

# THESE

Présentée devant

**L'Université de la Réunion**

Pour l'obtention

**DU DIPLÔME DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie, Epidémiologie, Santé Publique Vétérinaire

Présentée et soutenue publiquement le 04 février 2011

Par Isabelle Henry

**Epidémiologie analytique de *Salmonella* subsp. *enterica* et de  
*Campylobacter* spp. dans les élevages de poulets de chair à la Réunion.  
Investigation des sources infectieuses de *Salmonella* subsp. *enterica* de la  
production à la transformation.**

Directeur de Thèse : Dr Eric Cardinale

## Composition du Jury :

Président : Professeur Pascale Guiraud

Rapporteur : Dr Martine Denis

Rapporteur : Professeur Pierre Colin

Examineur : Dr Alain Michault

Examineur : Professeur François Taglioni

*« Chercher n'est pas une chose et trouver une autre, mais le gain de la  
recherche, c'est la recherche même »*

*(Saint Grégoire de Nysse)*

\*\*\*

*« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment  
il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science »*

*(François Jacob)*

## Remerciements

Trois années passées, plus de 36 000 km parcourus à sillonner l'île Bourbon à la rencontre de mes plus fidèles volatiles, des virées en métropole pour les analyses, et de multiples rencontres fortuites et enrichissantes qui ont fait de ce parcours, une histoire à part entière, remplie d'anecdotes, dont un roman ne suffirait pas à lui-même pour en décrire tout les détails.

Avant de dresser ma liste de remerciements, qui, je l'espère, sera la plus exhaustive possible, je tenais à remercier les membres de mon jury pour l'évaluation de mon travail ainsi que mes rapporteurs, Pierre Colin et Martine Denis venus de très loin pour juger ce travail.

J'apporterai mes remerciements aux personnes qui ont suivies de près ou de loin ces travaux au gré des différentes structures qui m'ont accueillie.

Merci, tout d'abord à Eric, mon directeur de thèse pour son éternel optimisme et son enthousiasme.

Merci à la filière avicole, aux éleveurs, et en particulier je remercie sincèrement tout le staff d'Avi-pôle Réunion, pour ses conseils et la qualité humaine de chacun de son personnel. Un infini merci à Jeff Reichardt, Jacky, Jimmy et François qui m'ont orientée sur le terrain.

Merci également aux différentes équipes de Crête d'Or Entreprise que j'ai cotoyées quotidiennement à des heures matinales voire nocturnes. Merci à Mr Gauvrit d'avoir accepté ce projet ; merci à toute l'équipe de l'abattoir et en particulier à Pierre Reype et Carole Jonas. Merci au service qualité amont et aval : à Benjamin Boulanger, ami et heureux papa, Guillaume Burel, Stéphanie Yeung et au service de découpe : Eric Pascal ainsi qu'à tout le personnel pour leur chaleur humaine : Adeline, Lynda, Tina, Mr Huet et j'en oublie sûrement...

Je remercie sincèrement Gilles Salvat et l'unité HQPAP de l'Afssa de Ploufragan de m'avoir accueillie pendant cinq mois pour les analyses de biologie moléculaire. Merci à Marianne Chemaly, Martine Denis, Annaelle Kerouanton pour leurs conseils. Merci à Céline Courtillon et Bérengère Chidaine pour m'avoir formée aux analyses PFGE, merci également à Françoise Lalande pour m'avoir initiée au sérotypage et merci à Valérie Rose pour son coup de main. Mes yeux s'en souviennent encore...Merci encore au reste de l'unité : Annie, Emmanuelle, Claire, Ségolène, Aurore, Zineb qui m'ont fait découvrir la Bretagne.

Je tiens également à remercier l'équipe CEB de l'Afssa de Maisons-Alfort et en particulier : Sophie Granier qui a bien voulu m'accepter en urgence pour que je puisse réaliser les antibiogrammes. Ces 15 jours passés ensemble étaient dignes d'un marathon, où nous avons dû battre le record de musculation du poignet droit !

Je tiens à remercier François Xavier Weill de l'institut Pasteur de m'avoir accordé un moment lors d'une virée sur Paris pour me donner les isolats humains. Merci également au Dr Michault pour m'avoir complété la collection des souches humaines.

Je tiens à remercier Christian Meriau et Koussay Dellagi pour m'avoir accueillie au sein de la plateforme Cyroi-Crvoi à la Réunion.

Qu'auraient été ces 3 années si je n'avais pas eu pour soutien moral mes ami(e)s et collègues de bureau. Merci à Claire qui m'a suivie depuis le top départ de cette aventure, toujours fidèle à elle-même, à mes compatriotes et collocs du début : Péperre, Niko, Papy Rémy et Jean-Yves. Puis au gré du vent, j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés, Amélie pour son soutien, Marie-Marie alias Meuh Meuh, Marianne dont je tairai ici son surnom et qui je remercie pour la relecture de ce manuscrit, Fred alias Tout Pourri, Erwan alias Poil au Bec, Sarah, la tite Licciardi, Vanina, Seb, Guy, Max, Greg, Pablo, Math, Laurence, Mag, Hella, Jean Hugues, Vivian et Michel. Merci à Hervé pour ses discussions méta-physico-philosophiques qui m'ont parfois perdue, je l'avoue, ainsi que pour ses précieux conseils qui m'aideront, j'espère, à avancer.



Merci également aux agents d'entretien de la plateforme pour les pauses café partagées et leur bonne humeur quotidienne.

Merci à ma famille de m'avoir soutenue à plus de 11 000km, et en particulier à mes parents que j'aime, à ma sœur, à mon marcou, et à ma grand-mère Lucile, une de mes plus fidèles supportrices.

Pensant que l'inhumain a également droit à ma reconnaissance, je tiens à remercier mes chers poulets qui ne sont plus là pour l'entendre et sans qui cette étude aurait été inconcevable ; merci à mon fidèle destrier d'avoir parcouru autant de route et dont sa santé physique, en fut affectée. Merci à tous ces jeteurs de sort qui ont fait de ces journées, des moments insolites que je ne pourrai pas oublier.

Merci également à mes 3 ordinateurs qui n'ont pas pu survivre durant ces années et dont la lutte mutuelle en fut par moment acharnée ; mais, l'être humain que je suis a réussi à en avoir la maîtrise absolue, même si certains puissent encore en douter...

Je ne terminerai pas cette liste de remerciements sans citer mon plus fidèle compagnon, Bourbon ainsi qu'à ses amis, Bob, Ugo, Rhum, Café et Mafi-Loah qui ont enjolivé mon quotidien.

*Merci à toutes et à tous,*

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

CFU: Colony-Forming Unit

CHEF : Clamped Homogenous Electric Field

DDSV : Direction Départementale des Services Vétérinaires

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

INVS: institut de veille sanitaire

PCR: Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed field Gel Electrophoresis

PI : Phage Infected

RDNC : Routine Dilution No Conformity

ST : Salmonella Typhimurium

TIA: Toxi-infection alimentaire

TIAC : Toxi-infection Alimentaire Collective

UV: Ultra Violet

UE: Union Européenne

# Table des Matières

<b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
<b>Synthèse Bibliographique.....</b>	<b>17</b>
<b>1. LES SALMONELLES.....</b>	<b>16</b>
1.1. CARACTERISTIQUES GENERALES.....	16
1.1.1. Morphologie.....	16
1.1.2. La taxonomie et les caractères biochimiques.....	17
1.1.2.1. La taxonomie.....	17
1.1.2.2. Les caractères biochimiques.....	19
1.1.3. Les caractères antigéniques.....	21
1.1.3.1. Les antigènes somatiques.....	21
1.1.3.2. Les antigènes flagellaires.....	21
1.1.3.3. Les antigènes Vi.....	22
1.2. L'HABITAT ET LES FACTEURS DE VIRULENCE.....	22
1.2.1. L'habitat.....	22
1.2.2. Les facteurs de virulence.....	23
1.2.2.1. La reconnaissance du pathogène.....	23
1.2.2.2. –La destruction du pathogène.....	25
1.3. LA RECHERCHE DE SALMONELLA.....	25
1.3.1. Les méthodes de mise en évidence directes : bactériologie et sérotypage.....	25
1.3.2. Le dénombrement par la méthode du nombre le plus probable (NPP).....	30
1.3.3. Les méthodes sérologiques.....	30
1.3.4. La caractérisation de Salmonella par des méthodes complémentaires, phénotypiques et génotypiques.....	31
1.3.4.1. –Par caractérisation phénotypique.....	31
1.3.4.2. Par caractérisation génotypique.....	34
<b>2. L'EPIDEMIOLOGIE DE SALMONELLA EN ELEVAGE AVICOLE DE POULET DE CHAIR.....</b>	<b>37</b>
2.1. LES SEROTYPES UBIQUISTES.....	37
2.2. LES SEROTYPES PROPRES AUX POULETS DE CHAIR DE L'ESPECE GALLUS GALLUS.....	37
2.3. L'EPIDEMIOLOGIE DE SALMONELLA DANS LA FILIERE POULET DE CHAIR.....	37
2.3.1. En élevage.....	37

