endotoxine des bactéries à Gram négatif est appelée lipopolysaccharide (LPS), une de ses extrémités est située dans la membrane externe et elle est libérée lors de la lyse bactérienne (Abbas et al., 1997; Prescott et al., 1995; Salyers et Whitt, 1994). Contrairement aux exotoxines, les endotoxines sont stables à la chaleur et sont semblables chez la plupart des bactéries à Gram négatif (Prescott et al., 1995). Le LPS est divisé en trois parties : le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O (Prescott et al., 1995). Le lipide A, composé principalement d'acides gras et de substitués phosphatés, est inséré dans la membrane externe et il est toxique (Ernst et al., 1999; Prescott et al., 1995). Le lipide A peut activer la cascade du complément et stimuler la sécrétion de cytokines par les phagocytes (Salyers et Whitt, 1994). Le polysaccharide central est lié au lipide A et à la chaîne latérale O et il est formé d'environ 10 sucres dont plusieurs ont une structure particulière (Prescott et al., 1995). La chaîne latérale O est constituée de plusieurs sucres dont la composition et la quantité varient selon les souches bactériennes (Prescott et al., 1995). Certains symptômes manifestés lors de la diarrhée, comme la fièvre et les crampes abdominales, sont en partie causés par l'inflammation de la muqueuse intestinale en réponse au LPS (Salyers et Whitt, 1994). Le LPS ne semble pas être le principal composant requis pour l'invasion étant donné que certaines souches de *S. Typhimurium* ayant un LPS constitué de longues chaînes latérales étaient faiblement invasives (Martin et al., 2000).

2.5 : Détection de *Salmonella Typhimurium* chez le porc

L'identification d'une espèce bactérienne est parfois impossible en se basant uniquement sur les symptômes apparents chez un hôte (Schwartz, 1999). *S. Typhimurium* est un pathogène intracellulaire facultatif qui parasite des cellules pour se répliquer dans une niche privilégiée tout en évitant certains mécanismes de défense de l'organisme (Jones et Falkow, 1996). Selon le stade de l'infection, plusieurs méthodes peuvent être employées pour déceler ce sérotype.

2.5.1 : Détection par la bactériologie

Cette technique repose sur la capacité des différentes espèces bactériennes à croître dans des conditions diverses. Tout d'abord, il faut mettre l'échantillon à analyser dans un milieu d'enrichissement non-sélectif pour récupérer les bactéries qui ont subi un stress intense ou qui ont été affaiblies lors de l'infection. Après une incubation de 18 à 24 heures, une portion de ce bouillon est transférée dans un milieu sélectif. Une incubation de 18 à 24 heures à une température élevée, située entre 41 et 43 °C, permet la réduction des espèces bactériennes autres que *Salmonella* spp. L'étalement de cette culture sur une gélose sélective et différentielle est essentielle pour l'isolement des salmonelles (D'Aoust et al., 1992). Bien que la composition de ces géloses soit très variée, chacune contient un ou plusieurs agents qui limitent la croissance des espèces autres que *Salmonella* spp. et un indicateur qui change de couleur selon l'utilisation d'un sucre particulier ou la production de certains substrats (Perry et al., 2002). Les étapes finales de l'analyse incluent l'étude biochimique des colonies suspectes pour la salmonelle et les réactions sérologiques en présence d'antisérums polyvalents et spécifiques pour chaque groupe de *Salmonella* (D'Aoust et al., 1992). La détection peut prendre entre 3 et 7 jours (Gray et Fedorka-Cray, 1996). La sensibilité de ce test est d'environ 1×10^2 ufc de *Salmonella* spp. par gramme de fèces (Cohen et al., 1994).

2.5.2 : Détection des animaux ayant été infectés par *Salmonella* par ELISA

La technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) repose sur la spécificité des anticorps pour les antigènes. Dans la méthode utilisée pour cette étude, divers antigènes représentant le LPS de différents groupes de *Salmonella* sont fixés dans des cupules de la plaque. Le sérum à tester contenant possiblement des anticorps spécifiques est ensuite ajouté dans les cupules. Si les anticorps sont dirigés contre un des antigènes présents, ils resteront accrochés au fond du puits. Les cupules sont ensuite lavées pour enlever les anticorps non fixés. Un anticorps ayant une spécificité pour la partie constante des anticorps (partie Fc) est ajouté dans les cupules qui sont ensuite lavées, puis une solution chromogène est incorporée dans les

puits. Ces anticorps sont couplés à une enzyme comme la peroxydase de raifort. S'il y a des complexes anticorps-antigènes dans le puits, l'enzyme dégradera le chromogène incolore en un substrat coloré (Prescott et al., 1995). La technique ELISA permet de détecter les anticorps dirigés contre les micro-organismes en un jour ou moins (Gray et Fedorka-Cray, 1996). La technique ELISA peut aussi être utilisée pour rechercher *Salmonella* spp. Dans ce cas, des anticorps dirigés contre la salmonelle sont fixés au fond des cupules et la salmonelle se lie à ceux-ci (Abbas et al., 1997).

2.5.3 : Détection par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet de répliquer une séquence d'ADN de façon exponentielle (Gray et Fedorka-Cray, 1996). L'amplification est faite par une ADN polymérase, nommée Taq polymérase, qui provient d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*) et qui demeure active même à des températures de 90 °C (Salyers et Whitt, 1994). L'ADN qui contient une séquence à amplifier est mélangé avec la Taq polymérase, des déoxyribonucléotides et un excès d'amorces. Une amorce est une séquence qui code pour le début d'une région de l'ADN qui est recherchée (Abbas et al., 1997). La température est alors élevée à 90 °C pour séparer les brins. Par la suite, la température est descendue à 60 °C afin que les amorces puissent s'apparier avec les brins d'ADN. Finalement, la synthèse d'ADN est effectuée par la Taq polymérase lorsque la température est élevée à 72 °C. Ce cycle est répété pendant au moins 30 fois pour qu'il y ait une quantité suffisante d'ADN (Salyers et Whitt, 1994). Les produits du PCR ou amplicons sont séparés par électrophorèse. Pour ce faire, les amplicons sont déposés dans des puits qui ont été créés dans un gel d'agarose. Étant donné que les amplicons ont une charge et une taille variées, ils migreront à des vitesses différentes lorsqu'un champ électrique est appliqué dans le gel (Prescott et al., 1995). Les différentes bandes sont teintes avec du bromure d'éthidium et visualisées sous les rayons ultraviolets (Scholz et al., 2001). La sensibilité du test dans un échantillon sans enrichissement est réduite. Toutefois, cette technique permet de détecter 5,7 ufc par

gramme d'un échantillon de moulée après enrichissement (Schrank et al., 2001). L'utilisation d'un multiplex PCR, c'est-à-dire l'amplification simultanée de l'ADN par plusieurs paires d'amorces différentes, permet de vérifier la présence d'un ou de plusieurs segment associé à un type phagique particulier comme *S. Typhimurium* DT104 (Khan et al., 2000).

2.6 : Problématique et objectifs

2.6.1 : Problématique

La salmonellose est l'une des plus importantes causes de gastro-entérite en Amérique de Nord (Buzby et Roberts, 1996; Todd, 1989). Depuis quelques temps, il y a une apparition croissante des cas de salmonellose avec signes cliniques chez le porc (Schwartz, 1999). Les coûts associés à la salmonellose sont importants, autant pour le traitement des animaux que des humains (Todd, 1989). En outre, l'usage répété d'antibiotiques facilite la sélection de souches ayant une résistance multiple aux antibiotiques (Hogue et al., 1997; Mølbak et al., 1999; Poppe et al., 1998). *S. Typhimurium* DT104, ayant une résistance multiple aux antibiotiques, semble plus virulent que les autres types phagiques. Le nombre de cas de salmonellose humaine et porcine causés par ce type phagique connaît une hausse fulgurante dans de nombreux pays dont le Canada (Poppe et al., 2002). Présentement, les connaissances concernant la distribution et la survie de *S. Typhimurium* DT104 dans les différents tissus sont limitées. Ces données permettront de mieux définir les critères de condamnation des carcasses provenant des élevages atteints de salmonellose. De plus, ces résultats permettront une meilleure gestion du risque associé aux lots de porcs provenant d'élevages contaminés.

2.6.2 : Objectifs

Ce projet de maîtrise comportait deux sous-objectifs. Premièrement, étudier la distribution de *Salmonella* spp. dans les organes et le statut final des carcasses chez les porcs provenant d'élevages avec et sans signes cliniques de salmonellose.

Deuxièmement, étudier la distribution et la persistance de *S. Typhimurium* DT104 dans les tissus suite à une infection expérimentale chez le porc. À cette fin, une épreuve PCR multiplex pour *S. Typhimurium* DT104 a été adaptée chez le porc afin de permettre un diagnostic plus rapide de la condition de l'organisme et d'améliorer la gestion du risque.

Chapitre 3.

**Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and
experimental infection in pigs**

**Article en préparation pour publication
dans la revue
Canadian Journal of Veterinary Research**

Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs

Côté Sylvie⁽¹⁾, Letellier Ann⁽¹⁾, Lessard Louise⁽²⁾ and Quessy Sylvain^{(1)*}

¹Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C. P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada , J2S 7C6

²Health Canada, Health of Animals and Food Laboratory, 3400 Casavant West Blvd, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 8E3

*For author correspondence. E-mail address sylvain.quesy@umontreal.ca; Tel. (450) 773-8521 # 8398; Fax (450) 778-8113

Abstract :

Clinical salmonellosis associated with *Salmonella* is increasingly reported in finishing swine. Since *S. Typhimurium* is often associated with these episodes and given that this serotype is among the most often reported in humans, we were interested to determine if various tissues and carcasses from animals coming from herds clinically affected were more likely to be contaminated by *Salmonella* than carcasses from animals raised in herds without any history of salmonellosis. We found that carcasses and mesenteric lymph nodes from animals from affected herds were significantly more contaminated by *Salmonella* while showing increased titers in antibodies directed against this bacterium. At the opposite, feces from both groups of animals were similarly contaminated by *Salmonella*. In the second part of the study, we studied the persistence of the bacterium in various tissues after an experimental infection with *S. Typhimurium*. We found that *Salmonella* persisted for as much as 7 days after the infection in many extraintestinal tissues while it was present in feces of infected animals for all the 14 days experiment. These findings indicated that carcasses from animals that experienced salmonellosis during their growth are more likely to be contaminated by this bacteria and that precaution must be taken to ensure that clinically affected animals should be kept at farm for at least 7 days before being shipped at slaughter.

Introduction :

Salmonella enterica has emerged during last decades as an important public health problem in most developed countries. The main source of infection is consumption of animal products (D'Aoust, 1994). There are over 2500 different serotypes of *Salmonella* (Popoff and al., 2001). Most serotypes are potential human pathogens even though few serotypes are regularly associated with disease (Baggesen and al., 2000). Human infection with multiresistant *S. Typhimurium* DT104 has been associated with consumption of beef, chicken, unpasteurized dairy products, and to a lesser extent, with infected animal contacts (Besser and al., 1997; Glynn and al., 1998; Wall and al., 1994). The most common symptoms in humans infected by *S. Typhimurium* DT104 include diarrhea (100 %), fever (80 %), abdominal pain (65 %), vomiting (45 %), and blood in the stool (27 %) (Poppe and al., 1998).

In pigs, clinical salmonellosis associated with *S. Typhimurium* DT104 is increasingly reported (Poppe and al., 2002) while most animals colonized by this bacteria will remain healthy carriers. Clinical signs associated with salmonellosis in pigs are yellowish diarrhea with fever, prostration and/or mortality. However, information regarding the distribution and the persistence of *S. Typhimurium* DT104 in tissues of pig following the infection are limited. Since the disease may occur at the end of the fattening period, from a public health point of view it is critical to better understand the survival of the bacteria in feces and organs following the infection.

An important aspect of the control of *Salmonella* in the finished product is the detection and the pre-harvest management of affected herds (Alban and al., 2002). Since a significant proportion of animals from infected herds might be carriers of *Salmonella* without any clinical signs it is not clear if the presence of clinical salmonellosis represent an additionnal threat in terms of food safety. The objectives of the study were 1) to compare at slaughter the bacteriological and serological prevalences of various *Salmonella* serotypes and phage types in different tissues and feces of animals from herds with and without clinical signs of salmonellosis and 2) to

investigate the distribution and the persistence of a multiresistant *S. Typhimurium* DT104 in organs of experimentally infected piglets.

