

**Évaluation de la technique d'amplification  
génique (PCR) pour la recherche de  
*Salmonella* : Étude pilote visant à la mise en  
place et à la surveillance d'une filière  
intégrée de production de viande porcine  
« *Salmonella*-free »**

Projet co-financé par le Ministère des Classes Moyennes et  
de l'Agriculture (DG6 Recherche et Développement) et par  
le Ministère de la Région Wallonne.

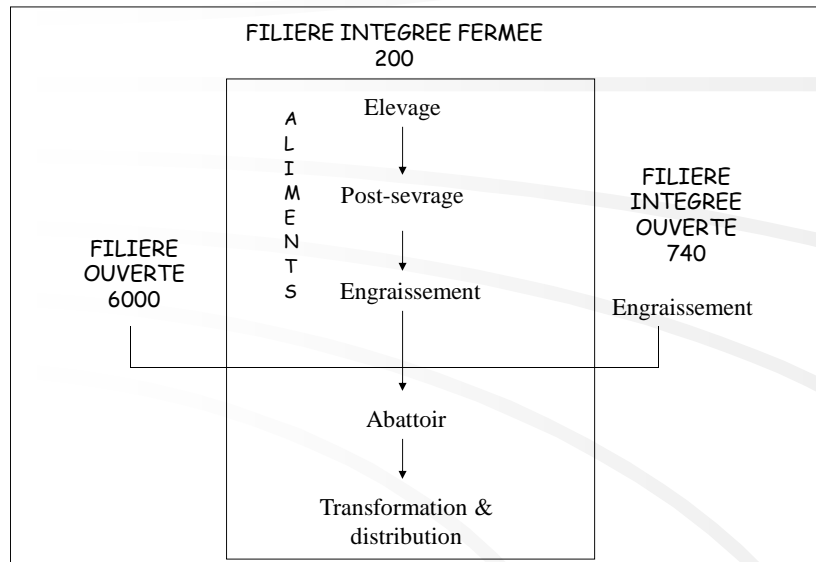
Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

**Plan de l'exposé**

- Introduction de l'étude pilote.
- Plan de surveillance.
- Mise au point des méthodes d'analyses.
- Typage des Salmonelles.
- Conclusion.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Surveillance - Structure de la filière



Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Plan de surveillance

- Surveillance axée sur la filière intégrée fermée.
- 6000 tests à répartir sur 78 semaines.
- 1000 tests pour enquêtes approfondies.
- Prélèvements dans quelques sites d'engraissement sélectionnés au sein de la filière intégrée ouverte.
- Prélèvements sur les porcs du circuit ouvert abattus pour comparer les progrès obtenus.
- Mode de prélèvement adapté aux différents stades de la filière.
- Prélèvements systématique ou aléatoire selon une planification précise.

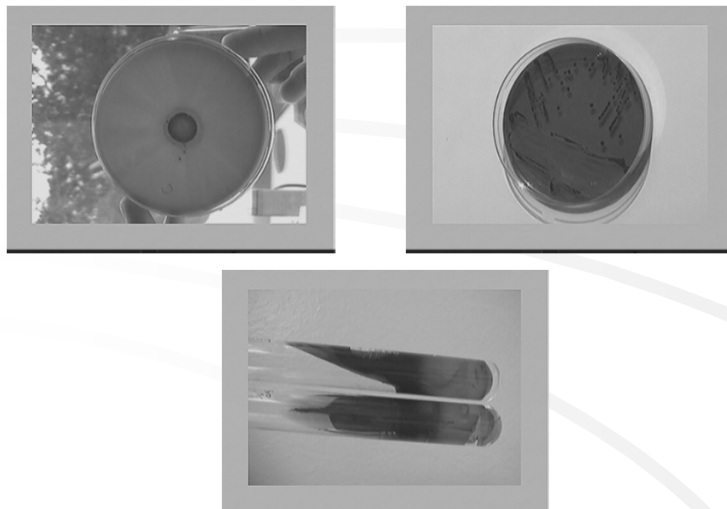
Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Aspect diagnostique de laboratoire

- Protocole standardisé pour une surveillance en temps réel de la filière (« de la ferme à la fourchette »)
  - Besoin d'une réponse en 24 heures.
- ⇒ Utilisation d'un kit PCR commercial (Probélia, Sanofi): principe.
- ⇒ Utilisation de la méthode bactériologique Diassalm.
- Enjeux des deux méthodes.
- ⇒ Optimisation des méthodes (aliments pour porcs, lisier, matières fécales, écouvillons, eaux, boues, viande) + limite de détection.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire - Liège

## Exemple de réponse Diassalm



Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire - Liège

## Aliments pour porcs

- Enjeu : surveiller les aliments donnés aux porcs de la filière intégrée.
- Prélèvements au chargement  $\Rightarrow$  destination connue.
- Optimisation sur les aliments finis mais pas sur les ingrédients constitutifs.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats aliments pour porcs

- $\Rightarrow$  Analyse dans 25 g pour les deux méthodes.
- $\Rightarrow$  Dilution 1/10 ADN en BSA 3% pour PCR pas nécessaire.
- $\Rightarrow$  Seuil de détection Diassalm : 1-10 cfu/25g.
- $\Rightarrow$  Seuil de détection PCR : 1-100 cfu/25g.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Matières fécales

- Enjeu : déterminer le portage en Salmonelles des porcs au cours de leur vie et au moment de l'abattage.