2.3.1.1.	Les sources et modes de transmission en élevage .....	38
2.3.1.2.	La prévalence de Salmonella en élevage .....	41
2.3.1.3.	Les mesures de limitation de la contamination.....	43
2.3.1.4.	Les bases réglementaires .....	44
2.3.2.	<i>Les moyens de lutte contre les salmonelles au long des maillons de la chaîne de production.....</i>	47
2.3.2.1.	En élevage .....	47
2.3.2.2.	A l'abattoir et dans les ateliers de transformation .....	48
2.3.3.	<i>A l'abattoir .....</i>	48
2.3.3.1.	Les voies de contamination à l'abattoir.....	48
2.3.3.2.	La prévalence de Salmonella à l'abattoir.....	51
<b>3.</b>	<b>SALMONELLA, UN IMPACT MAJEUR EN SANTE PUBLIQUE.....</b>	<b>52</b>
3.1.	LES INFECTIONS A SALMONELLA .....	52
3.1.1.	<i>La prévalence humaine.....</i>	52
3.1.2.	<i>La pathogénicité.....</i>	53
3.1.3.	<i>Les produits avicoles responsables de toxi-infections alimentaires collectives.....</i>	53
3.1.4.	<i>Les symptômes chez l'homme .....</i>	53
3.1.5.	<i>Les diagnostics, les traitements et la prophylaxie.....</i>	54
3.1.6.	<i>Salmonella et antibio résistance .....</i>	54
3.2.	LES ENJEUX SANITAIRES .....	55
3.2.1.	<i>Les Toxi-infections alimentaires collectives.....</i>	55
3.2.1.1.	En France .....	55
3.2.1.2.	A la Réunion .....	58
3.2.2.	<i>Salmonella, un problème majeur persistant .....</i>	58
3.3.	LES ENJEUX ECONOMIQUES ET LES MOYENS DE SURVEILLANCE MIS EN PLACE EN FRANCE.....	60
3.3.1.	<i>Les enjeux économiques.....</i>	60
3.3.2.	<i>Les moyens de surveillance mis en place en France .....</i>	61
<b>4.</b>	<b>CAMPYLOBACTER SPP. ET CAMPYLOBACTERIOSE HUMAINE.....</b>	<b>62</b>
4.1.	GENERALITES .....	62
4.2.	BACTERIOLOGIE ET TAXONOMIE .....	62
4.3.	HABITAT ET RESERVOIR.....	62
4.4.	TRANSMISSION .....	63
4.5.	SYMPTOMES CHEZ L'HOMME.....	64
4.6.	DIAGNOSTIC, TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE.....	64
4.7.	SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES.....	64

4.8.	PRINCIPAUX CARACTERES BIOCHIMIQUES DES CAMPYLOBACTER .....	64
<b>5.</b>	<b>LA FILIERE AVICOLE REUNIONNAISE.....</b>	<b>65</b>
5.1.	LA FILIERE AVICOLE REUNIONNAISE DANS L'INDUSTRIE ET L'ECONOMIE LOCALE .....	65
5.2.	L'ORGANISATION DE LA FILIERE AVICOLE.....	65
5.2.1.	<i>L'historique de la filière avicole Réunionnaise.....</i>	65
5.2.2.	<i>En amont: la station d'accoupage Couvée d'Or et la coopérative Avi-pôle Réunion.....</i>	69
5.2.3.	<i>En aval : l'abattoir et les ateliers de transformation Crête d'Or Entreprise .....</i>	70
5.2.3.1.	Abattage réalisé en 2009 par Crête d'Or Entreprise et Segma.....	70
5.2.3.2.	Marché de la volaille de 2005 à 2009 .....	71
5.2.3.3.	Volume de vente par type de produits toutes espèces confondues de 2006 à 2009.....	72
***		
	<b>Travaux de recherche.....</b>	<b>73</b>
	<b>Introduction.....</b>	<b>74</b>
<b>1.</b>	<b>CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE DE SALMONELLA ENTERICA SUBSP. ENTERICA ET DE CAMPYLOBACTER SPP. DANS LES ELEVAGES DE POULETS DE CHAIR.....</b>	<b>77</b>
1.1.	EN PRODUCTION PRIMAIRE A L'ETAPE ELEVAGE .....	77
1.1.1.	<i>Résumé et conclusions de la publication 1 : prévalence et facteurs de risque de transmission de Salmonella enterica subsp. enterica dans les élevages de poulets de chair à la Réunion. ....</i>	80
1.1.2.	<i>Publication 1 : Prevalence and risk factor for the spreading of Salmonella enterica subsp. enterica infection in broiler chickens flocks in Reunion Island.....</i>	81
1.1.2.1.	Poster : Epidemiological analysis of Salmonella enterica subsp. enterica from chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean).....	105
1.1.3.	<i>Résumé et conclusion de la publication 2 : prévalence et facteurs de risque d'introduction de Campylobacter spp. dans les élevages de poulets de chair à la Réunion .....</i>	110
1.1.4.	<i>Publication 2: Prevalence and Risk factors for Campylobacter spp. in chicken broiler flocks on Reunion Island (Indian Ocean).....</i>	110
1.2.	DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE .....	131
1.2.1.	<i>De la méthodologie .....</i>	131
1.2.2.	<i>De la détermination des facteurs de risque.....</i>	132

**2. CHAPITRE 2 : INVESTIGATION EPIDEMIOLOGIQUE DE SALMONELLA A L'ABATTOIR..... 136**

2.1.1. *Résumé et conclusion de la publication 3 : Salmonella enterica subsp. enterica isolé de carcasses et de l'environnement d'abattoir sur une île tropicale (Ile de la Réunion, Océan Indien) : prévalence, caractérisation génétique et sensibilité aux antibiotiques » ..... 137*

2.1.2. *Publication 3: Salmonella enterica subsp. enterica from chicken carcasses and environment at slaughter in a tropical island (Reunion - Indian Ocean): prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility ..... 138*

2.2. DISCUSSION DE LA DEUXIEME PARTIE..... 155

2.2.1. *De la méthodologie ..... 155*

2.2.2. *Des résultats ..... 155*

**3. CHAPITRE 3 : DIVERSITE DES SOURCES INFECTIEUSES PAR SALMONELLA ET IMPACT SUR LA SANTE PUBLIQUE..... 159**

3.1. DIVERSITE DES SOURCES INFECTIEUSES..... 159

3.1.1. *Résumé et conclusion de la publication 4 : étude épidémiologique de Salmonella enterica subsp. enterica serovars Hadar, Blockley, Virchow et Weltevreden isolés de poulets, d'hommes et d'environnement par PFGE et par sensibilité aux antibiotiques à l'île de la Réunion (Océan Indien) »..... 160*

3.1.2. *Publication 4 : Epidemiological study of Salmonella enterica subsp. enterica serovars Hadar, Blockley, Virchow and Weltevreden from broiler chickens, humans and environment using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility in Reunion Island (Indian Ocean). ..... 161*

3.2. IMPACT SUR LA SANTE PUBLIQUE ..... 184

3.2.1. *Résumé et conclusion de la publication 5: caractérisation génétique et phénotypique de Salmonella enterica serovars Typhimurium et 1,4, [5],12: i:- émergeant à la Réunion (Océan Indien) : comparaison d'isolats de poulets, d'homme et d'environnement »..... 185*

3.2.2. *Publication 5 : Genetic and phenotypic characterization of Salmonella enterica serovars Typhimurium and 1,4,[5],12:i:-, emerging Salmonellas in Reunion island (Indian Ocean): comparison of isolates from broiler chickens, humans and the environment ..... 185*