Material and Methods :

Collection of samples at slaughter : Sampling was conducted on finishing pigs in one mid-size slaughterhouse federally inspected with a capacity of slaughtering 240 pigs per hour in Québec, Canada between 1999 and 2000. Three criteria were used to select herd with clinical signs. The first one was a diagnosis, based on clinical signs, of salmonellosis by an experienced veterinarian. In addition, one or two of the following criteria was used to select positive herd. The second criteria was isolation of *Salmonella* spp. from intestinal or internal organs of affected animals. Finally, the third criteria was isolation of *Salmonella* spp. from feces collected in pens without detection of other enteric pathogens. None of these criteria were present in selected herds without clinical signs. On arrival at the abattoir, animals were kept in pens for a lairage period of eight to twelve hours prior to slaughter. All animals from herds that experienced clinical salmonellosis were kept in separated pens. The holding pens were washed and disinfected every day.

The herd of origin was identified by the tattoo number of the animal. In total, 178 pigs from 25 herds without clinical signs and 264 pigs from 19 herds with clinical signs were sampled. Antibodies against *Salmonella* were evaluated by an indirect ELISA using 12 different antigens from the four principal serotypes of groups B, C, N and E isolated in North America. Antigens were coated on microwell plates (Sarstedt, Montreal, QC). The washing buffer used in these tests was phosphate buffered saline (PBS) (Fisher, Nepean, ON) containing 500 µL Tween 20 (Fisher). The test and control sera were diluted 1/25 and 1/100 in PBS-Tween 20 and applied in duplicate for 30 minutes at 35 °C, followed by three cycles of washing. Horseradish peroxidase labelled goat antiserum to pig immunoglobulin was diluted 1:1500 in PBS-Tween 20 and 100 µL was added to each well. The conjugate was incubated for 1 hour at 35 °C and the wells were washed as before. Finally, 100 µL of substrate was added (50 µL of a mix of 62,5 µL H₂O₂ 3% with 937,5 µL deionized

water, 12,5 mL citrate , 125 µL ABTS). After incubation for 15 to 40 minutes, plates were read at optical density of 415 nm with positive-negative cut-off of OD % = 40. Bacteriological cultures were performed on 1 gram samples of liver, spleen, mesenteric lymph nodes (MLN) and cecum content collected aseptically (Fedorka-Cray and al., 1994). Sixteen to twenty-four hours after slaughter, carcass swab samples were collected by the three sites sampling scheme as previously described (Anonymous, 1996). One gram of diaphragm muscles were taken on these carcasses (Boes and al., 2001; Fedorka-Cray and al., 1994).

Bacteriological culture : Primary enrichment of feces, MLN, lung, spleen, diaphragm and carcasses samples was done in Nutrient Broth (1 g in 9 mL/18-24 hours at 35 °C) (Difco Laboratories, Detroit, MI). One mL was transferred to 9 mL of Tetrathionate Brilliant Green Broth (TBG) (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) and incubated at 42 °C for 18-24 hours. A loopful was streaked on Brilliant Green Sulfa agar (BGS) (Difco) plates containing 20 µg/mL of novobiocin (Sigma Chemical Co., Oakville, ON), and incubated at 37 °C for 18-24 hours. Suspected colonies were striked to triple sugar iron (TSI) (Difco) and Christensen's urea agars (Difco). Isolates presumptively identified as *Salmonella* spp. were further tested by agglutination against polyvalent O-antisera (Poly A-I & Vi) (Difco), and *Salmonella* isolates were serotyped at the Health Canada Laboratory in Guelph, under the supervision of Dr Anne Muckle

Statistical analysis : Linear logistical regressions were performed to evaluate association between groups of animal from each categories (clinically affected herd or not) as dependent variable and the various status of bacteriological culture (or serology) for each tissues, using the Wald test to calculate P value of each association.

Animals : For experimental infection, forty-four early weaned (8 days) crossbred piglets from one herd without history of clinical salmonellosis were used. They were housed in isolation facilities of the Canadian Food Inspection Agency at St-

Hyacinthe, Québec. They were given corn-based pelleted feed supplemented with by milk products without any growth promoters and antibiotics products. Feed samples were cultured to detect *Salmonella* spp. by taking a composite sample of 100 g from many feed bags. Potable water was supplied *ad libitum*.

Bacteria : *S. Typhimurium* DT 104 # 4393 strain, originating from a clinical case of salmonellosis, was used for inoculation. This strain was resistant to chloramphenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim, streptomycin, amoxicillin, clavulanic acid, tetracycline, ampicillin, spectinomycin, sulfisoxazole and neomycin. It was found sensitive to enrofloxacin, gentamicin and ceftiofur. The frozen stock culture was subcultured in Nutrient Broth (NB) overnight at 35 °C. From this culture, 5 % was inoculated into fresh broth and incubated as described before for 18 hours (optical density at 600 nm, 0,6). The culture was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes at 4 °C. The supernatant was removed, and the pellet resuspended in a 1/10 volume of NB and kept on ice (Fedorka-Cray and al., 1995). Culture's optical density (2,5 at 600 nm) was measured to reach a final concentration of approximately 2.7×10^{10} colony-forming units per mL (cfu/mL). The bacterial concentration was determined by plating serial dilutions of initial inoculum onto blood agar (Hurd and al., 2001a; Hurd and al., 2001b).

Experimental procedures : Piglets were divided into two groups. The first group (n = 41) was exposed and the second one (n = 3) served as the uninoculated control. They were kept in isolated rooms with solid concrete floors, and unexposed controls were kept in a separate room. The piglets were monitored to detect *Salmonella* spp. on pre-exposure days 34, 27, 20, 6, and 0 (day of exposure) by culturing rectal and tonsil swabs and feces. Rectal temperatures were taken pre-exposure days 27, 20, 18, and 15. At 6 weeks of age animals were infected by squirting an inoculum of approximately $2,7 \times 10^{10}$ cfu/mL directly down the throat. They were challenged orally with a single dose of 5 mL of undiluted culture. Control animals received 5 mL of sterile culture medium. Feces were allowed to accumulate for 3 days after exposure. Floors were washed daily except for the first three days post-exposure.

After challenge, rectal temperatures and rectal swabs specimens were taken on days 1, 2, 3, 5, 7, 10, and 14. Clinical signs, including diarrhea, were monitored daily following challenge. Piglets were necropsied at random on post-exposure hours 12 and days 1, 2, 3, 5, 7, 10, and 14. One control was necropsied on post-exposure days 5, 7, and 10. Rectal swabs and samples from selected body organs were collected at necropsy for bacteriology. Material from tonsillar surfaces was obtained by vigorously rubbing the surfaces with sterile swab. Rectal specimens were obtained by insertion of a sterile swab 8 to 10 cm.

Necropsy procedures : All animals were euthanatized by intravenous injection of T-61[®] (Hoechst Canada inc, Regina, SK). Skin was washed by vigorously scrubbing the surfaces with a hibitane solution. Body cavities were carefully opened to prevent contamination of internal organs by intestinal content. Samples were taken aseptically, using sterile instruments, and bags. Samples of 2 to 5 g from the quadriceps muscle, superior inguinal lymph nodes, liver, spleen, lung, diaphragm, kidney, palatine tonsil, cervical lymph nodes, MLN, ileum, Peyer's Patches, cecum, and colon, and rectal swabs were collected for qualitative bacteriology. Tissues from the gut area were removed last to avoid cross-contamination between areas. Tissue samples were collected twice for bacteriologic analysis and PCR assay. PCR samples were stored at - 20 °C and processed later. Bacteriology was done as described previously (bacteriological culture).

Selective enrichment of tissues for Polymerase chain reaction (PCR) procedures : MLN and ileum from pigs experimentally infected with strain 4393 were investigated. Selective enrichment was done as described in the bacteriological culture section. Briefly, 1 gram of each tissue was aseptically cut with a scalpel and incubated with 9 mL of NB for 18 to 24 h at 35 °C. Then, 1 mL was inoculated in 9 mL of TBG and incubated for 18 to 24 h at 42 °C, followed by plating on BGS and XLTD4 (Difco) and incubated at 37 °C for 18 to 24 h. TBG were kept at room temperature for five days for a delayed plating on BGS and XLTD4. Up to five

suspect *Salmonella* colonies on each BGS and XLTD4 were inoculated on TSI and Urea and incubated at 37 °C for 18 to 24 h.

DNA isolation : Cell lysates for each isolate were prepared by suspending a loopful of bacterial grown on TSI in 1 mL of sterile distilled water. Cells were centrifuged (5000 g for 5 minutes) and the pellets were washed one more time in distilled water. The pellets were resuspended in lysis buffer containing 200 µL of chelex 5 % (Biorad, Mississauga, ON) and 20 µL of proteinase K 10 mg/mL (Sigma). This solution was vortexed for 10 to 15 seconds and incubated for 1 hour at 56 °C. All samples were then vortexed for 10 seconds and heated for 8 minutes at 98 °C. Lysates were vortexed for 10 seconds and chilled for 5 minutes on ice. Bacterial cell debris were removed by centrifuging at 8000 rpm for 3 minutes. Supernatants were kept at -20 °C until use.

PCR and electrophoresis : Three µL of the template DNA were added to a mixture (22,8 µL) containing 15 µL Dnase free water (Invitrogen, Burlington, ON), 2,5 µL 10 X PCR-reaction-buffer, 0,75 µL MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0,3 µL dNTPs [200 µM] (Roche, Laval, QC), 0,5 µL of each primer, (10 pmol/µL) (Invitrogen) and 0,25 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL) (Invitrogen). Primers of oligonucleotide sequences to detect genes coding for florfenicol resistance (*flo_{st}*), integron (*int*), invasion (*inv*), and virulence (*spvC*) were used as previously described (Khan and al., 2000). The amplification was performed in a UnoII DNA thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). The conditions for the PCR were an initial denaturation at 94 °C for 90 seconds followed by 30 cycles each of 45 seconds denaturation at 94 °C, 45 seconds annealing at 60 °C, and 90 seconds extension at 72 °C, and a final extension step of 3 minutes at 72 °C. The PCR products were cooled to 4 °C (Khan and al., 2000). Ten µL of each PCR product were electrophoresed on a 1,5 % agarose gel for 45 min (Sigma) at a constant voltage of 100 V in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, and 2 mM EDTA). Amplicons were stained with ethidium bromide (1 µg/mL) for 30 min, destained 10 min in distilled water, and visualized on a U.V. light induced fluorescence (Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) and photographed on a

polaroid film type 667 (Fisher). As negative control, all components of the reaction mixture except template DNA were used. The experimental strain # 4393 was used as positive control. Culture from TSI tubes with positive result were transferred on blood agar plate and incubated at 35 °C for 18 to 24 hours. Isolates were stored at – 20 °C in glycerol.

Results :

Salmonella was isolated from at least one tissue in 226 out of the 442 sampled animals. *Salmonella* was recovered in significantly higher rates in carcasses from animals belonging to herds that showed clinical signs of salmonellosis compared to regular herds (table I). Percentages of animals that were positive by serology or culture of mesenteric lymph nodes were also significantly higher in animals from clinically affected herds. No statistically significant difference was observed in the percentages of positive caecal content between both groups of animals. Overall, the percentage of extraintestinal tissues colonized by the bacteria was the same for animals from affected herds and animals from regular herds. Furthermore, the serotypes observed in both groups of animals were similar with the exception of *S. Anatum* that was observed more frequently in tissues of animals from affected herds (tables II and III).

Since we observed *S. Typhimurium* in a significant proportion of extraintestinal tissues in both groups of animals, we were then interested in the second part of the study to evaluate the persistence in various tissues of the bacteria following an experimental infection. We thus inoculated groups of animals using a *S. Typhimurium* strain in order to reproduce a mild infection clinically characterized by a yellowish diarrhea and fever like those mostly observed in the field. Following the inoculation, we were able to isolate the bacteria up to 7 days after in almost all samples from extraintestinal tissues (table IV). This persistence in extraintestinal tissues was accompanied by a yellowish diarrhea and an elevation of body temperature. The bacteria was recovered from the intestinal tissues, mesenteric lymph nodes and palatine tonsils for the entire experimentation.

In order to confirm the presence of the multiresistant strains in tissues of inoculated animals, we adapted a multiplex PCR assay (Khan and al., 2000) to detect the multiresistant experimental strain in selected tissues. Using this technique we were able to detect positive tissues in 67 tissues out of 82 where the bacteriological culture was positive (table V). The multiresistant strain was not found in negative-control piglets.