Filière intégrée fermée.

- Élevage
- Post-sevrage
- Engraissement
  - Prélèvement au sol.
- Contenu du tube digestif à l'abattoir

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Matières fécales

- Filière intégrée ouverte.
- Engraissement :
  - Prélèvement au sol.
- Contenu du tube digestif à l'abattoir
- Filière ouverte.
- Contenu du tube digestif à l'abattoir

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Matières fécales (suite)

- Essais sur la masse analysée (10 ou 25g) et la durée d'incubation (4 ou 18 heures).
- Comparaison *en élevage* de 2 types de prélèvements : matières fécales et écouvillons.
- Comparaison *en abattoir* de 2 types de prélèvements : matières fécales et ganglions mésentériques.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats matières fécales

- ⇒ Bactéries en compétition sur Diassalm.
- Masse analysée et durée d'incubation :
  - ⇒ Pas d'effet positif sur les résultats.
  - ⇒ Analyse dans 25 g.
  - ⇒ Dilution 1/10 ADN en BSA 3% nécessaire pour PCR .
  - ⇒ Seuil de détection Diassalm : 1-100 cfu/25g.
  - ⇒ Seuil de détection PCR : 10-1000 cfu/25g.
- Écouvillons : similaire mais moins pratique.
- Ganglions mésentériques : moins bon et pas pratique.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats lisiers de porcs

- Masse incubée : mêmes résultats 10 ou 25 g.
- Durée incubation : 4 h, OK en Diassalm mais pas en PCR.

⇒ Analyse dans 25 g.

⇒ Dilution 1/10 ADN en BSA 3% nécessaire pour PCR.

⇒ Seuil de détection Diassalm : 1-10 cfu/25g.

⇒ Seuil de détection PCR : 10-1000 cfu/25g.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Viande

- Enjeu : analyse de viandes hachées de porc en fin de processus de transformation.
  - Limite de détection réalisée sur une viande hachée naturellement contaminée mais indemne en salmonelles et sur une viande hachée irradiée.
- ⇒ Évaluer l'effet de la flore secondaire sur la sensibilité de détection.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats viande

- ⇒ Analyse dans 25 g.
- ⇒ Dilution 1/10 ADN en BSA 3% pas nécessaire pour PCR.
- ⇒ Seuil de détection Diassalm : 1-10 cfu/25g (viande irradiée).
- ⇒ Seuil de détection Diassalm : 1-100 cfu/25g (viande naturellement contaminée).
- ⇒ Seuil de détection PCR : 1-10 cfu/25g (viande irradiée).
- ⇒ Seuil de détection PCR : non valide (viande naturellement contaminée).

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats écouvillons sur carcasses

- Surface de 600 cm<sup>2</sup> écouvillonnée (4 zones).
- Coton imbibé de peptone sel.
- Seuil de détection sur cotons vierges:
  - ⇒ Diassalm : 1-10 cfu/écouvillons.
  - ⇒ PCR : 1-10 cfu/écouvillons.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège



## Eaux et boues de station d'épuration

- Domaine d'instigation: station industrielle + amont et aval.
- Détermination de l'effet de la station sur le niveau de contamination des eaux.
- Comparaison avec station urbaine.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats eaux et boues de station d'épuration

- Eaux des différents bassins et boues contaminés en permanence.  
Eau entrée :  $> 10^3$  salmonelle/ml.  
Eau sortie :  $> 10^{-1}$  salmonelle/ml.  
Boues :  $> 10^2$  salmonelle/g.
- ⇒ l'effet de la station sur le niveau de contamination des eaux: facteur de réduction  $\geq 10.000$ .
- ⇒ Sérotypes rencontrés : Derby, Typhimurium, Goldcoast, Isangi.
- Source : principalement abattoirs porcin et bovin.