3.2.2.1. *Poster : Epidemiological diversity of Salmonella enterica serovars from different sources in Reunion Island (Indian Ocean): focus on S. Typhimurium and S.1,4,[5],12:i:- ..... 207*

3.2.2.2. *Conference: Epidemiological investigation of Salmonella enterica subsp. enterica all along the food chain poultry production in tropical area: example of Reunion Island..... 212*

3.2.3. *Discussion de la troisième partie ..... 219*

**Conclusions et perspectives.....227**

**Références.....229**

**Annexes**

## Table des illustrations

FIGURE 1 : <i>SALMONELLA</i> , ( <a href="http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/827830">HTTP://FR.ACADEMIC.RU/DIC.NSF/FRWIKI/827830</a> ) .....	16
FIGURE 2 : PAROI D'UNE BACTERIE GRAM-NEGATIF ( <a href="http://www.ecosociosystemes.fr/cellule_bacterienne.html">HTTP://WWW.ECOSOCIOSYSTEMES.FR/CELLULE_BACTERIENNE.HTML</a> ) .....	16
FIGURE 3 : INTERACTIONS HOTE-PATHOGENE LORS DE LA RECONNAISSANCE DE <i>SALMONELLA</i> PAR LE SYSTEME PHAGOCYTAIRE .....	24
FIGURE 4 : RECHERCHE DES <i>SALMONELLA</i> , METHODE HORIZONTALE .....	28
FIGURE 5 : TESTS BIOCHIMIQUES APRES INOCULATION DE <i>SALMONELLA</i> . DE GAUCHE A DROITE : TEST DE HAJNA- KLIGGLER, CITRATE DE SIMMONS, MANNITOL MOBILITE, UREE, ONPG .....	29
FIGURE 6 : EXEMPLE D'AGGLUTINATION AVEC UN ANTISERUM O .....	33
FIGURE 7 : VOIES D'ENTREE DE <i>SALMONELLA</i> EN ELEVAGES (I.HENRY, DOCUMENT PERSONNEL) .....	38
FIGURE 8 : DOIGTS PLUMEURS, ABATTOIR COE (I.HENRY, 2008) .....	49
FIGURE 9 : EVISCEREUSE, ABATTOIR COE (I.HENRY, 2008) .....	50
FIGURE 10 : TABLES DE BRIDAGE, ABATTOIR COE (I.HENRY, 2008) .....	51
FIGURE 11 : BATIMENT DE TYPE « COLORADO » (I.HENRY, 2008) .....	69
FIGURE 12 : BATIMENT DE TYPE « LOUISIANE » (I.HENRY, 2008) .....	69
FIGURE 13 : BATIMENT DE TYPE « PEI », VUE D'INTERIEUR (I.HENRY, 2008) .....	69
FIGURE 14 : BATIMENT DE TYPE « PEI », VUE D'EXTERIEUR (I.HENRY, 2008) .....	69
FIGURE 15 : ORGANIGRAMME DE LA FILIERE AVICOLE .....	70
FIGURE 16 : REPARTITION DES VOLUMES PAR ESPECES EN 2009 (DONNEES PERSONNELLES).....	72
FIGURE 17 : COQ (I.HENRY, 2007) .....	73
FIGURE 18 : BATIMENT D'ELEVAGE DE POULETS DE CHAIR (I.HENRY, 2008) .....	82
FIGURE 19 : POULETS DE CHAIRS (I.HENRY, 2008).....	111
FIGURE 20 : CHAINE D'ABATTAGE A COE (I.HENRY, 2008) .....	139
FIGURE 21 : GEL OBTENU DE LA PFGE APRES REVELATION AUX UV (I.HENRY, 2009) .....	162

\*\*\*

TABLEAU 1 : CARACTERES BIOCHIMIQUES D'IDENTIFICATION DE <i>SALMONELLA</i> .....	19
TABLEAU 2 : CARACTERES BIOCHIMIQUES DES ESPECES ET SOUS ESPECES DU GENRE <i>SALMONELLA</i> ( <i>GRIMONT AND WEILL, 2007</i> ) .....	20
TABLEAU 3 : SEROTYPES ISOLES EN 2005 DANS LE SECTEUR SANTE ET PRODUCTIONS ANIAMLES EN FRANCE ( <i>MOURY F. ET AL., 2006</i> ).....	42
TABLEAU 4 : FOYERS, CAS ET DECES DECLARES AUX SERVICES SANITAIRES ENTRE 2006 ET 2008.....	57
TABLEAU 5 : ABATTAGE REALISE PAR CRETE D'OR ET SEGMA EN 2009, EN FONCTIONS DES ESPECES (DONNEES PERSONNELLES).....	71
TABLEAU 6 : LE MARCHE DE LA VOLAILLE REUNIONNAIS DE 2005 A 2009 (DONNEES PERSONNELLES).....	71
TABLEAU 7 : VOLUME DE VENTE PAR TYPE DE PRODUITS ET PAR ESPECES DE 2009 A 2009 (DONNEES PERSONNELLES).....	72



## Introduction

La viande de volailles est la seconde production animale en France après celle de porcs avec 1 850 000 tonnes produites en 2009. Malgré les crises de la dernière décennie et une production oscillant au gré des négociations internationales, la consommation de la viande de volaille a remplacé la viande de bœuf dans l'assiette du consommateur. La part de la volaille au sein de la consommation globale de viande a atteint 28% en 2009 (Pottier, 2010).

La production se contractualise de plus en plus pour réguler l'offre et la demande afin d'optimiser le potentiel des élevages. L'aviculture française est sortie des basses-cours dans les années 1960. Son essor s'est fait en corrélation avec les avancées techniques et scientifiques dans divers domaines. De plus l'automatisation des procédés dans les couvoirs et les abattoirs a apporté des gains dans la productivité. Depuis 1998, l'économie de la filière est affectée par les accords internationaux du GATT (General Agreement on Tariffs and Trade ou Accord général sur les tarifs douaniers et le commerce), puis de l'organisation mondiale du commerce (OMC), accords qui ont réduit, d'une part, les capacités d'exportation en réduisant les soutiens considérés comme des aides publiques et d'autre part ont ouvert les marchés européens aux importations des pays tiers. Malgré les progrès réalisés par la profession avicole française, celle-ci manque de perspectives dans ses marchés, freinés par des contraintes administratives en inadéquation avec la réalité.

Suite à la libéralisation des échanges souhaitant une importation des marchandises en provenance des pays tiers à hauteur de 5% de la consommation, il se trouve que la barre des 10% pour la volaille a été dépassée en quelques années, entraînant une concurrence débridée de viandes venues de « nulle part ». L'importation des viandes de volailles provient de l'UE à hauteur de 90% essentiellement de Belgique, de Pays-Bas, du Royaume Uni et d'Allemagne. Or, il se pourrait que l'origine soit plus lointaine car ces partenaires Européens sont les principaux importateurs des pays tiers. La concurrence étrangère est de plus en plus marquée, et de ce fait, le marché français rencontre des difficultés face à cette compétition accrue.

Les normes européennes sont parmi les plus draconiennes au monde mais elles ne sont pas appliquées de manière identique dans tous les pays tiers autorisés à exporter vers l'UE. Le problème est d'autant plus préoccupant quant à la politique de prévention de lutte contre les

salmonelles : en Europe, l'éradication est menée sur les lots positifs alors que dans les pays tiers elle se résume le plus souvent au traitement par des antibiotiques des lots contaminés.

La législation européenne concernant les additifs (antibiotiques et autres produits utilisés comme facteurs de croissance), dans l'alimentation animale, est très stricte. La surveillance des agents zoonotiques s'est durcie au fil des ans. Les résultats des différentes enquêtes de prévalence témoignent des efforts menés par les filières avicoles pour diminuer l'incidence de salmonelles d'origine aviaire dans leur implication dans les foyers de TIAC en France. Cependant les produits avicoles restent souvent incriminés dans les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* et *Campylobacter* aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Ces deux bactéries sont à elles seules responsables de plus de 90% des déclarations des toxi-infections alimentaires dans le monde. Malheureusement, l'impact de ces bactéries sur les sujets immunodéprimés, les personnes âgées et les malades atteints du Sida prend une importance accrue.

Le portage de ces bactéries est souvent asymptomatique chez les volailles et elles tendent à se disperser dans l'environnement au cours des opérations d'abattage. La réduction du risque d'avoir des produits contaminés passe par une meilleure maîtrise de ces bactéries pathogènes tout au long de la chaîne de production, de « la fourche à la fourchette ».