Discussion :

In order to achieve a better control of *Salmonella* in the pork products, many countries have put in place control programs that include measures to be taken at the herd level. In the past few years in Canada as well as in many countries, an increase in the number of clinical salmonellosis associated with *S* Typhimurium was noted in animals and humans (Hogue and al., 1997; Poppe and al., 2002; Ribot and al., 2002). Infections with this serotype are often associated with septicemia in animals. Since this serotype was regularly found in meat products and ultimately in humans, we were interested in this study to determine if the occurrence of clinical salmonellosis in swine would have an impact on the prevalence of the bacteria in tissues and carcasses.

The overall prevalence of *Salmonella* observed in feces is much higher than those recently observed in similar studies (Käsbohrer and al., 2000; Letellier and al., 1999; Swanenburg and al., 2001), including one study performed in part in this abattoir. During this study, arrangements were taken to ensure that herds that had clinical salmonellosis were processed in the slaughterhouse that agreed to participate. Although precautions were taken to put animals from these herds in particular pens that were washed and disinfected after each lot was slaughtered, the animals were otherwise processed as usual. Since many opportunities for cross contamination existed for animals from affected herd to contaminate animals from clinically healthy herd (transportation, unloading devices and corridors), the findings that feces from both groups of animals were similarly contaminated by *Salmonella* suggest that such cross contamination occurred and resulted in much higher contamination rates than

usual in apparently healthy animals. Furthermore, regular sampling performed at this packing plant before and after the completion of this study revealed individual carcass contamination rates comparable and even below to those of other packing plants (data not shown). Nevertheless, despite the higher carriage rates observed in animal entering at the packing plant, it was possible, after the slaughter process to obtain an overall final carcasses contamination rate (7,8 %) comparable to those obtained in recent studies in North America (Anonymous, 1996).

Independantly from the fact that feces from both groups of animals were equally positive for *Salmonella*, we observed that carcasses from animals from clinically affected herds had significantly higher positive isolation rate of *Salmonella* than carcasses from non affected herds, indicating that carcasses from these animals should be considered a higher risk when developing *Salmonella* control program. In addition, as expected, higher contamination rates of MLN by *Salmonella* and higher seropositivity were also observed in animals from affected lots. The fact that MLN from non-affected herds were less contaminated also suggest a very recent infection of naïve animals from these herds shortly before the slaughter process since it generally takes 6 to 8 hours before colonization of MLN after the initial infection. Results obtained for carcasses suggest that the bacterial load in feces might have been more important in animals from affected herds compared to those from non affected herds.

Various serotypes were recovered in both groups of animals. *S. Anatum* was found in much higher percentages than reported in another study (Baggesen et al., 1996). However, since this study was not designed to be representative of the current field situation in Quebec but to follow clinically affected herds, no conclusion can be drawn concerning a possible higher prevalence of this serotype in the field. Since the clinical infection associated to *S. Cholerasuis* is very rare in Canada, and since *S. Typhimurium* is the only other serotype that was linked in the past to septicemia in swine, it was surprising to observe that the presence of *S. Typhimurium* was not significantly associated with the presence of clinical signs in animals from affected herds. Nevertheless, *S. Typhimurium* was also regularly recovered from non affected animals. A total of 17 *S. Typhimurium* DT 104 isolates, a *S. Typhimurium* phage

type that is of highest concern for public health, were cultured in this study, while 13 out of these isolates were found in caecal content.

In the second part of this study, after an experimental infection, *S. Typhimurium* was found in extraintestinal tissues for as long as 7 days and in feces throughout the experiment. Since the persistence in tissues was associated with fever, it would be advisable to avoid the expedition at slaughter of febrile animals when clinical salmonellosis is observed in a herd at the end of the fattening period. Alternatively, animals from affected pens should be kept on farm for at least 7 days after the end of the clinical episode. In this study the PCR assay was positive for most tissues found positive at bacteriological culture despite the fact that PCR was done using frozen tissues. The use of this multiplex PCR allows the simultaneous detection of the bacterium at the genus level as well as the identification of multiresistant strains in feces and some tissues. This feature might be of interest in developing control programs focused on multiresistant *Salmonella* strains. However, the fact that few samples were found positive at the bacteriological culture without being found positive at PCR might indicate that these animals might have been infected by other strains before the infection despite the serial negative sampling that were performed prior to the infection.

Overall the results obtained in this study indicate that hog carcasses from herds affected by clinical salmonellosis are more likely to be contaminated by *Salmonella* and that following the infection the bacteria persists in tissues for at least 1 week, indicating that special precautions should be taken to avoid the slaughtering of these animals.

Acknowledgments :

This work was supported by the CRSNG and la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec. The authors thank Julie Légaré and Jannick Beurivage for technical assistance.

References :

- Alban, L. Stege, H. and Dahl, J.** 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish Salmonella surveillance-and-control program. *Prev. Vet. Med.* **53** : 133-146.
- Anonymous.** 1996. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Part II. Federal Register, Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **9 CFR Parts 304, 308, 310, 320, 327, 381, 416, 417** : 38805-38855.
- Baggesen, D. L., Sandvang, D. and Aarestrup, F. M.** 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.
- Baggesen, D. L., Wegener, H. C., Bager, F., Stege, H. et Christensen, J.** 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev. Vet. Med.* **26** : 201-213.
- Besser, T. E., Gay, C. C., Gay, J. M., Hancock, D. D., Rice, D., Pritchett, L. C. and Erickson, E. D.** 1997. Salmonellosis associated with *S. typhimurium* DT104 in the USA. *Vet. Rec.* **140** : 75.
- Boes, J., Dahl, J., Nielsen, B. and Krog, H. H.** 2001. Effect of separate transport, lairage, and slaughter on occurrence of *Salmonella* Typhimurium on slaughter carcasses. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 363-365.
- D'Aoust, J. Y.** 1994. *Salmonella* in the international food trade. *Int. J. Food Microbiol.* **24** : 11-31.
- Fedoraka-Cray, P. J., Collins Kelley, L., Stabel, T. J., Gray, J. T. and Laufer, J. A.** 1995. Alternate Routes of Invasion may Affect Pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in Swine. *Infect. Immun.* **63** : 2658-2664.
- Fedoraka-Cray, P. J., Whipp, S. C., Isaacson, R. E., Nord, N. and Lager, K.** 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Vet. Microbiol.* **41** : 333-344.

- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M. and Angulo, F.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in the United States. *N. Engl. J. Med.* **338** : 1333-1338.
- Hogue, A., Akkina, J., Angulo, F., Johnson, R., Petersen, K., Saini, P. and Schlosser, W.** 1997. Situation Assessment *Salmonella typhimurium* DT104. U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Washington, DC20250.
- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D. and Rostagno, M. H.** 2001a. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 382-384.
- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D. and Rostagno, M. H.** 2001b. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. *Am. J. Vet. Res.* **62** : 1194-1197.
- Käsbohrer, A., Protz, D., Helmuth, R., Nöckler, K., Blaha, T., Conraths, F. J. and Geue, L.** 2000. *Salmonella* in slaughter of German origin: An epidemiological study. *Eur. J. Epidemiol.* **16** : 141-146.
- Khan, A. A., Nawaz, M. S., Khan, S. A. and Cerniglia, C. E.** 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **182** : 355-360.
- Letellier, A., Messier, S. and Quessy, S.** 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Finishing Swine at Canadian Abattoirs. *J. Food Prot.* **62** : 22-25.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., Brenner, F. W. and Gheesling, L. L.** 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **152** : 907-909.
- Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J. and Prescott, J.** 1998. *Salmonella typhimurium* DT104 : A virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet. J.* **39** : 559-565.
- Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L. and Allen, K.** 2002. Diversity in Antimicrobial Resistance and Other Characteristics Among *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolates. *Microb. Drug Resist.* **8** : 107-122.

- Ribot, E. M., Wierzba, R. K., Angulo, F. J. and Barrett, T. J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 Isolated from Humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerg. Infect. Dis.* **8** : 387-391.
- Swanenburg, M., Urlings, H. A. P., Snijders, J. M. A., Keuzenkamp, D. A. and van Knapen, F.** 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **70** : 243-254.
- Wall, P. G., Morgan, D., Lamden, K., Griffen, M., Threlfall, E. J. and Rowe, B.** 1994. A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **4** : R130-135.
- Wilcock, B. P. and Schwartz, K. J.** 1992. Salmonellosis. In Leman AD, Straw B, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor D eds. *Diseases of Swine* 7th edn. Ames, Iowa : Iowa State University Press : 570-583.

Table 1. Prevalence of *Salmonella* spp. by serology and bacteriological culture of selected tissues and carcasses of pigs from herds with or without clinical signs.

Samples	Clinical signs		No clinical signs		Level of significance
	Prevalence (%)	Number of herds	Prevalence (%)	Number of herds	
Serum samples	33,94 ± 9,94 ^b	18	14,62 ± 9,0	25	ρ < 0,01
Feces	54,81 ± 11,16	19	54,83 ± 13,92	17	ρ = 0,99
MLN ^a	15,45 ± 8,16	18	15,44 ± 11,31	17	ρ < 0,01
Carcass swabs	10,83 ± 7,53	25	2,58 ± 2,77	23	ρ < 0,01
Liver	6,55 ± 8,26	7	9,39 ± 5,59	10	ρ = 0,66
Spleen	4,97 ± 5,66	7	2,96 ± 3,06	10	ρ = 0,63
Diaphragm	0	7	0	9	–

^aMLN = Mesenteric lymph nodes

^b95 % confidence interval.

Table II. Distribution at slaughter of serotypes and phage types isolated from different tissues of pigs from 25 herds without historic of salmonellosis.

	Liver	Spleen	MLN	Feces	Diaphragm	Carcass	Total
S. Anatum				3			3
S. Brandenburg						1	1
S. Derby	1	2	6	20		2	31
S. Heidelberg PT 9	1	1					2
S. Heidelberg PT 25				1			1
S. Heidelberg PT 29			1				1
S. Heidelberg PT 32				2			2
S. Heidelberg PT 39	1						1
S. Heidelberg PT 47	1						1
S. Ohio				2			2
S. Ohio var. 14 +				5			5
S. Senftenberg				5			5
S. Typhimurium PT 12	3		1			1	5
S. Typhimurium DT 104			1				1
S. Typhim. var. Copenhagen DT104				5			5
S. Typhimurium DT104a	1			1			2
S. Typhim. var. Copenhagen DT104a				2			2
S. Typhim. var. Copenhagen DT104b				1			1
S. Typhimurium PT 193			3	2			5
S. Typhimurium PT 208				1			1
I rough-O:b:l:w				2			2
I;4,12:-:-				1			1
S. Heidelberg total	3	1	1	3	0	0	8
S. Ohio total	0	0	0	7	0	0	7
S. Typhimurium DT104 total	1	0	1	9	0	0	11
S. Typhimurium total	4	0	5	12	0	1	22
Total	8	3	12	53	0	4	80

Table III. Distribution at slaughter of serotypes and phage types isolated from different tissues of pigs from 19 herds with historic of salmonellosis.

	Liver	Spleen	MLN	Feces	Diaphragm	Carcass	Total
S. Anatum			6	20		1	27
S. Brandenburg				6		6	12
S. Derby	2		9	25		1	37
S. Heidelberg PT 20			7	8			15
S. Infantis				5		1	6
S. Ohio	2	2	3	10			17
S. Ohio var. 14 +		1	4	16		3	24
S. Senftenberg				14		3	17
S. Senftenberg (1)				3			3
S. Typhimurium PT 12				1			1
S. Typhim. var. Copenhagen PT12			1				1
S. Typhimurium PT 36			2				2
S. Typhimurium DT 104			1				1
S. Typhim. var. Copenhagen DT104			1	2			3
S. Typhim. var. Copenhagen PT104a				2			2
S. Typhimurium DT 186				1			1
S. Typhimurium PT 193			1	7			8
S. Typhim. var. Copenhagen DT 193			1				1
S. Typhim. var. Copenhagen DT 194						1	1
S. Typhimurium PT 208				1			1
S. Typhim. var. Copenhagen DT 721				1			1
S. Typhim. var. Copenhagen U302			1	4		1	6
S. Typhimurium untypable	1	1	1	1		5	9
S. Typhim. var. Copenhagen untypable				1			1
l:4,12:i:-DT104a				2			2
l:4,5,12:r:-				1			1
l:rough-O:fg:-				1			1
l:rough-O:i:1,2			1	1			2
l:rough-O:b:l,w				1			1
l:rough-O:-:l,w			1				1
S. inconnu				2		1	3
S. Ohio total	2	3	7	26	0	3	41
S. Senftenberg total	0	0	0	17	0	3	20
S. Typhimurium DT104 total	0	0	2	4	0	0	6
S. Typhimurium total	1	1	9	21	0	7	39
Total	5	4	40	136	0	23	208

Table IV. Distribution of *S. Typhimurium* DT104 # 4393 in tissues of experimentally infected piglets following oral inoculation.