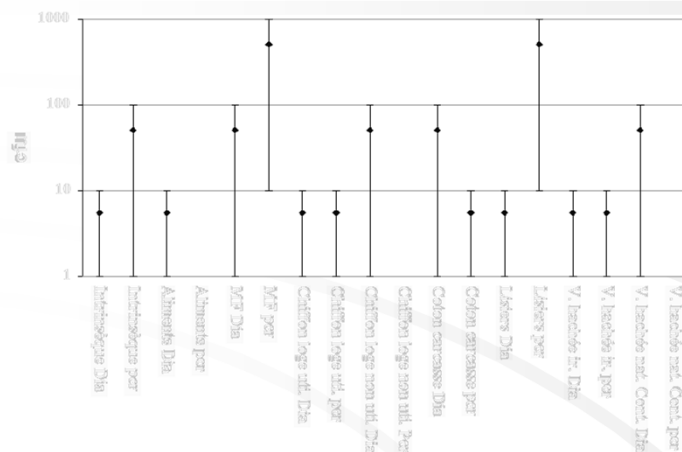
Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats eaux et boues de station d'épuration (suite)

- Station urbaine :  
 Eau entrée :  $> 10^1$  Salmonelles/ml.  
 Eau sortie :  $< 10^{-2}$  Salmonelles/ml.  
 Sérotypes : Derby, Typhimurium.  
 ⇒ Confirmation des résultats + suivi évolution contamination des boues et eaux au cours du temps.

Laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Liège

## Seuils de détection



Laboratoire de microbiologie des denrées alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Liège

## Problèmes rencontrés

- Manque de reproductibilité et de répétabilité avec le kit.
  - Problèmes des contrôles du kit (contrôle négatif positif).
  - Manque de corrélation entre les deux méthodes.
  - Inhibition sur contrôles du kit.
- ⇒ Suspicion du laveur de plaque comme source de contamination.
- Problèmes pour la méthode bactériologique : bactérie en compétition durant l'incubation et sur Diassalm.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Typage de *Salmonella*

- But : traçabilité des origines des contaminations.
- Utilisation des techniques classiques : sérotypage et antibiorésistance.
- Utilisation de méthodes de biologie moléculaire basées sur la PCR.

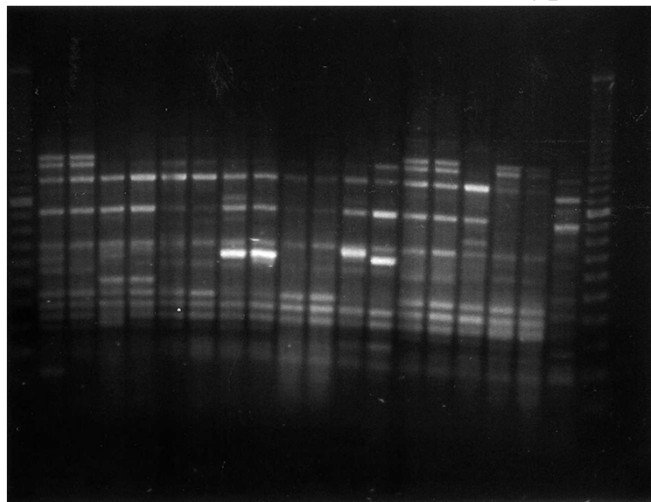
Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Méthodes de biologie moléculaire

- **Enjeu** : rechercher une ou plusieurs techniques rapides pour différencier les souches d'origines différentes ⇒ traçabilité des contaminations.
- **1<sup>ère</sup> approche** : profil semblable pour les souches d'un même sérotype ⇒ REP-PCR, ERIC-PCR, RAPD.
- **2<sup>ème</sup> approche** : technique qui puisse révéler des différences génomiques au sein du même sérotype ⇒ évaluation de 10 primers RAPD sur 16 souches de 3 sérotypes.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

### Profil RAPD D14307 sur 9 sérotypes



Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Résultats méthodes de biologie moléculaire

- **Stratégie poursuivie dans la suite :**
  - ⇒ RAPD (primer D14307) qui donne le sérotype.
  - ⇒ Discrimination avec les primers P1254 et 23L et OPB17 selon les sérotypes au cours d'une même amplification.
  - ⇒ Sérotypage dirigé et antibiorésistance.
  - ⇒ Éventuellement PFGE, AFLP en sous-traitance.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Conclusion

- Actuellement, le kit PCR ne peut être utilisé seul ; l'utilisation de la méthode Diassalm en parallèle est nécessaire pour s'assurer de la fiabilité des résultats.
- La combinaison des techniques de typage devrait permettre de différencier des souches d'origines différentes et de pouvoir identifier la ou une des source de contamination.

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège

## Conclusion (suite)

- Protocole idéal de détection en surveillance : analyse sur 25g sauf pour les écouvillons.
  - ⇒ Tri des échantillons positifs en 24 heures.
  - ⇒ Analyse Diassalm sur les positifs uniquement.
  - ⇒ 4 jours minimum après le début des analyses, typage des souches isolées sur TSI (RAPD D14307, RAPD , sérotypage, antibiorésistance).

Laboratoire de microbiologie des  
denrées alimentaires, Faculté de  
Médecine Vétérinaire, Liège