A la Réunion, *Salmonella* est présente dans les élevages avicoles depuis de nombreuses années, malgré les efforts menés par les professionnels pour lutter contre *Salmonella*. Face à cette réalité, une demande émanant de la filière avicole a été effectuée afin qu'un travail épidémiologique de fond soit réalisé pour apporter des éléments de réponses et diminuer la présence de *Salmonella* en élevages.

La première partie de mon travail s'est attachée à faire un état des lieux sur l'épidémiologie de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair à la Réunion. Dans les parties suivantes seule l'étude de *Salmonella* a été investiguée.

La seconde partie a évalué le risque de contamination par *Salmonella* à l'abattoir et a souligné la diversité de souches présentes tout au long du « process » d'abattage.

La troisième partie quant à elle s'est attardée à démontrer l'impact de *Salmonella* sur la santé publique en mettant en exergue *S. Typhimurium* et en soulignant les dangers indirects provoqués par *Salmonella* par rapport à la résistance aux antibiotiques.

Ces différents travaux ont été réalisés dans plusieurs laboratoires. J'ai ainsi pu réaliser les enquêtes de terrain à la Réunion ; les travaux de bactériologie au Cirad de la Bretagne à St Denis ; les analyses de biologie moléculaire et de sérotypage à l'AFSSA de Ploufragan et les analyses de résistance aux antibiotiques à l'AFSSA de Maisons-Alfort.

Ces travaux seront exposés sous forme d'articles soumis à publication ou ayant fait l'objet de présentation sous forme de posters et de conférence lors de congrès internationaux.

Une synthèse bibliographique présentera les caractéristiques générales de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* et de *Campylobacter* spp., leur épidémiologie ainsi que l'importance de *Salmonella* en santé publique. Une brève description de la filière avicole réunionnaise permettra, en outre, d'éclairer le lecteur sur les conditions de production des poulets de chair dans la zone Océan Indien.

## Synthèse Bibliographique

### 1. Les Salmonelles

C'est en 1885 que Theobald Smith sous la direction du Dr. Daniel Elmer Salmon pense découvrir l'agent causal du choléra en travaillant sur l'efficacité d'un vaccin bactérien chez le porc. Il s'agissait en fait d'une nouvelle espèce bactérienne (Tribute, 1981), baptisée peu après *Salmonella*.

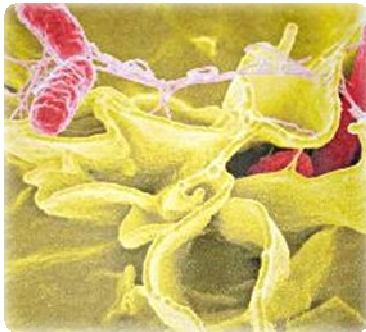


Figure 1 : *Salmonella*,  
(<http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/827830>)

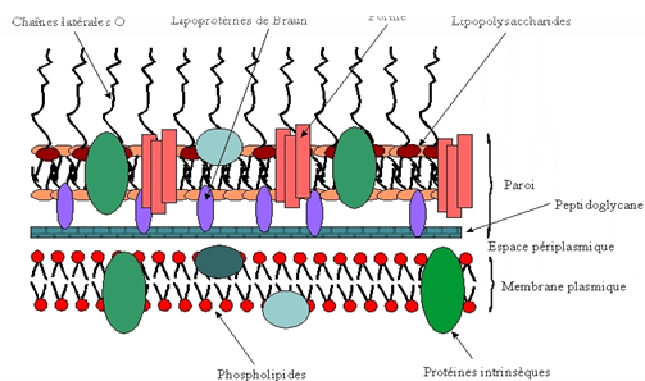


Figure 2 : Paroi d'une bactérie Gram-négatif  
([http://www.ecosociosystemes.fr/cellule\\_bacterienne.html](http://www.ecosociosystemes.fr/cellule_bacterienne.html))

#### 1.1. Caractéristiques générales

##### 1.1.1. Morphologie

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des entérobactéries, du genre *Salmonella* (Hofstad et al., 1992), ce sont des bacilles droits à gram négatif (Figure 1), mesurant environ 3  $\mu\text{m}$  de long sur 0.6-0.7  $\mu\text{m}$  de diamètre, souvent mobiles, poussant sur des milieux ordinaires, aéro-anaérobies (Kabir, 2010). La paroi de ces bactéries (Figure 2) est caractérisée par un fin peptidoglycane entouré d'une membrane périplasmique et d'une membrane externe. La membrane externe est en contact direct avec le milieu extérieur et porte une partie des caractéristiques antigéniques de la bactérie. Elle est aussi impliquée dans les phénomènes de virulence. Cette membrane contient notamment le lipopolysaccharide (LPS) dont la région

hydrophyle, en contact avec le milieu extérieur, correspond à la région antigénique « O ». Les flagelles dont sont dotées la plupart des salmonelles, sauf *S. Gallinarum*, sont constitués d'un assemblage quaternaire de plusieurs milliers de copies d'une protéine unique, la « flagelline », et correspondent à la région antigénique « H ».

### 1.1.2. La taxonomie et les caractères biochimiques

#### 1.1.2.1. La taxonomie

Le genre *Salmonella* était initialement divisé en quatre sous-genre, selon Kaufmann, basé sur des caractères biochimiques (dulcitol, lactose, orthonitrophényl-â D galactopyranoside, salicine, gélatine, malonate, d-tartrate et KCN) (Gledel, 1996).

Cependant, selon Le Minor et Kaufmann- White, le genre *Salmonella* ne comprendrait que deux espèces : *S. enterica* et *S. bongori* (Tindall et al., 2005).

*Salmonella enterica* est ainsi divisée en 6 sous-espèces comme résumé ci-dessous :

**Famille** : Enterobacteriaceae

**Genre** : *Salmonella*

**Espèce** : *enterica*

**Sous espèce** : *enterica*

**Sérotype** (=sérovar) : Enteritidis, Hadar, Virchow, Infantis, Typhimurium...

**Sous espèce** : *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*

**Espèce** : *bongori*

*Salmonella enterica* comprend 2257 sérovars et *Salmonella bongori*, 22 sérovars pour un total de 2579 sérovars pour les deux espèces. Le terme sérovar (également appelé sérotype) désigne une propriété antigénique permettant d'identifier une cellule (bactéries, RBC, etc.) ou un virus par des méthodes sérologiques. Autrement dit, c'est le nom donné à la variété sérologique correspondant à une espèce (bactérie, virus.) et la manière de nommer les subdivisions taxonomiques sur la base des caractéristiques de leurs antigènes ou protéines. Les 6 sous-espèces et le nombre de sérovars associés sont décrits ci-dessous :

- <i>S.enterica</i> :	<b>2557</b>
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1531
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73
- <i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
- <i>S.bongori</i> :	<b>22</b>
- <b>Total :</b>	<b>2579</b>

Ainsi, avant que la taxonomie ne soit établie sur des bases scientifiques, les sous-espèces étaient des sous genres et les sérovars considérés comme des espèces. On avait ainsi les sous-genres I (*S. enterica* subsp. *enterica*), II (*S. enterica* subsp. *salamae*), III (ancien genre *Arizona* ; subdivisé en IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*, et IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), V (*S. bongori*), et VI (*S. enterica* subsp. *indica*).

Certains noms indiquaient soit un syndrome (ex. *S. typhi*), une parenté (*S. paratyphi* A, B, C), un syndrome et une spécificité d'hôte dont la réalité a été confirmée dans certains cas (*S. abortusovis*, *S. abortus-equi*) alors que dans d'autres cas elle s'est avérée erronée (*S. typhimurium*, *S. cholerae-suis*). Par la suite afin d'éviter des erreurs de compréhension, l'origine géographique fut donnée aux noms des nouveaux sérovars (*S.london*, *S. panama*, *S. tel-el-kebir*).

En 1968, il a été décidé au Congrès International de Microbiologie de Moscou (*Int.J. Syst. Bacteriol.*, 1968, 18, 191-196), que les noms composés seraient désormais condensés en noms simples (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. telelkebir*). En pratique, pour *S. enterica* subsp. *enterica*, le nom de la sous-espèce (subsp. *enterica*) peut ne pas être mentionné parce que seuls les sérovars de la sous-espèce *enterica* ont un nom. Les sérovars des autres sous-espèces de *S. enterica* et ceux de *S. bongori* sont désignés uniquement par leur formule

antigénique. On aura donc, par exemple, *S. enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, ou *S. enterica* sérovar Typhimurium, ou *Salmonella* ser. Typhimurium.