Samples	Post-exposure days													
	0,5	1	2	3	5	7	10	14						
Liver	4/5 ^c	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/6	0/5						
Spleen	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	2/5	1/6	0/5						
Lung	3/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	1/6	0/5						
Kidney	5/5	5/5	3/5	5/5	3/5	4/5	0/6	0/5						
Diaphragm ^a	4/5	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/6	0/5						
Cerv. L. N. ^b	4/5	5/5	3/5	5/5	5/5	4/5	0/6	0/5						
Tonsils	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
Inguin. L. N. ^b	3/5	4/5	4/5	5/5	5/5	3/5	1/6	0/5						
Quadriceps	2/5	5/5	4/5	5/5	3/5	3/5	0/6	0/5						
MLN ^b	5/5	5/5	4/4	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
Ileum	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
P. Patches ^b	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
Caecum	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
Colon	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
Feces	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	6/6	5/5						
T. (°C) ± SEM	39,8±0,3	40,4 ± 0,1	40,6 ± 0,1	40,1 ± 0,1	40,0 ± 0,1	38,0 ± 0,4	39,9 ± 0,3	39,4 ± 0,1						
Clinical signs at necropsy	pleuritis, ileitis, peritonitis	No data	ileitis, diarrhea, ileocolitis	ileitis, ileocolitis	mild ileitis, ileocolitis	pneumonia ileitis, ileocolitis	Enlarged MLN, enteritis	mild ileitis						

^a Diaphragms were collected with a piece of muscle.

^b Cervical L. N. = Cerv. lymph nodes; Inguin. L. N. = Inguin. lymph nodes; MLN = Mesenteric lymph nodes; P. Patches = Peyer's Patches;

T. (°C) + SEM = mean rectal temperature + standard error of the mean for all piglets infected at this period.

^c Number of positive piglets / total number of piglets

Table V. Bacteriology and multiplex PCR on selected tissues following experimental infection by *S. Typhimurium* DT104 in pigs.

Post-exposure day	Tissues	Test	
		Bacteriology	PCR
12 hours	MLN	5/5 ^a	1/5 ^b
	Ileum	5/5	3/5
24hours	MLN	5/5	4/5
	Ileum	5/5	5/5
2 days	MLN	4/4	4/5
	Ileum	5/5	5/5
3 days	MLN	5/5	5/5
	Ileum	5/5	5/5
5 days	MLN	5/5	5/5
	Ileum	5/5	5/5
7 days	MLN	5/5	5/5
	Ileum	5/5	4/5
10 days	MLN	6/6	5/6
	Ileum	6/6	2/6
14 days	MLN	5/5	5/5
	Ileum	5/5	4/5

^aNumber of positive piglets / number of sampled piglets.

^bNumber of positive piglets to the four sequences / number of sampled piglets.

Chapitre 4.

Discussion

Le nombre de cas de salmonellose causant des signes cliniques chez le porc augmente à chaque année (Schwartz, 1999). Une proportion des cas rapportés provient d'une infection à *S. Typhimurium* DT104, type phagique qui semble être parmi les plus virulents chez ce sérotype. Au Canada, une hausse importante des cas de salmonellose à *S. Typhimurium* DT104 ayant une résistance multiple aux antibiotiques chez le porc et l'humain a été notée (Poppe et al., 2002). Présentement, les connaissances concernant la distribution et la survie de *S. Typhimurium* DT104 dans les différents tissus chez le porc sont limitées. Cette situation est préoccupante dans le cas de porcs provenant d'élevages atteints de salmonellose, car les critères de condamnation de ces carcasses ne tiennent pas compte des capacités des différents types phagiques à survivre dans les tissus. Ce projet a été divisé en deux sous-objectifs. Tout d'abord, la distribution de *Salmonella* dans les organes et le statut final des carcasses chez les porcs provenant d'élevages avec et sans signes cliniques pour la salmonellose ont été observés. Par la suite, la distribution et la persistance de *S. Typhimurium* DT104 dans les différents tissus suite à une infection expérimentale ont été étudiées.

4.1 : Distribution de *Salmonella* spp. chez le porc à l'abattoir

4.1.1 : Distribution générale de *Salmonella* spp. dans les organes et sur les carcasses

Tous les échantillons prélevés dans cette étude provenaient d'animaux ayant été fournis par une seule pyramide de production. L'apparition de signes cliniques a été surveillée par un vétérinaire et ces lots ont tous été abattus dans le même abattoir qui connaissait le statut de ces élevages et qui les a séparés pour que les lots qui ont eu un diagnostic positif pour la salmonellose soient abattus en fin de journée. En général, les résultats concernant la prévalence de la salmonelle chez les porcs à l'abattage étaient plus élevés que ceux obtenus lors d'études antérieures. En effet, 223 animaux sur un total de 442, soit 50,5 %, ont eu au moins les ganglions lymphatiques mésentériques, les fèces ou la surface de la carcasse positifs pour la salmonelle (données non montrées). En Allemagne, une étude a rapporté que 10,3 % des 11 942 porcs testés avaient les fèces, les ganglions lymphatiques ou la surface de

la carcasse positifs pour cette bactérie (Käsbohrer et al., 2000). De plus, nous avons isolé *Salmonella* spp. dans 51,3 % des fèces, contrairement à des études antérieures réalisées au Canada (5,2 %), aux Pays-Bas (25,6 %) et en Allemagne (3,7 %) (Käsbohrer et al., 2000; Letellier et al., 1999; Swanenburg et al., 2001b). Par ailleurs, environ 15 % des ganglions lymphatiques mésentériques étaient positifs (données non montrées), contrairement à 9 % aux Pays-Bas et à 3,3 % en Allemagne (Käsbohrer et al., 2000; Swanenburg et al., 2001b).

La proportion des échantillons positifs à la sérologie était aussi plus élevée, atteignant 26,2 %. En comparaison, 18 % des porcs étaient séropositifs aux Pays-Bas (Swanenburg et al., 2001b). Environ 7,8 % des carcasses testées étaient positives pour la salmonelle (données non montrées). Seulement 1,4 % des carcasses aux Pays-Bas et 4,7 % des carcasses en Allemagne étaient positives (Käsbohrer et al., 2000; Swanenburg et al., 2001b). Bien que nos résultats semblent alarmants, ceux-ci ne représentent qu'une portion de la réalité québécoise et canadienne. La procédure pour l'éviscération diffère selon les abattoirs. Cette étape est réalisée manuellement dans certains abattoirs alors qu'elle est en partie mécanisée dans d'autres. Cette divergence dans les méthodes d'éviscération peut induire certaines variations quant à l'hygiène sur la chaîne d'abattage (Swanenburg et al., 2001b). Dans notre étude, tous les porcs testés ont été abattus dans le même abattoir, où le processus d'éviscération est fait manuellement. De plus, le fait de regrouper les lots d'animaux provenant de troupeaux ayant eu des signes cliniques de salmonellose lors de certaines journées d'abattage peut expliquer la forte prévalence observée dans les fèces. Toutefois, le pourcentage de contamination du produit final (7,8 %) s'est révélé relativement bas si l'on tient compte de la proportion des lots avec et sans signes cliniques dans les élevages.

4.1.2 : Distribution de *Salmonella* spp. selon le statut du troupeau à la ferme

Cette étude est la première à regrouper les lots selon la présence ou l'absence de signes cliniques. Certaines études ont classé les lots selon la proportion de séroconversion des porcs. Dans ce système, des échantillons de jus de viande sont testés par la technique ELISA. Par exemple, en Irlande et au Danemark, les lots dont

moins de 10 % des échantillons sont positifs sont classés dans la catégorie 1. La catégorie 2 inclut les lots pour lesquels entre 10 et 50 % des échantillons sont positifs. Finalement, les lots dont plus de 50 % des échantillons sont positifs sont contenus dans la catégorie 3 (Boes et al., 2001; Quirke et al., 2001). Toutefois, certaines études considèrent que les lots à faible risque sont ceux ayant moins de 20 % des individus séropositifs. Les élevages à haut risque sont ceux qui ont plus de 20 % des animaux séropositifs (Quirke et al., 2001). Les signes cliniques apparaissent généralement quelques heures après l'entrée de *Salmonella* et ceux-ci disparaissent environ 14 jours post-infection (Fedorka-Cray et al., 1994; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989).

Lors d'une infection à *Salmonella*, la séroconversion débute généralement 7 jours post-infection (Nielsen et al., 1995; Wood et al., 1989), mais elle n'est pas nécessairement précédée par la présence de signes cliniques (Nielsen et al., 1995). Certains porcs présents dans un environnement contaminé demeureront séronégatifs (Nielsen et al., 1995). Dans notre étude, certains lots séropositifs ont été classés dans la catégorie « sans signe clinique », alors que des lots séronégatifs ont été placés dans le groupe « avec signes cliniques ». Rappelons que les critères requis pour qu'un lot soit classé dans le groupe « avec signes cliniques » étaient : le diagnostic d'un vétérinaire expérimenté basé sur les signes cliniques de salmonellose, l'isolement de la salmonelle dans les organes d'animaux infectés ou l'isolement de la salmonelle dans les fèces des porcs en absence d'autres pathogènes entériques. Les lots pour lesquels aucun de ces critères étaient observés étaient regroupés dans la catégorie « sans signe clinique ». Chez certains porcs, l'apparition des signes cliniques de salmonellose survient suite à un affaiblissement causé lors d'une infection par une autre espèce bactérienne. Toutefois, le classement des élevages selon la présence ou l'absence de signes assure une plus grande vigilance quant à la possibilité d'un contact des porcs avec un isolat virulent. Dans notre étude, nous avons isolé la salmonelle dans 54,8 % des échantillons de matières fécales provenant du caecum des porcs sans signe clinique et dans 54,8 % des porcs avec signes cliniques (tableau I). En se basant sur le taux de séroconversion pour classer les lots, environ 10 % des porcs provenant des lots à faible risque et 19 % des porcs à haut risque sont positifs

pour la salmonelle dans les matières fécales prélevées dans le caecum (Quirke et al., 2001). Dans notre étude, la prévalence dans les fèces pour les lots avec et sans signe clinique n'était pas statistiquement significative, situation probablement causée par une contamination croisée lors du transport et de l'attente avant l'abattage.

4.1.2.1 : Prévalence de *Salmonella* spp. sur les carcasses

La comparaison de différentes études concernant les prévalences au niveau des carcasses est souvent ardue pour diverses raisons. Pour commencer, l'aire totale échantillonnée de même que les régions sur les carcasses divergeaient selon les études (Boes et al., 2001; Quirke et al., 2001; Swanenburg et al., 2001b). De plus, le délai entre le moment où la carcasse était refroidie et dirigée vers les réfrigérateurs et le moment où elle était testée variait beaucoup, allant de quelques minutes à environ 24 heures (Boes et al., 2001; Quirke et al., 2001; Swanenburg et al., 2001b). Le taux de survie des salmonelles sur les carcasses refroidies diminue beaucoup lorsque celles-ci ont séjourné 18 heures ou plus dans les chambres froides (Quirke et al., 2001). Par ailleurs, des études antérieures ont démontré qu'une contamination croisée existe pendant l'abattage (Anonymous, 1996; Boes et al., 2001; Swanenburg et al., 2001a). Les porcs excréant la salmonelle seront plus susceptibles d'être contaminés sur la surface extérieure de leur carcasse. Dans les lots avec signes cliniques, certains porcs peuvent excréter la salmonelle dans leurs fèces alors que d'autres peuvent devenir des porteurs suite à une infection. Ces deux types de porcs pourront excréter rapidement la salmonelle lors de situations stressantes. En conséquence, ces animaux seront en contact avec une plus grande concentration de salmonelle en comparaison avec les lots sans signe clinique, d'où une plus grande possibilité de contamination des carcasses. Lors de notre échantillonnage, 2,6 % des carcasses de porcs issus de lots sans signe clinique et 10,8 % des carcasses de porcs provenant de lots avec signes cliniques étaient positifs pour la salmonelle (tableau I).