#### 1.1.2.2. Les caractères biochimiques

Les *Salmonella* réduisent les nitrates en nitrites, dégradent les glucides par métabolisme fermentatif, utilisent le citrate comme seule source de carbone, fermentent le glucose mais pas le lactose ni le sucrose et produisent du gaz à partir du glucose (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'identification de *Salmonella*

Milieux	Caractères biochimiques	<i>Salmonella</i> typhiques	<i>Salmonella</i> non typhiques	
			<i>S. Typhi</i>	<i>S. Paratyphi</i>
Milieu Hajna-Kligler	Glucose	+	+	+
	Gaz	+	-	
	H <sub>2</sub> S	+	+ (faible)	-
	Lactose	+/-	-	
Milieu Urée-Indole	Uréase	-	-	
	Indole	-	-	
Milieu glycérol	Glycérol	-	-	
Milieu LDC	LDC	+	+	

Cependant, de nombreuses souches sont gazogènes et produisent du H<sub>2</sub>S mais certains sérovares ne produisent jamais de gaz tels que Typhi et Pullorum-gallinarum. Il en va de même pour ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>S comme Paratyphi

Les *Salmonella* n'utilisent pas de lactose sauf pour *Arizonae* et les souches atypiques possèdent certains enzymes, n'ont pas de bêta-galactosidase sauf pour *Arizonae*. Elles n'ont

pas non plus d'uréase, fermentent le mannitol, sont catalase positive et la réaction au test à l'oxydase est toujours négative (Hanes D., 2003).

Tableau 2 : Caractères biochimiques des espèces et sous espèces du genre *Salmonella* (Grimont and Weill, 2007)

Espèce	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	enterica	salamae	arizonae	diarizonae	houtenae	indica	
Sous -espèce							
Caracères							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-d-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransférase	+	+	-	+	+	+	+
β- glucuronidase	d	d	-	+	-		-
Mucate	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	- (75%)	+	-	d	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	d

(\*) : Typhimurium d, Dublin -

d : résultats différents suivant les sérovars

+ : 90% ou plus de résultats positifs

- : 90% ou plus de résultats négatifs



### 1.1.3. Les caractères antigéniques

Les antigènes « O » somatiques et « H » flagellaires constituent la base de l'identification du sérotype.

#### 1.1.3.1. Les antigènes somatiques

L'antigène somatique est constitué de polysaccharide, de protéine et de phospholipide. L'antigène O peut résister à des températures supérieures à 100°C pendant 2h et demi, à de l'éthanol à 95% mais aussi à de l'acide dilué. Le résultat de cet antigène et de son anticorps associé est une forme granulaire. Les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne représentent les antigènes « O » et constituent l'endotoxine de la bactérie. Ainsi la perte de cette région résulte en une perte de la virulence.

#### 1.1.3.2. Les antigènes flagellaires

Les flagelles représentent les antigènes « H » et sont constitués de protéines appelées flagellines.

Cet antigène est localisé sur le flagelle et le principal composant est une protéine. Il peut être facilement dégradé par de l'alcool, de l'acide et une température supérieure à 60°C. Les flagelles représentent les antigènes « H » et sont constitués de protéines appelées flagellines. La majorité des sérovars élabore deux types de flagelles (antigène dit diphasique) alors que certains n'en fabriquent qu'un seul type (antigène dit monophasique). De nombreuses *Salmonella* possèdent deux phases de l'antigène flagellaire H mais il existe également des variants monophasiques et triphasiques. La première phase est nommée la phase spécifique et la seconde, la non spécifique. La première phase est indiquée par une lettre de « a à z ». Cependant de nouveaux antigènes H ont été découverts et sont nommés de la lettre a,.....,z1.....,z91.

Ci après quelques exemples de sérotypes monophasiques connus à ce jour :

-*Salmonella* Derby

-*Salmonella* Typhi

-*Salmonella* Enteritidis

-*Salmonella* Dublin

-*Salmonella* Paratyphi

#### 1.1.3.3. Les antigènes Vi

C'est un antigène de surface, de nature polysaccharidique, capsulaire et peuvent masquer les antigènes O. Les antigènes d'enveloppe ou capsulaires représentent les antigènes « K ». Ces antigènes interviennent dans le phénomène de phagocytose et dans l'activité bactéricide des anticorps. De ce fait, la bactérie ne pourra pas agglutiner avec les antisérums O. Le principal composant de l'antigène Vi est un polysaccharide. Ils ont peu d'intérêt diagnostique. Les *Salmonella* qui possèdent un antigène Vi sont davantage pathogènes que les souches qui n'en possèdent pas. Cet antigène Vi apparaît dans les sérovars suivants uniquement :

-*Salmonella* Typhi

-*Salmonella* Paratyphi

## 1.2. L'habitat et les facteurs de virulence

### 1.2.1. L'habitat

Les salmonelles sont des bactéries du tube digestif des vertébrés. Elles sont essentiellement répandues dans le milieu extérieur à partir des excréta. Lorsque les conditions de milieu sont favorables (température et humidité) les salmonelles peuvent survivre plusieurs mois dans l'environnement ( Findlay, 1972; Danyluk et al., 2008; Pedersen et al., 2008). La sous-espèce *enterica* est adaptée aux animaux à sang chaud dont l'homme. Les autres sous-espèces sont quant à elles retrouvées chez des animaux à sang froid comme les reptiles, les batraciens ou les tortues (Grimont et al, 1994).

Dans de nombreux cas, les animaux sont considérés comme des porteurs asymptomatiques. Cependant, dans d'autres cas, certains d'entre eux peuvent présenter des signes cliniques plus ou moins sévères.

Les salmonelles sont ubiquitaires, non sporulées, pouvant être isolées de nombreuses niches écologiques et sont capables de résister à plusieurs stress environnementaux. Ce sont des germes mésophiles (température optimale de croissance entre 35°C et 37°C), aéro-

anaérobies facultatives avec de faibles exigences culturelles. Elles survivent à des pH variant entre 4,1 et 9 avec un optimum entre 6,5 et 7,5 (Borch et al., 1996). La croissance est possible pour des activités de l'eau (aw) de 0,95. De ce fait, la viande et les produits carnés constituent d'excellents milieux pour la croissance de *Salmonella* spp. Mais cette bactérie reste relativement sensible à la chaleur même si certains stress semblent pouvoir augmenter sa thermo-résistance (Humphrey et al., 1997).

### 1.2.2. Les facteurs de virulence

#### 1.2.2.1. *La reconnaissance du pathogène*

Les infections à *Salmonella* empruntent généralement la voie digestive. Chez la souris, les salmonelles provoquent une maladie systémique accompagnée de symptômes semblables à ceux de la fièvre typhoïde chez l'homme, et ce indépendamment de la voie d'infection. Classiquement, la cinétique d'infection chez la souris se caractérise par quatre phases :

la première phase se traduit par l'élimination rapide des bactéries sériques. Durant la semaine suivant l'infection, *Salmonella* se réplique activement au sein des cellules phagocytaires. Cette phase précède une phase en plateau caractérisée par la mise en place de la reconnaissance de PAMP (pathogen-associated molecular pattern, des motifs moléculaires spécifiques de certains pathogènes) par les cellules de la lignée phagocytaire mononucléée. Il en résulte la production de nombreuses cytokines (tumor necrosis factor alpha, interleukines 1, 6 et 12, interféron gamma) et une infiltration massive de monocytes et de polynucléaires neutrophiles dans les sites inflammatoires. À la quatrième phase de l'infection s'installe la défense inflammatoire dite acquise, c'est-à-dire faisant intervenir les cellules T et B, ainsi que les facteurs humoraux qui en découlent.

Par ailleurs, des analyses synoptiques offrent un panorama complet des gènes de virulence de *Salmonella*, lesquels, exprimés par les pathogènes invasifs, leur confèrent un mode de résistance spécifique contre les mécanismes de défense innée (Gruenheid and Finlay, 2003).

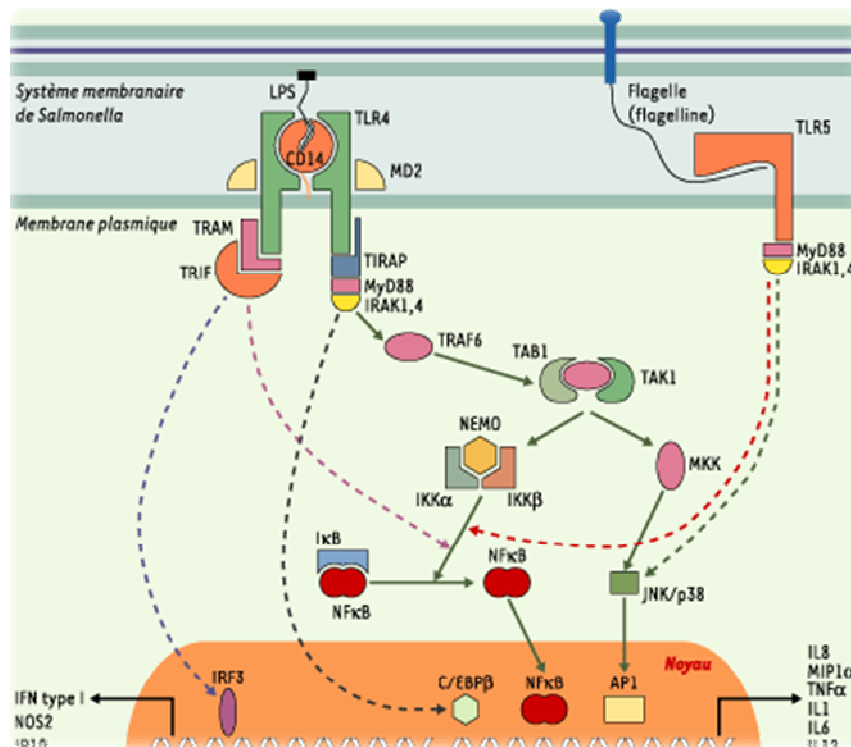


Figure 2 : Interactions hôte-pathogène lors de la reconnaissance de *Salmonella* par le système phagocytaire

(Salez and Malo, 2004).

L'activation non spécifique par *Salmonella* est déclenchée par la fixation du LPS au CD14, en coopération avec la protéine TLR4 (Toll-like receptor 4) et MD2 (Figure 2). Une première voie fait intervenir deux protéines adaptatrices, MyD88 et TIRAP (Beutler et al., 2003), capables de mobiliser la voie de signalisation dépendante des protéines IRAK4, TRAF6, TAB1 et TAK1, mais également des MAP kinases (MKK, MAP kinase kinase) et de la protéine p38. Cette cascade d'activations moléculaires, notamment par le biais du complexe moléculaire NEMO/ IKKalpha/IKKbêta, induit la dégradation de IκappaB, la translocation de NFkappaB vers le noyau et l'activation d'AP1 menant à l'activation transcriptionnelle de certains gènes codant pour des cytokines inflammatoires, telles que le TNFalpha, l'IL1, l'IL8, l'IL6, l'IL12 ou encore MIP1alpha. Indépendamment de TRAF6, le facteur de transcription C/EBPbêta (ou NFIL6) semble être mobilisé lors de l'activation de cette voie (MyD88), par une voie de signalisation encore mal décrite, et permet notamment la production de prostaglandine E2 (Uematsu et al., 2002). L'autre voie empruntée lors de l'activation du récepteur TLR4 fait intervenir une voie indépendante de MyD88 où interviennent deux autres protéines adaptatrices, TRAM et TRIF (Yamamoto et al., 2002). AP1 : adaptor protein

complex ; C/EBPbêta : CCAAT/enhancer-binding protein bêta ; CD14 : cluster de différenciation ; IFN : interféron ; IKK : inhibitor of kappaB kinase ; IL : interleukine ; IP10 : interferon inducible protein 10 ; IRAK : interleukin 1 receptor-associated kinase ; IRF3 : interferon regulatory factor 3 ; IkappaB : inhibitor of nuclear factor kappaB ; LPS : lipopolysaccharide ; MIP1alpha : macrophage inflammatory protein 1 alpha ; MKK : MAP kinase kinase ; MyD88 : myeloid differentiation factor 88 ; NEMO : nuclear factor kappaB essential modifier ; NFkappaB : nuclear factor kappaB. TAB : transforming growth factor bêta-activated protein kinase-binding protein ; TAK : transforming growth factor-bêta-associated kinase ; TIRAP : Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein ; TLR : Toll like receptor ; TNFalpha : tumor necrosis factor alpha ; TRAF : tumor necrosis factor receptor associated factor ; TRAM : TRIF-related adapter molecule ; TRIF : Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon bêta.

#### 1.2.2.2. La destruction du pathogène

Pendant la phagocytose, des vésicules d'endocytose particulières contenant *Salmonella* (SCV, *Salmonella*-containing vesicle) permettent aux pathogènes de survivre et de se répliquer. La fusion de tels compartiments avec les endosomes est habituellement rapide (quelques minutes), mais, grâce à la machinerie d'évitement de *Salmonella*, la fusion avec les endosomes tardifs s'effectue avec plusieurs heures de retard (Brumell et al., 2002). Ces endosomes contiennent de nombreuses enzymes, à l'origine notamment de la destruction des composants microbiens (Jabado et al., 2000).

### 1.3. La recherche de *Salmonella*

#### 1.3.1. Les méthodes de mise en évidence directes : bactériologie et sérotypage

Les méthodes de recherche de *Salmonella* sont essentiellement qualitatives et elles sont basées sur la détection d'un petit nombre de bactéries parmi une flore bactérienne majoritaire. La détection de *Salmonella* est réalisée à partir d'échantillons de l'environnement ou de prélèvements d'origine alimentaire. En général, quatre phases sont nécessaires pour la recherche de *Salmonella* spp. (Figure 3). Ces étapes sont le pré-enrichissement,

l'enrichissement sélectif, l'isolement sélectif et l'identification. Cependant avec ce type de méthodes, les résultats confirmés ne sont obtenus qu'au bout de 6 à 7 jours. Différentes normes internationales (ISO) et nationales (AFNOR) existent selon la détection de *Salmonella* spp. dans les matières fécales des animaux et les échantillons environnementaux (NF EN ISO 6579/A1).

Les étapes de recherche de *Salmonella* sont les suivantes :

#### **-Le pré-enrichissement**

La recherche s'effectue généralement sur une prise d'essai de 25 grammes de fèces par exemple. L'échantillon est ensuite dilué au dixième dans une solution d'eau peptonée tamponnée. Après homogénéisation l'échantillon est incubé pendant 18h-24h à 37°C.

#### **-L'enrichissement**

Un volume variable du milieu de pré-enrichissement est prélevé puis incorporé dans les milieux sélectifs liquides, puis incubés pendant 24h à des températures différentes en fonction du milieu. Ces milieux sont à base de tétrathionate (milieu de Muller Kauffmann), de sélénite ou de vert de malachite additionné de chlorure de magnésium (milieu de Rappaport Vassiliadis). La novobiocine y est ajoutée afin d'améliorer la sélectivité par inhibition des *Proteus* spp. La supériorité du milieu Rappaport Vassiliadis par rapport au milieu de Muller Kauffmann a été mise en évidence pour certaines souches atypiques de *Salmonella* (*S. Gallinarum*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*) (Blivet et al., 1997). L'utilisation de deux milieux d'enrichissement augmenterait aussi la mise en évidence de salmonelles dans les prélèvements issus de l'environnement de volailles (Voogt et al., 2001). Le milieu modifié semi-solide de Rappaport Vassiliadis (milieu MSR/V) a également démontré des propriétés intéressantes avec une détection sensible des salmonelles (Worcmannbarninka et al., 2001).

#### **-L'isolement**

A partir du milieu d'enrichissement et à l'aide d'une öse, une quantité du milieu est prélevée puis isolée sur des milieux sélectifs. Ces milieux sont ensuite incubés pendant 18 à 24h. Ces milieux contiennent des agents sélectifs (sels biliaires, colorants...) et des agents de différenciation des colonies : des sucres (xylose, saccharose, lactose), des indicateurs de pH ainsi que des sels révélateurs de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).