4.1.2.2 : Prévalence de la séroconversion contre *Salmonella* spp.

Lors du transport et de l'attente avant l'abattage, le contact de porcs sains avec des matières fécales contaminées ou avec des animaux excréant la salmonelle n'aura aucune incidence sur la séroconversion de ces porcs sains et donc sur la détection des anticorps spécifiques dirigés contre la salmonelle étant donné le délai minimum de 7 jours nécessaires pour la production d'anticorps (Nielsen et al., 1995; Wood et al., 1989). Dans notre étude, la prévalence de la séroconversion, c'est-à-dire la « séropositivité », était significativement plus élevée à $P < 0,01$ dans les lots avec signes cliniques en comparaison avec les lots sans signe clinique (tableau I). Rappelons que dans notre étude, la prévalence totale pour la séroconversion a atteint 26,2 %. Quelques études ont évalué la séroprévalence à l'abattoir. Par exemple, l'étude réalisée par Swanenburg et collaborateurs aux Pays-Bas a indiqué que 18 % des porcs testés suite à deux échantillonnages dans deux abattoirs sont séropositifs (Swanenburg et al., 2001b). Toutefois, dans certaines fermes du Danemark où les porcs sont restés dans la même pièce jusqu'au transport vers l'abattoir, le taux de séroconversion pouvait atteindre 53 % (Dahl et al., 1997). Dans cette même étude, des porcelets séronégatifs provenant de lots contaminés à la salmonelle ont été transférés dans des parcs nettoyés et désinfectés. Ces animaux sont demeurés séronégatifs jusqu'à l'abattoir (Dahl et al., 1997). Le pourcentage élevé de séroconversion pourrait être causé par une source constante de réinfection dans les fermes, par exemple par une mauvaise désinfection des parcs ou par la présence d'animaux infectés qui excrètent la bactérie dans leur environnement.

4.1.2.3 : Prévalences de *Salmonella* spp. dans les fèces et les ganglions lymphatiques mésentériques

Bien que la prévalence de *Salmonella* spp. dans les fèces soit élevée, il n'y a pas de différence significative entre les porcs provenant de lots avec et sans signes cliniques pour cette catégorie d'échantillons (tableau I). Par contre, la prévalence pour les ganglions lymphatiques mésentériques était significativement plus élevée dans les lots avec signes cliniques en comparaison avec les lots sans signe clinique.

Plusieurs éléments ont pu influencer ces observations. Tout d'abord, tous les porcs provenaient d'une même pyramide de production. Les propriétaires de cette compagnie possèdent des camions pour le transport de leurs animaux. Bien que les porcs ne soient pas tous abattus dans le même abattoir, la plupart d'entre eux sont transportés dans les mêmes camions. Certains lots devront voyager pendant 3 à 5 heures pour se rendre à l'abattoir. En outre, les camions sont généralement désinfectés à la fin de la journée. La contamination des porcs lors du transport est donc possible, car les camions ne sont pas nécessairement nettoyés entre chaque lot. De plus, à chaque voyage, un camion peut transporter plusieurs lots provenant de différents éleveurs en même temps. Les porcs ayant déjà été infectés par la salmonelle à la ferme peuvent facilement contaminer les animaux de lots différents. Lorsque les porcs arrivent à l'abattoir, ils doivent séjourner parfois pendant plusieurs heures dans des parcs avant d'être abattus. À l'instar des conditions pour le transport, les animaux de différents éleveurs doivent demeurer dans le même parc avant d'être abattus. Lors d'une infection expérimentale, une dose de 5×10^9 ufc/mL d'un isolat de la salmonelle inoculé dans les voies respiratoires de porcs a été retrouvé dans les ganglions lymphatiques iléo-coliques environ 6 heures post-infection. L'infection de ces tissus nécessiterait donc un contact direct prolongé des porcs avec des matières fécales contaminées dès le départ des élevages en direction de l'abattoir (Fedorka-Cray et al., 1995).

Le stress du transport et de l'attente dans des endroits inconnus, le contact entre les porcs provenant d'éleveurs différents et la présence d'isolats de *Salmonella* dans les camions et dans les parcs de l'abattoir pourraient être des sources d'infection pour les porcs sains. En effet, lors d'une infection expérimentale avec *S. Typhimurium* DT104, le transport des porcs pendant 8 heures a provoqué une hausse importante de l'excrétion de la bactérie chez des animaux qui étaient devenus des porteurs suite à l'infection ainsi qu'une hausse du nombre de cas de diarrhée (Marg et al., 2001). Chez des porcs séronégatifs, l'attente avant l'abattage semble être la principale cause de l'infection des tissus comme le foie, les ganglions lymphatiques mésentériques, les amygdales et les matières fécales (Swanenburg et al., 2001a). Par contre, l'infection de ces tissus chez des porcs séropositifs survenait principalement à

la ferme (Swanenburg et al., 2001a). D'autre part, étant donné que plusieurs espèces bactériennes peuvent induire des symptômes similaires à ceux décrits pour la salmonellose, le diagnostic d'une infection à *Salmonella* ne peut être basé uniquement sur la présence des signes cliniques (Schwartz, 1999). Rappelons que ces signes incluent une hyperthermie souvent supérieure à 40 °C, une diminution significative de l'appétit, une déshydratation, un abattement, une diarrhée très liquide et jaunâtre avec la présence occasionnelle de sang. Dans certains cas, les porcs mourront des suites de l'infection (Schwartz, 1999; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). D'un autre côté, plusieurs porcs atteints de salmonellose ne présenteront pas de signes cliniques, c'est-à-dire qu'ils seront des porteurs sains (Swanenburg et al., 2001b). Une vigilance constante de l'état de santé en général ainsi qu'une analyse régulière du contenu des matières fécales des lots sont donc essentielles pour s'assurer que *Salmonella* n'est pas présent dans les élevages.

Le contact entre des animaux sains et des fèces contaminées pendant une courte période peut entraîner une infection de ces animaux, selon la susceptibilité de l'hôte pour la salmonelle. En effet, la présence pendant 30 minutes de porcs sans salmonelle dans un environnement contenant environ $1,4 \times 10^5$ ufc par gramme de matières fécales est suffisante pour induire une infection. Les conséquences seront les mêmes si les animaux entrent en contact pendant 2 heures avec des fèces contaminées ayant une concentration en salmonelles de $4,5 \times 10^2$ ufc par gramme (Hurd et al., 2001a; Hurd et al., 2001b). De plus, une infection rapide lors du transport et de l'attente avant l'abattage semble être la cause principale de la contamination de certains tissus (Hurd et al., 2002). Par exemple, chez des porcs présentant des proportions semblables de fèces contaminées par *Salmonella* spp. à la ferme, le taux d'infection des matières fécales, du caecum et des ganglions lymphatiques est supérieur quand les animaux sont abattus à l'abattoir en comparaison avec ceux abattus à la ferme (Hurd et al., 2002).

4.1.2.4 : Prévalence de *Salmonella* spp. dans les tissus extra-intestinaux

Peu d'études ont examiné la proportion de tissus extra-intestinaux infectés par *Salmonella* spp. à l'abattoir. Toutefois, aux Pays-Bas, 9,3 % des foies testés étaient

positifs pour la salmonelle (Swanenburg et al., 2001b). En comparaison, 8,4 % des foies récoltés lors de notre échantillonnage étaient positifs. La proportion était plus importante chez les lots sans signe clinique, atteignant 9,4 % (tableau I). Chez les lots avec signes cliniques, la salmonelle a été isolée dans seulement 6,6 % des foies testés. Bien que la souche *S. Typhimurium* ait été retrouvée dans le foie et la rate 3 heures post-infection, elle n'a pas persisté au-delà de 4 jours chez des porcs inoculés de façon expérimentale (Fedorka-Cray et al., 1995; Wood et al., 1989). Ce phénomène laisse supposer que la salmonelle ne serait présente dans ces tissus que lors des premiers stades de l'infection. Contrairement aux ganglions et aux tissus intestinaux, lors d'une infection expérimentale avec *S. Typhimurium* DT104, le transport des porcs malades n'a pas provoqué une réinfection du foie, de la rate et des muscles. Toutefois, la souche expérimentale a été retrouvée dans moins de 10 % des porcs infectés par ce type phagique (Marg et al., 2001).

4.1.3 : Distribution à l'abattoir des sérovars et des types phagiques chez les porcs provenant d'élevages avec et sans signes cliniques

Lors de l'analyse des isolats recueillis, plusieurs sérotypes différents ont été observés chez les lots avec et sans signes cliniques. En général, *S. Derby* (24 %) et *S. Typhimurium* (21 %) ont été les sérotypes les plus souvent identifiés (tableaux II et III). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures réalisées au Japon, aux Pays-Bas, au Danemark, aux États-Unis et en Irlande, bien que les prévalences pour ces deux sérotypes aient varié selon les pays (Asai et al., 2002; Boes et al., 2001; Dahl et al., 1997; Davies et al., 1998; Quirke et al., 2001; Swanenburg et al., 2001b). Par contre, *S. Brandenburg* (40,9 %) et *S. Infantis* (16,4 %) étaient les deux sérotypes les plus souvent rencontrés au Canada (Letellier et al., 1999) et les résultats étaient semblables pour le Québec (Letellier et al., 1999). Comme notre échantillonnage a eu lieu dans un seul abattoir, contrairement à quatre abattoirs dans l'étude de Letellier et collaborateurs, la distribution des différents sérotypes ne représente pas nécessairement la situation retrouvée dans le reste de la province et du pays.

Dans les lots sans signe clinique, les principaux sérotypes sont *S. Derby* (38 %) suivi de *S. Typhimurium* (27 %). *S. Typhimurium* DT104 (14 %) a été identifié le

plus souvent dans l'ensemble des autres types phagiques retrouvés de *S. Typhimurium* (tableau II). Par contre, dans les lots avec signes cliniques, *S. Ohio* (20 %) et *S. Typhimurium* (19 %) ont été les plus fréquemment isolés. La différence dans la distribution de *S. Typhimurium* n'était pas significative entre les lots avec et sans signes cliniques. *S. Typhimurium* DT104 (3 %) était beaucoup moins présent dans les lots avec signes cliniques (tableau III). Au Canada, 17,3 % des *S. Typhimurium* isolés chez le porc appartenaient au type phagique DT104 (Poppe et al., 2002). Par ailleurs, dans les lots avec signes cliniques, 13 % des isolats positifs étaient *S. Anatum*, contrairement à 5 % dans les lots sans signe clinique (tableaux II et III). Il ne semble pas y avoir de cas de salmonellose clinique rapportés dans la littérature pour *S. Ohio* et *S. Anatum*. D'autres études seront nécessaires pour vérifier si la prévalence de ces deux sérotypes reste faible ou si elle augmente dans les lots ayant des signes cliniques.

4.2 : Distribution et persistance de *S. Typhimurium* DT104 chez le porc suite à une infection expérimentale

Les connaissances étant limitées quant à la dissémination et à la persistance de ce type phagique chez le porc, nous avons effectué une infection expérimentale pour étudier ces paramètres. Nous avons utilisé une souche ayant une résistance multiple qui a le profil R-type, c'est-à-dire une résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, au sulfamide et à la tétracycline (ACSSuT) et qui provient d'un porc décédé d'une septicémie. Ce patron de résistance est commun chez le DT104 dans de nombreux pays dont le Canada, les États-Unis, le Danemark et le Royaume-Uni (Baggesen et al., 2000; Gebreyes et Altier, 2002; Poppe et al., 2002; Threlfall et al., 1994). Nous avons tenté de reproduire les signes cliniques observés dans les élevages. Chaque porcelet âgé d'environ 42 jours a été infecté par voie orale avec une dose de $2,7 \times 10^{10}$ ufc/mL. Des études antérieures ont démontré que malgré l'ingestion d'une dose élevée de *S. Typhimurium*, atteignant $2,2 \times 10^9$ ufc/mL, la concentration de salmonelles récoltées par la suite dans l'environnement n'est que d'environ $2,2 \times 10^4$ ufc/mL (Hurd et al., 2001a; Hurd et al., 2001b). Étant donné que

le contact avec ces matières fécales contaminées pendant 2 heures est suffisant pour infecter des porcs (Hurd et al., 2001a; Hurd et al., 2001b), cette dose a été retenue.