Par exemple, le milieu XLD est composé de désoxycholate de sodium (0.25%) qui inhibe la plupart des bactéries Gram positif. Son caractère différentiel est assuré par plusieurs

ingrédients : le thiosulfate de sodium, des sucres (le lactose, le xylose et le sucrose) et la lysine. Lorsque les bactéries possèdent l'enzyme spécifique, le thiosulfate de sodium est réduit en sulfure d'hydrogène (gaz) qui réagit avec les ions ferriques du citrate ferrique, qui produit un centre noir sur la colonie. Les bactéries qui ne possèdent pas les enzymes nécessaires à la dégradation des sucres de ce milieu pourront dégrader soit la lysine, soit des sources de carbone provenant de l'extrait de levures. La dégradation des sources de carbone provenant de l'extrait de levures donnera des colonies transparentes.

Le milieu de Rambach est basé sur deux caractères principaux de *Salmonella* spp. : la formation d'acides à partir du propylène-glycol et l'absence de  $\beta$ -galactosidase. Sur ce milieu de couleur rose, les colonies apparaissent rose fuschia à rouge foncé si elles sont ONPG-hydrolase négatives. Pour certaines souches comme *arizonae* et *diarizonae* (ONPG+) et *bongori*, les colonies sont de couleurs variable et atypique (Kuhn et al., 1994). Cette information est importante lorsque les recherches s'effectuent dans la filière dinde où ces sous-espèces sont souvent isolées. L'association de plusieurs milieux d'isolement augmente la sensibilité de détection de *Salmonella*.

Les colonies isolées et présumées être des *Salmonella* sont ensuite confirmées par des tests biochimiques ou par des kits de vérification (rapid one de Biorad, galerie API20E de Biomérieux)

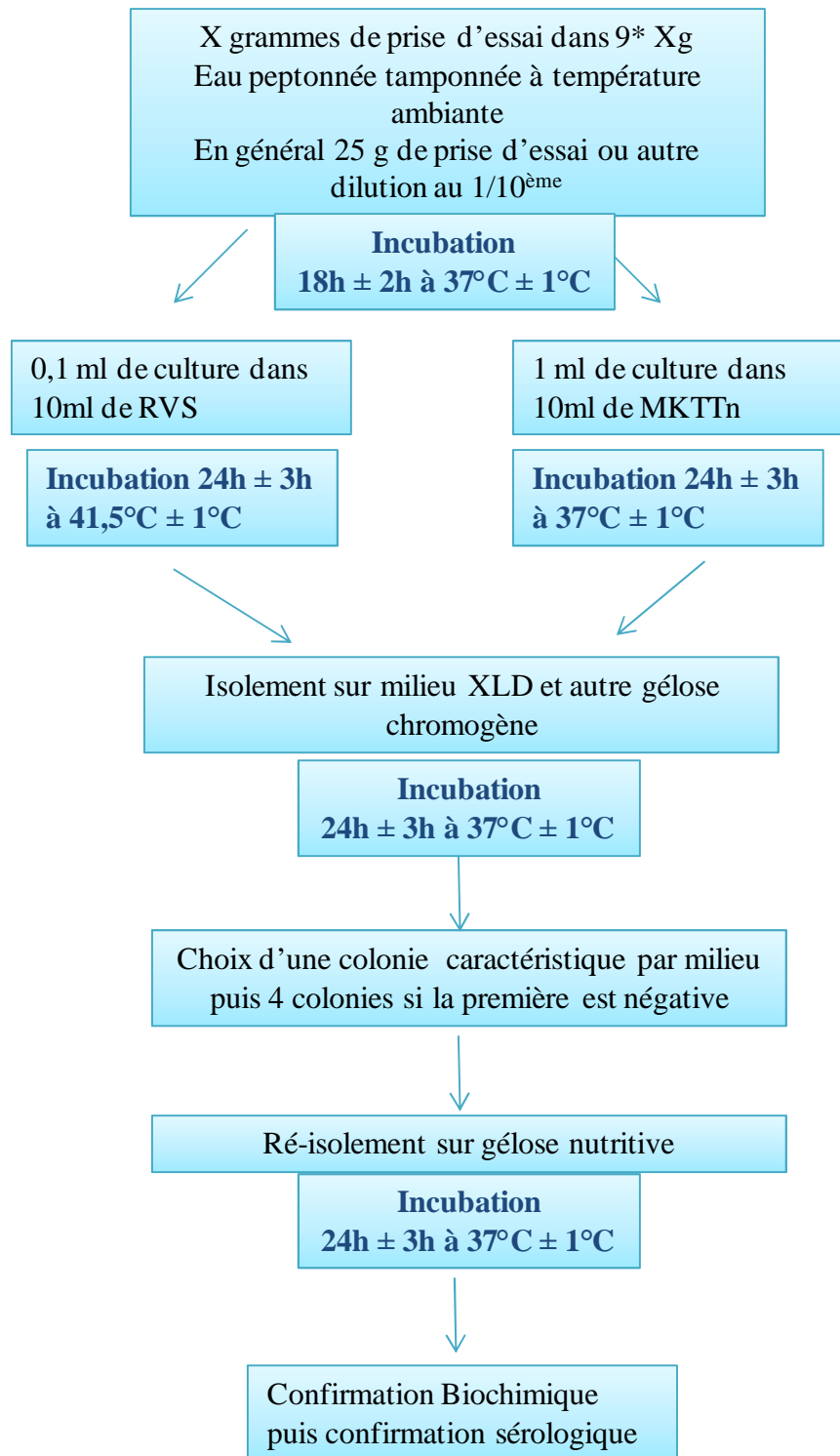


Figure 3 : Recherche des *Salmonella*, méthode horizontale

Les tests classiques utilisés pour l'identification des salmonelles utilisent (Figure 6) :

-le milieu urée-indole : il sert à la recherche de l'indole, produit du métabolisme du tryptophane. Ce milieu est aussi utilisé pour la recherche d'une uréase bactérienne (uréase -, indole -).



-le milieu *Kligler-Hajna* : milieu d'identification utilisé pour les bactéries utilisant le glucose et contenant 1% de lactose, 0,1 % de glucose, de l'hyposulfite de sodium, du rouge de phénol. Il est fondu et coulé moitié pente, moitié culot. Le milieu Kligler-Hajna permet la mise en évidence de la fermentation du glucose, du catabolisme du lactose et de la production de gaz (sulfure d'hydrogène).

-le test de l'*ONPG* (Orthonitrophényl-Galactopyranoside) met en évidence l'activité  $\beta$  galactosidase. ( $\beta$  galactosidase -)

-le milieu *Mannitol – Mobilité*, gélose semi-solide. Ce milieu sert à l'étude de la mobilité des bactéries et de la dégradation du mannitol.

-le milieu de *Simmons* : c'est un milieu gélosé à base de citrate, coulé en longue pente en tube, coloré en vert par le bleu de bromothymol à pH7. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate peuvent cultiver sur ce milieu en l'alcalinisant. Cette alcalinisation se traduit par un virage au bleu du milieu.

- le milieu *Lysine* : il permet la mise en évidence de la lysine décarboxylase (Lysine +).



Figure 4 : Tests biochimiques après inoculation de *Salmonella*. De gauche à droite : test de Hajna-Kligler, citrate de Simmons, Mannitol Mobilité, Urée, ONPG

### **-Identification : détermination du sérotype**

Après confirmation biochimique, les souches isolées sont sérotypées suivant le schéma de Kauffmann-White (Grimont and Weill, 2007; Popoff and Le Minor, 1992). Le sérotypage est réalisé à partir d'un mélange de sérums agglutinants polyvalents anti « O » et anti « H ». L'identification complète est faite à l'aide de sérums monovalents.

Pour un aperçu historique, la première publication du schéma de Kauffmann-White (*Salmonella* Subcommittee, 1934, J. Hyg. 34 :333-350) contenait 44 sérovars. Au départ en retraite de F. Kauffmann en 1964, le schéma comprenait 958 sérovars. L. Le Minor a publié un supplément annuel dans les Annales de l'Institut Pasteur devenues Research in Microbiology. Au départ de L. Le Minor, il y avait 2267 sérovars et au départ de M.Y. Popoff, 2555. L. Le Minor ayant décrit la majorité des sérovars actuels, le schéma des formules antigéniques fut appelé (antérieurement " Schéma de Kauffmann-White ") schéma de White- Kauffmann-Le Minor.