Suite à l'infection expérimentale, les signes cliniques étaient modérés et aucun animal n'est mort après l'inoculation. Peu après l'ingestion de *S. Typhimurium* DT104, la plupart des porcelets ont fait de la fièvre, généralement inférieure à 41 °C, ont été affaiblis et ont eu une diarrhée transitoire. Les animaux sont revenus à un état normal environ 7 jours après le début de l'infection (tableau IV). La faible intensité des signes cliniques était étonnante, étant donné qu'une étude expérimentale antérieure avait rapporté des signes cliniques sévères d'affaiblissement, de diarrhée, d'anorexie et de vomissement (Marg et al., 2001). Toutefois, cette situation est plus susceptible de refléter les infections qui surviennent dans les fermes. La plupart des tissus testés se sont révélés positifs dès 12 heures et ce, jusqu'à 7 jours post-infection. Au-delà de ce délai, les tissus destinés à la consommation humaine sont graduellement redevenus négatifs et, à l'exception des tissus intestinaux, des ganglions lymphatiques mésentériques et des amygdales, ils étaient tous négatifs 14 jours post-infection (tableau IV). Ces observations sont partiellement en accord avec une étude antérieure dans laquelle les porcs infectés avec *S. Typhimurium* DT104 ont été abattus 21 jours post-infection. À la nécropsie, une bonne proportion des tissus intestinaux, des ganglions mésentériques, des amygdales et quelques muscles étaient positifs pour ce type phagique (Marg et al., 2001).

Lors d'infections à *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* DT104 réalisées dans d'autres études, la bactérie n'était pas détectée dans le foie et la rate 7 jours après l'infection, mais elle était présente dans la plupart des tissus intestinaux, des matières fécales, des ganglions mésentériques et des amygdales jusqu'à 28 semaines post-infection (Marg et al., 2001; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). Toutefois, dans l'étude de Wood et collaborateurs, il n'y a eu que 6 porcs abattus pour l'ensemble des 4 premières nécropsies (Wood et al., 1989). Nos résultats sont en accord avec les infections expérimentales impliquant *S. Typhimurium* et *S. Typhimurium* DT104 (Marg et al., 2001; Wood et Rose, 1992; Wood et al., 1989). En effet, *S. Typhimurium* DT104 a été présent dans les matières fécales de 12 heures à 14 jours post-infection (tableau IV).

Même si *S. Typhimurium* DT104 n'est plus présent dans certains tissus, une réinfection est fréquente lors de situations stressantes (Marg et al., 2001). Le transport et l'attente avant l'abattage semblent être suffisants pour causer une réinfection de certains tissus par la bactérie (Marg et al., 2001). Présentement, il n'y a aucun temps de retrait pour les animaux atteints de salmonellose. Lorsque la présence de la salmonelle est confirmée rapidement, l'arrêt des signes cliniques pourrait être un indicateur de la disparition de la bactérie dans les principaux tissus destinés à la consommation humaine. Pour *S. Typhimurium* DT104, le délai devrait être au minimum 7 jours après le début présumé de l'infection. Par ailleurs, l'isolement des lots ayant eu des signes cliniques pour la salmonellose est nécessaire puisque le contact avec des matières fécales contaminées peut produire une infection dans la plupart des tissus dès 12 heures post-infection.

4.3 : Adaptation d'un PCR multiplex pour la détection de *S. Typhimurium* DT104 dans les tissus

La détection de la salmonelle par les techniques courantes de bactériologie prend entre 3 et 7 jours (Gray et Fedorka-Cray, 1996). Cependant, ce délai est trop long pour traiter les porcs malades lorsque ceux-ci sont infectés peu de temps avant l'abattage. L'épreuve PCR offre plusieurs avantages intéressants, dont une plus grande sensibilité et un traitement des échantillons plus rapide en comparaison avec la bactériologie. Nous avons donc adapté un PCR multiplex pour rechercher la présence de *S. Typhimurium* DT104 dans les tissus des porcs qui ont été infectés expérimentalement. Nous voulions également mettre au point une épreuve afin de pouvoir intervenir plus rapidement à l'abattoir. Nous avons testé tous les iléons et les ganglions lymphatiques mésentériques des porcs. Toutefois, les résultats du PCR ne concordent pas entièrement avec ceux de la bactériologie (tableau V). Lors de l'infection expérimentale, les tissus étudiés ont été séparés en deux : la première portion a été analysée immédiatement par bactériologie alors que le second fragment des tissus a été congelé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant quelques mois avant d'être testés par PCR. Le taux de survie de la salmonelle diminue rapidement lorsque les tissus à analyser

sont conservés à des températures sous le point de congélation (Escartín et al., 2000). De plus, certains sérovars semblent plus susceptibles au stress causé par le froid (Escartín et al., 2000). Étant donné que la sensibilité du test dans un échantillon sans enrichissement est réduite (Schrank et al., 2001), le séjour des tissus à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ avant le début de l'analyse par PCR pourrait donc être suffisant pour empêcher la détection de la souche.

Des essais par PCR ont été effectués sur les autres tissus (foie, rate, rein, poumon, ganglion cervical, amygdales, diaphragme, ganglion inguinal supérieur, quadriceps, Plaques de Peyer, caecum, colon) de certains porcs infectés de façon expérimentale. Les tests sur ces tissus n'ont pas été poursuivis puisque les résultats par PCR étaient, pour la plupart, beaucoup moins sensibles que ceux obtenus par bactériologie. Tout d'abord, tous ces tissus, à l'exception des amygdales, des plaques de Peyer, des caeca et des colons, étaient parfois négatifs pour la salmonelle lorsqu'analysés par bactériologie (tableau IV). Par ailleurs, plusieurs substances inhibitrices, dont les sels biliaires et la bilirubine, un composé présent dans l'hémoglobine, sont présentes dans certains tissus, plus particulièrement ceux qui contiennent beaucoup de sang ou de matières fécales concentrées (Stone et al., 1994; Widjoatmodjo et al., 1992). Ces éléments nuisent au bon fonctionnement de l'épreuve par PCR en diminuant la sensibilité du test. Des essais ont aussi été tentés sur des tissus sans enrichissement. Toutefois, les résultats étaient beaucoup moins sensibles que les tests effectués avec une étape d'enrichissement. Ce phénomène, probablement causé par la présence de substances inhibitrices, est en accord avec des études antérieures (Schrank et al., 2001; Stone et al., 1994). Les analyses par bactériologie détectent environ 1×10^2 ufc par gramme de fèces (Cohen et al., 1994). Bien que les porcelets aient été testés pour la présence de la salmonelle à plusieurs reprises avant l'infection expérimentale et que ceux-ci soient demeurés négatifs, ils auraient pu être des porteurs latents. Le stress causé lors de l'inoculation de *S. Typhimurium* DT104 aurait pu favoriser l'excrétion des autres sérotypes et types phagiques. Pour notre infection expérimentale, les analyses par bactériologie ont identifié la salmonelle au niveau du genre uniquement. On ne peut donc éliminer la possibilité des tissus qui ont été trouvés positifs en bactériologie et négatifs par PCR

puissent avoir été infectés par un isolat autre que la souche expérimentale, malgré toutes les précautions prises pour obtenir des animaux négatifs.

Chapitre 5.

Conclusion

Cette étude a permis d'accroître les connaissances au sujet des caractéristiques de l'infection à *Salmonella* spp. et à *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium DT104 chez le porc. Plus précisément, à partir des résultats de cette étude, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

- La salmonelle est présente dans des proportions semblables dans les lots avec et sans signes cliniques pour le foie, la rate et les fèces.
- *S. Typhimurium* est le deuxième sérotype le plus fréquemment isolé dans les lots avec et sans signes cliniques.
- Les carcasses d'animaux provenant d'élevages atteints de salmonellose clinique ont plus de chances d'être contaminés par *Salmonella*.
- Lors d'une infection expérimentale chez le porc, *S. Typhimurium* DT104 est présent dans la plupart des tissus dès 12 heures post-infection et ce jusqu'à 7 jours après le début de l'infection.
- *S. Typhimurium* DT104 demeure présent dans les tissus intestinaux, les ganglions lymphatiques mésentériques et les amygdales pour une période d'au moins 14 jours post-infection.
- L'épreuve PCR adaptée dans cette étude est un test fiable pour la détection de *S. Typhimurium* DT104 ayant une résistance multiple aux antibiotiques dans les iléons et les ganglions lymphatiques mésentériques.

Des études complémentaires, notamment sur les inhibiteurs présents dans certains tissus, seront nécessaires et utiles afin de détecter par PCR des sérotypes et des types phagiques virulents comme *S. Typhimurium* DT104 directement dans certains tissus à risque pour les consommateurs. Par ailleurs, des études sur les divers facteurs de virulence des salmonelles ainsi que sur les facteurs génétiques de l'hôte seraient nécessaires afin de mieux comprendre les infections à *S. Typhimurium* DT104.

Bibliographie

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. et Pober, J. S.** 1997. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders company. Philadelphia. 4-5, 11, 26, 59-60, 109-111, 250-252, 258-265, 268-269, 342-350.
- Alban, L. Stege, H. et Dahl, J.** 2002. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish Salmonella surveillance-and-control program. *Prev. Vet. Med.* **53** : 133-146.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J. D.** 1994. Biologie moléculaire de la cellule. 3^e ed., Flammarion. Paris. pp. 291-306.
- Anderson, E. S. et Williams, R. E. O.** 1956. Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. Clin. Pathol.* **9** : 94-114.
- Anonymous.** 1996. Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Part II. Federal Register, Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. **9 CFR Parts 304, 308, 310, 320, 327, 381, 416, 417** : 38805-38855.
- Asai, T., Otagiri, Y., Osumi, T., Namimatsu, T., Hirai, H. et Sato, S.** 2002. Isolation of *Salmonella* from Diarrheic Feces of Pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **64** : 159-160.
- Baggesen, D. L., Sandvang, D. et Aarestrup, F. M.** 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.
- Baggesen, D. L., Wegener, H. C., Bager, F., Stege, H. et Christensen, J.** 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev. Vet. Med.* **26** : 201-213.
- Bauerfeind, R., Barth, S., Weiß, R. et Baljer, G.** 2001. Sequence polymorphism of the *Salmonella* plasmid virulence factor D (SpvD) in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 404-408.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S. et Heffron, F.** 1996a. The *pef* Fimbrial Operon of *Salmonella typhimurium*

- Mediates Adhesion to Murine Small Intestine and Is Necessary for Fluid Accumulation in the Infant Mouse. *Infect. Immun.* **64** : 61-68.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M. et Heffron, F.** 1996b. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 279-283.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A. et Adams, L. G.** 1998. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66** : 4579-4587.
- Bearson, B. L., Wilson, L. et Foster, J. W.** 1998. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. *J. Bacteriol.* **180** : 2409-2417.
- Behlau, I. et Miller, S. I.** 1993. A PhoP-Repressed Gene Promotes *Salmonella typhimurium* Invasion of Epithelial Cells. *J. Bacteriol.* **175** : 4475-4484.
- Benjamini, E., Sunshine, G. et Leskowitz, S.** 1996. *Immunology : A Short Course.* 3rd ed. Wiley-Liss. New-York. pp. 22-28, 36-38, 438.
- Besser, T. E., Gay, C. C., Gay, J. M., Hancock, D. D., Rice, D., Pritchett, L. C. et Erickson, E. D.** 1997. Salmonellosis associated with *S. typhimurium* DT104 in the USA. *Vet. Rec.* **140** : 75.
- Blanc-Potard, A.-B. et Groisman, E. A.** 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16** : 5376-5385.
- Blanc-Potard, A. Solomon, F., Kayser, J. et Groisman, E. A.** 1999. The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **181** : 998-1004.
- Boes, J., Dahl, J., Nielsen, B. et Krog, H. H.** 2001. Effect of separate transport, lairage, and slaughter on occurrence of *Salmonella Typhimurium* on slaughter carcasses. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 363-365.
- Boyd, E. F. et Hartl, D. L.** 1998. *Salmonella* Virulence Plasmid: Modular Acquisition of the *spv* Virulence Region by an F-Plasmid in *Salmonella enterica* Subspecies I and Insertion Into the Chromosome of Subspecies II, IIIa, IV and VII Isolates. *Genetics* **149** : 1183-1190.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. et Swaminathan, B.** 2000. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 2465-2467.

- Brumell, J. H., Steele-Mortimer, O. et Finlay, B. B.** 1999. Bacterial invasion : Force feeding by *Salmonella*. *Cur. Biol.* **9** :R277-280.
- Buzby, J. C. et Roberts, T.** 1996. ERS Updates U. S. Foodborne Disease Costs for Seven Pathogens. *FoodReview.* **19** : 20-25.
- Camacho, E. M. et Casadesús, J.** 2002. Conjugal transfer of the virulence plasmid of *Salmonella enterica* is regulated by the leucine-responsive regulatory protein and DNA adenine methylation. *Mol. Microbiol.* **44** : 1589-1598.
- Carlson, S. A., Stoffregen, W. C. et Bolin, S. R.** 2002. Abomasitis associated with multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* phagetype DT104. *Vet. Microbiol.* **85** : 233-240.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. Et Hensel, M.** 2002. *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Mediates Protection of Intracellular *Salmonella* from Reactive Nitrogen Intermediates. *J. Exp. Med.* **195** : 1155-1166.
- Chu, C., Chiu, C.-H., Chu, C.-H. et Ou, J. T.** 2002. Nucleotide and Amino Acid Sequences of *oriT-traM-traJ-traY-traA-traL* Regions and Mobilization of Virulence Plasmids of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis, Gallinarum-Pullorum, and Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184** : 2857-2862.
- Cirillo, D. M., Heffernan, E. J., Wu, L., Harwood, J., Fierer, J. et Guiney, D. G.** 1996. Identification of a Domain in Rck, a Product of the *Salmonella typhimurium* Virulence Plasmid, Required for Both Serum Resistance and Cell Invasion. *Infect. Immun.* **64** : 2019-2023.
- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. et Falkow, S.** 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.
- Cohen, N. D., Neiberghs, H. L., Wallis, D. E., Simpson, R. B., McGruder, E. D. et Hargis, B. M.** 1994. Genus-specific detection of salmonellae in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.* **55** : 1049-1054.
- Conlan, J. W.** 1997. Critical Roles of Neutrophils in Host Defense against Experimental Systemic Infections of Mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **65** : 630-635.

- Conlan, J. W.** 1996. Neutrophils Prevent Extracellular Colonization of the Liver Microvasculature by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64** : 1043-1047.
- Dahl, J., Wingstrand, A., Nielsen, B. et Baggesen, D. L.** 1997. Elimination of *Salmonella typhimurium* infection by the strategic movement of pigs. *Vet. Rec.* **140** : 679-681.
- D'Aoust, J. Y.** 1994. *Salmonella* in the international food trade. *Int. J. Food Microbiol.* **24** : 11-31.
- D'Aoust, J.-Y., Sewell, A. M. et Warburton, D. W.** 1992. A comparison of standard cultural methods for the detection foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* **16** : 41-50.
- Davies, P. R., Bovee, F. G. E. M., Funk, J. A., Morrow, W. E. M., Jones, F. T. et Deen, J.** 1998. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. *J. A. V. M. A.* **212** : 1925-1929.
- Davies, C.M. et Evison L. M.** 1991. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* **70** : 265-274.
- Eichelberg, K. et Galán, J. G.** 1999. Differential Regulation of *Salmonella typhimurium* Type III Secreted Proteins by Pathogenicity Island 1 (SPI-1)-Encoded Transcriptional Activators InvF and HilA. *Infect. Immun.* **67** : 4099-4105.
- Ernst, R. K., Guina, T. et Miller, S. I.** 1999. How Intracellular Bacteria Survive: Surface Modifications That Promote Resistance to Host Innate Immune Responses. *J. Infect. Dis.* **179** : S326-S330.
- Escartín, E. F., Saldaña Lozano, J. et Rodríguez García, O.** 2000. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *Int. J. Food Microbiol.* **54** : 19-25.
- Fang, F. C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J. et Guiney, D. G.** 1992. The alternative σ factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 11978-11982.
- Fedoraka-Cray, P. J., Collins Kelley, L., Stabel, T. J., Gray, J. T. et Laufer, J. A.** 1995. Alternate Routes of Invasion may Affect Pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in Swine. *Infect. Immun.* **63** : 2658-2664.

- Fedorka-Cray, P. J., Whipp, S. C., Isaacson, R. E., Nord, N. et Lager, K.** 1994. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. *Vet. Microbiol.* **41** : 333-344.
- Felix, A.** 1956. Phage Typing of *Salmonella typhimurium* : its Place in Epidemiological and Epizootiological Investigations. *J. Gen. Microbiol.* **14** : 208-222.
- Fernandez-Espla, M. D. et Martin-Hernandez, M. C.** 1997. Purification and Characterization of a Dipeptidase from *Lactobacillus casei* spp. *casei* IFPL 731 Isolated from Goat Cheese Made from Raw Milk. *J. Dairy Sci.* **80** : 1497-1504.
- Finlay, B. B. et Cossart, P.** 1997. Exploitation of Mammalian Host Cell Functions by Bacterial Pathogens. *Science.* **276** : 718-725.
- Finlay, B. B., Ruschkowski, S. et Dedhar, S.** 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell. Sci.* **99** : 283-296.
- Frost, A. J., Bland, A. P. et Wallis, T. S.** 1997. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet. Pathol.* **34** : 369-386.
- Galán, J. E.** 2001. *Salmonella* Interactions with Host Cells : Type III Secretion at Work. *Annu. Rev. Cell Dev.* **17** : 53-86.
- Galán, J. E.** 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20** : 263-271.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., Maguire, M. E. et Finlay, B. B.** 1992. Characterization of the micro-environment of *Salmonella typhimurium* containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **6** : 3289-3297.
- García-del Portillo, F., Jungnitz, H., Rohde, M. et Guzmán, C.** 2000. Interaction of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium with Dendritic Cells Is Defined by Targeting to Compartments Lacking Lysosomal Membrane Glycoproteins. *Infect. Immun.* **68** : 2985-2991.
- Gebreyes, W. A. et Altier, C.** 2002. Molecular characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. *J. Clin. Microbiol.* **40** : 2813-2822.
- Gewirtz, A. T., Siber, A. M., Madara, J. L. et McCormick, B. A.** 1999. Orchestration of Neutrophil Movement by Intestinal Epithelial Cells in Response

- to *Salmonella typhimurium* Can Be Uncoupled from Bacterial Internalization. *Infect. Immun.* **67** : 608-617.
- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M. et Angulo, F.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in the United States. *N. Engl. J. Med.* **338** : 1333-1338.
- Gray, J. T. et Fedorka-Cray, P. J.** 1996. Salmonellosis in swine; a review of significant areas affecting the carrier state. First international symposium. Ecology of *Salmonella* in pork production. Ames, Iowa. March 11-13.
- Groisman, E. A., Blanc-Potard, A.-B. et Uchiya, K.** 1999. Pathogenicity Islands and the Evolution of *Salmonella* Virulence. pp. 127-150. *In* Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements. Kaper, J. B., and Hacker, J. eds. ASM Press. Washington D. C.
- Groisman, E. A. et Ochman, H.** 1996. Pathogenicity Islands : Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell.* **87** : 791-794.
- Groisman, E. A., Parra-Lopez, C., Salcedo, M., Lipps, C. J. et Heffron, F.** 1992. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 11939-11943.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. et Mendoza, C.** 2002. Characterization of a Self-Transferable Plasmid from *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Clinical Isolates Carrying Two Integron-Borne Gene Cassettes Together with Virulence and Drug Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** : 2977-2981.
- Guiney, D. G., Libby, S., Fang, F. C., Krause, M. et Fierer, J.** 1995. Growth-Phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* **3** : 275-279.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. et Tschäpe, H.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria : structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23** : 1089-1097.
- Hall, H. K. et Foster, J. W.** 1996. The Role of Fur in the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium* Is Physiologically and Genetically Separable from Its Role in Iron Acquisition. *J. Bacteriol.* **178** : 5683-5691.

- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. et Zychlinsky, A.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96** : 2396-2401.
- Hogue, A., Akkina, J., Angulo, F., Johnson, R., Petersen, K., Saini, P. et Schlosser, W.** 1997. Situation Assessment *Salmonella typhimurium* DT104. U. S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Washington, DC20250.
- Hueck, C. J.** 1998. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62** : 379-433.
- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D. et Rostagno, M. H.** 2001a. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **114** : 382-384.
- Hurd, H. S., Gailey, J. K., McKean, J. D. et Rostagno, M. H.** 2001b. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium-contaminated environment. Am. J. Vet. Res. **62** : 1194-1197.
- Hurd, H. S., McKean, J. D., Griffith, R. W., Wesley, I. V. et Rostagno, M. H.** 2002. *Salmonella enterica* Infections in Market Swine with and without Transport and Holding. Appl. Environ. Microbiol. **68** : 2376-2381.
- Ibanez-Ruiz, M., Robbe-Saule, V., Hermant, D., Labrude, S. et Norel, F.** 2000. Identification of RpoS (σ^S)-Regulated Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. J. Bacteriol. **182** : 5749-5756.
- Imberechts, H., De Filette, M., Wray, C., Jones, Y., Godard, C. et Pohl, P.** 1998. *Salmonella typhimurium* phage type DT104 in Belgian livestock. Vet Rec. **143** : 424-425.
- Jepson, M. A. et Clark, M. A.** 1998. Studying M cells and their role in infection. Trends Microbiol. **6** : 359-365.
- Jones, B. D. et Falkow, S.** 1996. Salmonellosis : Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants. Annu. Rev. Immunol. **14** : 533-561.
- Käsbohrer, A., Protz, D., Helmuth, R., Nöckler, K., Blaha, T., Conraths, F. J. et Geue, L.** 2000. *Salmonella* in slaughter of German origin: An epidemiological study. Eur. J. Epidemiol. **16** : 141-146.

- Khan, A. A., Nawaz, M. S., Khan, S. A. et Cerniglia, C. E.** 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **182** : 355-360.
- Laval, A., Morvan, H., Desprez, G. et Corbion, B.** 1991. La salmonellose du porc. *Rec. Méd. Vét.* **167** : 835-848.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S. et Falkow, S.** 2000. OmpR Regulates the Two-Component System SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J. Bacteriol.* **182** : 771-781.
- Lee, C. A. et Falkow, S.** 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** : 4304-4308.
- Le Minor, L.** 1984. p. 427. *In* Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Le Minor, L.** 1988. Typing of *Salmonella* Species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7** : 214-218.
- Le Minor, L. et Popoff, M.** 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.
- Letellier, A., Messier, S. et Quessy, S.** 1999. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Finishing Swine at Canadian Abattoirs. *J. Food Prot.* **62** : 22-25.
- Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E. et Guiney, D. G.** 2000. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell. Microbiol.* **2** : 49-58.
- Lindgren, S. W., Stojiljkovic, I. Et Heffron, F.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 4197-4201.
- Low, J. C., Angus, M., Hopkins, G., Munro, D. et Rankin, S. C.** 1997. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 isolates and investigation of strains with transferable apramycin resistance. *Epidemiol. Infect.* **118** : 97-103.

- Makala, L. H. C., Haverson, K., Stokes, C. R., Bailey, M. et Bland, P. W.** 1998. Isolation and characterisation of pig Peyer's patch dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61** : 67-81.
- Marg, H. Scholz, H. C., Arnold, T., Rösler, U. et Hensel, A.** 2001. Influence of long-time transportation stress on re-activation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 385-388.
- Markogiannakis, A., Tassios, P. T., Lambiri, M., Ward, L. R., Kourea-Kremastinou, J., Legakis, N. J., The Greek Nontyphoidal Salmonella Study Group et Vatopoulos, A. C.** 2000. Multiple Clones within Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Phage Type DT104. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 1269-1271.
- Martin, G. D., Chart, H., Threlfall, E. J., Morgan, E., Lodge, J. M., Brown, N. L. et Stephen, J.** 2000. Invasiveness of *Salmonella* serotypes Typhimurium and Enteritidis of human gastro-enteritic origin for rabbit-ileum: role of LPS, plasmids and host factors. *J. Med. Microbiol.* **49** : 1011-1021.
- McCormick, B. A., Miller, S. I. Et Madara, J. L.** 1996. New insights on molecular pathways utilized by *Salmonella* species in cell binding. *Front. Biosci.* **1** : d131-d145.
- Metzer, E., Agmon, V., Andoren, N. et Cohen, D.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type DT104 among salmonellae causing enteritis in Israel. *Epidemiol. Infect.* **121** : 555-559.
- Meyerholz, D. K., Stabel, T. J., Ackermann, M. R., Carlson, S. A., Jones, B. D. et Pohlenz, J.** 2002. Early Epithelial Invasion by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 in the swine Ileum. *Vet. Pathol.* **39** : 712-720.
- Mølbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M. et Wegener, H. C.** 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* **341** : 1420-1425.

- Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E. et Falkow, S.** 1996. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93** : 9833-9838.
- Møretrø, T., Midtgaard, E. S., Neese, L. L. et Langsrud, S.** 2003. Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying surfaces. Vet. Microbiol. **94** : 207-217.
- Neidhart, F. C.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. vol. 2. ASM Press. Washington D. C. pp. 2691, 2699-2700.
- Niedergang, F., Sirard, J.-C., Blanc, C. T. et Kraehenbuhl, J.-P.** 2000. Entry and Survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not require macrophage-specific virulence factors. **97** : 14650-14655.
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J. et Lind, P.** 1995. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. Vet. Microbiol. **47** : 205-218.
- Nnalue, N. A., Shnyra, A., Hultenby, K. et Lindberg, A. A.** 1992. *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* Associated with Liver Cells after Intravenous Inoculation of Rats Are Localized Mainly in Kupffer Cells and Multiply Intracellularly. Infect. Immun. **60** : 2758-2768.
- Oh, Y., Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S. I. Et Swanson, J. A.** 1996. Rapid and Complete Fusion of Macrophage Lysosomes with Phagosomes Containing *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. **64** : 3877-3883.
- Ohl, M. E. et Miller, S. I.** 2001. *Salmonella* : A Model for Bacterial Pathogenesis. Annu. Rev. Med. **52** : 259-274.
- O'Neal, C. R., Gabriel, W. M., Turk, A. K., Libby, S. J., Fang, F. C. et Spector, M. P.** 1994. RpoS Is Necessary for Both the Positive and Negative Regulation of Starvation Survival Genes during Phosphate, Carbon, and Nitrogen Starvation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **176** : 4610-4616.
- Pace, J., Hayman, M. J. et Galán, J. E.** 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella typhimurium*. Cell. **72** : 505-514.

- Perry, J. D., Riley, G., Gould, F. K., Perez, J. M., Boissier, E., Ouedraogo, R. T. et Freydière, A. M.** 2002. Alafosfalin as a Selective Agent for Isolation of *Salmonella* from Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **40** : 3913-3916.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., Brenner, F. W. et Gheesling, L. L.** 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **152** : 907-909.
- Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J. et Prescott, J.** 1998. *Salmonella typhimurium* DT104 : A virulent and drug-resistant pathogen. *Can Vet. J.* **39** : 559-565.
- Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L. et Allen, K.** 2002. Diversity in Antimicrobial Resistance and Other Characteristics Among *Salmonella* Typhimurium DT104 Isolates. *Microb. Drug Resist.* **8** : 107-122.
- Prescott, L., Harley, J. P. et Klein, D. A.** 1995. Microbiologie. DeBoeck Université. Bruxelles. pp. 54-55, 76, 293, 406, 410-412, 579, 583-584, 586-588, 595, 599-600, 659-661, 692.
- Quirke, A. M., Leonard, N., Kelly, G., Egan, J., Lynch, P. B., Rowe, T. et Quinn, P.J.** 2001. Prevalence of *Salmonella* serotypes on pig carcasses from high- and low-risk herds slaughtered in three abattoirs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 360-362.
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L. G. et Bäumlér, A. J.** 2002. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants. *Infect. Immun.* **70** : 2249-2255.
- Rathman, M., Barker, L. P. et Falkow, S.** 1997. The Unique Trafficking of *Salmonella typhimurium*-Containing Phagosomes in Murine Macrophages Is Independent of the Mechanism of Bacterial Entry. *Infect. Immun.* **65** : 1475-1485.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D. et Farmer, J. J. III.** 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.

- Ribot, E. M., Wierzba, R. K., Angulo, F. J. et Barrett, T. J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 Isolated from Humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerg. Infect. Dis.* **8** : 387-391.
- Richter-Dahlfors, A., Buchanm A. M. J. et Finlay, B. B.** 1997. Murine Salmonellosis Studied by Confocal Microscopy: *Salmonella typhimurium* Resides Intracellularly Inside Macrophages and Exerts a Cytotoxic Effect on Phagocytes In Vivo. *J. Exp. Med.* **186** : 569-580.
- Rubino, S., Muresu, E., Solinas, M., Santona, M., Paglietti, B., Azara, A., Schiaffino, A., Santona, A., Maida, A. et Cappuccinelli, P.** 1998. IS200 fingerprint of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium human strains isolated in Sardinia. *Epidemiol. Infect.* **120** : 215-222.
- Saget, B. M. et Walker, G. C.** 1994. The Ada protein acts as both a positive and a negative modulator of *Escherichia coli*'s response to methylating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 9730-9734.
- Salyers, A. A. et Whitt, D. D.** 1994. Bacterial pathogenesis a molecular approach. ASM Press. Washington, D. C. pp. 55, 143-150, 175-179, 229-242, 352-353.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Bäumlner, A. J. et Adams, L. G.** 2002. Morphologic and Molecular Characterization of *Salmonella typhimurium* Infection in Neonatal Calves. *Vet. Pathol.* **39** : 200-215.
- Scherer, C. A. et Miller, S. I.** 2001. Molecular Pathogenesis of Salmonellae. pp. 265-333. *In Principles of Bacterial Pathogenesis.* Groisman, E. A. ed. Academic Press, San Diego.
- Scholz, H. C., Arnold, T., Marg, H., Rösler, U. et Hensel, A.** 2001. Improvement of an *invA*-based PCR for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in organs of pigs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 401-403.
- Schrank, I. S., Mores, M. A. Z., Costa, J. L. A., Frazzon, A. P. G., Soncini, R., Schrank, A., Vainstein, M. H. et Silva, S. C.** 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.* **82** : 45-53.

- Schwartz, K. J.** 1999. Salmonellosis. pp. 535-551, 826. *In* Diseases of swine. Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L. et Taylor, D. J. eds. 8th ed. Iowa State University Press. Ames. Iowa.
- Shea, J. E., Beuzon, C. R., Gleeson, C., Mundy, R. et Holden, D. W.** 1999. Influence of the *Salmonella typhimurium* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System on Bacterial Growth in the Mouse. *Infect. Immun.* **67** : 213-219.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. et Holden, D. W.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 2593-2597.
- Sirard, J.-C., Niedergang, F. et Kraehenbuhl, J.** 1999. Live Attenuated *Salmonella* : a paradigm of mucosal vaccines. *Immun. Rev.* **171** : 5-26.
- Šplíchal, I., Trebichavský, I., Muneta, Y. et Mori, Y.** 2002. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Vet. Res.* **33** : 291-297.
- Stone, G. C., Oberst, R. D., Hays, M. P., McVey, S. et Chengappa, M. M.** 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.* **32** : 1742-1749.
- Sukhan, A.** 2000. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella typhimurium*: common and unique features. *Cell. Mol. Life Sci.* **57** : 1033-1049.
- Sukupolvi, S., Lorenz, R. G., Gordon, J. I., Bian, Z., Pfeifer, J. D., Normark, S. J. et Rhen, M.** 1997. Expression of Thin Aggregative Fimbriae Promotes Interaction of *Salmonella typhimurium* SR-11 with Mouse Small Intestinal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **65** : 5320-5325.
- Swanenburg, M., Berends, B. R., Urlings, H. A. P., Snijders, J. M. A. et van Knapen, F.** 2001a. Epidemiological investigations into the sources of *Salmonella* contamination of pork. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114** : 356-359.
- Swanenburg, M., Urlings, H. A. P., Snijders, J. M. A., Keuzenkamp, D. A. et van Knapen, F.** 2001b. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **70** : 243-254.

- Thankavel, K., Shah, A. H., Cohen, M. S., Ikeda, T., Lorenz, R. G., Curtiss III, R. et Abraham, S. N.** 1999. Molecular Basis for the Enterocyte Tropism Exhibited by *Salmonella typhimurium* Type 1 Fimbriae. *J. Biol. Chem.* **274** : 5797-5809.
- Threlfall, E. J., Frost, J. A. et Rowe, B.** 1996a. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet.* **347** : 1053-1054.
- Threlfall, E. J., Frost, J. A., Ward, L. R. et Rowe, B.** 1994. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella typhimurium* DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. *Vet. Rec.* **134** : 577.
- Threlfall, E. J., Hampton, M. D., Schofield, S. L., Ward, L. R., Frost, J. A. et Rowe, B.** 1996b. Epidemiological application of differentiating multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by plasmid profile. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **6** : R155-R159.
- Threlfall, E. J., Ward, L. R. et Rowe, B.** 1998. Multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 and salmonella bacteraemia. *Lancet.* **352** : 287-288.
- Todd, E. C. D.** 1989. Preliminary Estimates of Costs of Foodborne Disease in Canada and Costs to Reduce Salmonellosis. *J. Food. Prot.* **52** : 586-594.
- Trebichavský, I., Dlabač, V., Řeháková, Z., Zahradníčková, M. et Šplíchal, I.** 1997. Cellular Changes and Cytokine Expression in the Ilea of Gnotobiotic Piglets Resulting from Peroral *Salmonella typhimurium* Challenge. *Infect. Immun.* **65** : 5244-5249.
- Uchiya, K., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D. et Groisman, E. A.** 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J.* **18** : 3924-3933.
- van der Velden, A. W. M., Bäumlér, A. J., Tsois, R. M. et Heffron, F.** 1998. Multiple Fimbrial Adhesins Are Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium* in Mice. *Infect. Immun.* **66** : 2803-2808.
- Vasquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D. W., Lucia, S. M., Dinauer, M. C., Mastroeni, P. et Fang, F. C.** 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* **287** : 1655-1658.

- Vega-López, M. A., Bailey, M., Telemo, E. et Stokes, C. R.** 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **44** : 319-327.
- Wall, P. G., Morgan, D., Lamden, K., Griffen, M., Threlfall, E. J. et Rowe, B.** 1994. A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **4** : R130-135.
- Wick, M. J.** 2003. The role of dendritic cells in the immune response to *Salmonella*. *Immun. Lett.* **85** : 99-102.
- Widjojoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R., Verdonk, G. P. H. T. et Verhoef, J.** 1992. The magnetic immunopolymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* **30** : 3195-3199.
- Wilcock, B. P. et Schwartz, K. J.** 1992. Salmonellosis. In Leman AD, Straw B, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor D eds. *Diseases of Swine 7th edn.* Ames, Iowa : Iowa State University Press : 570-583.
- Wong, K.-K., McClelland, M., Stillwell, L. C., Sisk, E. C., Thurston, S. J. et Saffer, J. D.** 1998. Identification and Sequence Analysis of a 27-Kilobase Chromosomal Fragment Containing a *Salmonella* Pathogenicity Island Located at 92 Minutes on the Chromosome Map of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Infect. Immun.* **66** : 3365-3371.
- Wood, M. W., Jones, M. A., Watson, P. R., Hedges, S., Wallis, T. S. et Galyov, E. E.** 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol. Microbiol.* **29** : 883-891.
- Wood, R. L., Pospischil, A. et Rose, R.** 1989. Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *Am. J. Vet. Res.* **50** : 1015-1021.
- Wood, R. L. et Rose, R.** 1992. Population of *Salmonella typhimurium* in internal organs of experimentally infected carrier swine. *Am. J. Vet. Res.* **53** : 653-658.
- Wu, M. T., Carlson, S. A. et Meyerholz, D. K.** 2002. Cytopathic effects observed upon expression of a repressed collagenase gene present in *Salmonella* and

related pathogens: mimicry of a cytotoxin from multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phagetype DT104. *Microb. Pathog.* **33** : 279-287.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Sylvie Côté		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Sylvie Côté, Ann Letellier, Louise Lessard, Charles Surprenant, Sylvain Quessy	
Titre Distribution of <i>Salmonella</i> in tissues following natural and experimental infection in pigs	
Revue Canadian Journal of Veterinary Research	Date de publication

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Sylvie Côté inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Étude de la distribution de Salmonella spp. dans les tissus chez le porc suite à une infection naturelle et expérimentale.</i>		
Coauteur Ann Letellier	Signature [REDACTED]	Date 5 juin 2003
Coauteur Louise Lessard	Signature [REDACTED]	Date 5 juin 2003
Coauteur Charles Surprenant	Signature [REDACTED]	Date 5 juin 2003
Coauteur Sylvain Quessy	Signature [REDACTED]	Date 5 juin 2003
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le [REDACTED]

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001