### 1.3.2. Le dénombrement par la méthode du nombre le plus probable (NPP)

La méthode du nombre le plus probable est basée sur la méthode statistique du maximum de vraisemblance. Cette technique est coûteuse en temps et assez laborieuse à mettre en place.

### 1.3.3. Les méthodes sérologiques

Le diagnostic indirect par voie sérologique est possible que si la souche présente un caractère invasif pour l'hôte considéré. L'infection par voie orale engendre la production d'anticorps, principalement des IgG pour certains sérotypes tels que *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium. Il est alors possible de détecter les anticorps par une technique d'agglutination ou de test Elisa indirect et par l'Elisa par compétition de type sandwich. Le manque de spécificité des tests Elisa associant plusieurs sérotypes a été mis en cause en réagissant par des réactions croisées avec d'autres entérobactéries. Les IgA bien que présents dans la bile, ne sont pas utilisés en diagnostic (Barrow, 1994).

1.3.4. La caractérisation de *Salmonella* par des méthodes complémentaires, phénotypiques et génotypiques

1.3.4.1. Par caractérisation phénotypique

Les techniques phénotypiques étudient les propriétés exprimées par les bactéries et permettent la caractérisation des isolats. Il existe, entre autre, le sérotypage, le lysotypage, le biotypage et le profil de résistance aux antimicrobiens.

La biotypie

La biotypie repose sur la mise en évidence des caractères biochimiques différentiels qui classeront les souches selon leur activité métabolique par l'utilisation de sucre et/ou leur activité enzymatique. La biotypie peut être utilisée comme système d'alerte ou de surveillance pour repérer une souche lorsque ce caractère est inhabituel comme pour le cas de salmonelles présentant une fermentation du lactose ou du saccharose ou ne produisant pas d'H<sub>2</sub>S, caractères qui sont inhabituels pour les salmonelles. Pour le sérotype Typhimurium, plusieurs schémas de biotypie ont été proposés mais restent peu utilisés en pratique (Cordano et al., 1971).

Cette technique, basée sur l'étude des caractères biochimiques, a été développée, il y a très longtemps, pour permettre une discrimination entre les souches du sérovar Typhimurium (Kristensen *et al.*, 1937 cités par Alfredson *et al.*, 1972). Le pouvoir discriminant de la technique est relatif au nombre de marqueurs disponibles ainsi que de l'espèce. Six sous espèces ont ainsi été définies au sein de l'espèce *Salmonella*. Malgré quelques développements récents (Baggesen et al., 1996), le biotypage n'a pas pu s'imposer comme une méthode fiable et reproductible de discrimination, à l'intérieur des principaux sérovars de *Salmonella*.

La lysotypie

Cette technique est basée sur l'étude de la sensibilité ou de la résistance d'une souche à une série de bactériophages sélectionnés. De nombreux systèmes ont été élaborés visant à étudier des souches appartenant à des sérotypes d'intérêt majeur soit par leur fréquence d'isolement (Typhimurium, Enteritidis) soit par leur pathogénicité (Typhi). Selon le sérotype,

le nombre de bactériophages utilisés ainsi que le nombre de lysotypes différents identifiés sont très variables. *Salmonella* Typhimurium est très polymorphe avec 211 lysotypes différents ( Callow, 1959; Anderson et al., 1977) alors que seulement 27 lysotypes différents ont pu être identifiés chez *Salmonella* Enteritidis (Ward et al., 1987).

Ce système d'étude présente des limites :

- Des souches ne sont pas lysées par les phages de référence et sont donc considérés comme non typables ;
- Des souches peuvent présenter des profils de lyse différents de ceux décrits et sont enregistrées sous l'appellation RDNC (Routine Dilution No Conformity)
- Des souches peuvent également être infectées par d'autres phages et présenter des plages de lyse en l'absence de toute application des suspensions phagiques de référence, et sont enregistrées PI (Phage Infected).

#### -Le profil de résistance aux antibiotiques

L'antibiotypie est davantage utilisée dans un but de traitement thérapeutique qu'en épidémiologie. L'étude des caractères de résistance donne la possibilité de suivre certains clones de *Salmonella*. C'est par exemple le cas pour *Salmonella* Typhimurium, lysotype DT104 qui présente généralement une multi-résistance associée à cinq antibiotiques : ampicilline, chloramphenicol, streptomycine, sulfonamides et tétracycline. Les antibiogrammes peuvent suivre les recommandations du CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) ou du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2008). Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser celles du CLSI.

#### -Le sérotypage

Quelques étapes sont toutefois nécessaires avant de commencer le sérotypage, les principales sont énumérées ci-après :

- 1-Vérifier que les souches en question ont bien les caractères biochimiques caractéristiques de *Salmonella*.

2-Vérifier si la souche n'est pas auto agglutinable avec de l'eau physiologique. Si c'est le cas, il faut s'arrêter là et ne pas entreprendre les analyses de sérotypage.

3- Sélectionnez un isolat pur confirmé être *Salmonella* spp. d'après les tests biochimiques réalisés précédemment. Remettre cet isolat sur une gélose nutritive et une fois inoculée, incubez à 37°C+ ou - 1°C pendant 18h + ou - 3 heures.

4- Commencer les étapes de réaction antigène (Salmonella)- anticorps (antiserum O) :

→Agglutination avec les antisérums O :

Le principe est de mélanger sur une plaque multi-cupules les antigènes somatiques prélevés dans la gélose nutritive préalablementensemencée et de tester les antisérums. La présence de « granules » témoigne d'une agglutination et donc d'une réaction positive. Généralement on observe une agglutination en moins de 2 minutes (Figure 5).

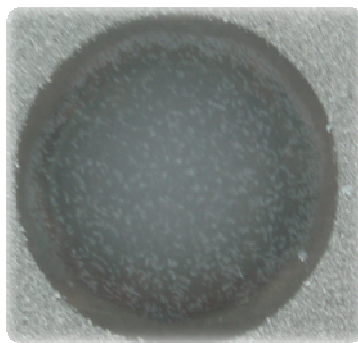


Figure 5 : Exemple d'agglutination avec un antiserum O

Au-delà, les antisérums sèchent au contact de l'air et les résultats ne sont plus significatifs.

→Agglutination avec les antisérums H :

*Salmonella* possède souvent deux phases dont une est majoritaire. Afin de déterminer le sérotype, la technique de l'inversion de phase est nécessaire pour mettre en évidence la seconde et réprimer la première. Pour cette méthode, on utilise la gélose de Sven Gard, ou on inocule la souche bactérienne en présence d'un sérum « anti H ». Après migration, à 37°C+ ou - 1°C pendant 18h + ou - 3 heures, on teste de nouveau les antisérums H que l'on souhaite mettre en évidence.

1.3.4.2. *Par caractérisation génotypique*

-La caractérisation de protéines : l'analyse d'iso-enzymes

Cette méthode repose sur la séparation de protéines cellulaires par électrophorèse en gel d'amidon ou d'acrylamide avec leur mise en évidence par un substrat spécifique. Ce polymorphisme est ensuite relié à des variations alléliques dans les *loci* des gènes de structure des différentes enzymes. Cette technique est considérée comme une méthode génotypique indirecte, qui permet d'évaluer le niveau de diversité génétique au sein d'une population et les degrés de parenté existants entre des isolats, des populations ou des espèces bactériennes. Les variations de la migration dépendent de la structure de la protéine. Les études sont essentiellement portées sur les enzymes iso-fonctionnels ou iso-enzymes pour lesquels une mutation n'altère pas la fonction enzymatique mais provoque une variation de migration électrophorétique. Cela permet de détecter de manière indirecte une mutation dans le gène de structure de l'enzyme qui n'altère pas sa fonction et, à partir des résultats obtenus sur différents enzymes iso fonctionnels, il est possible de calculer des distances génétiques entre les souches (Selander et al., 1986). Pour une souche donnée on obtient ainsi une combinaison de variants pour l'ensemble des enzymes étudiés appelé « type électrophorétique ». Pour les salmonelles, les estérases ont été particulièrement étudiées (Brisabois and Goulet, 1993).

-L'analyse des plasmides

Cette technique est basée sur la détermination du nombre et de la taille des plasmides. Elle nécessite l'extraction de l'ADN plasmidique, séparé ensuite par électrophorèse et révélé par BET pour subdiviser les lysotypes de Typhimurium et Enteritidis (Threlfall et al., 2009a; Threlfall et al., 2009b). La stabilité des plasmides étant variables et pouvant disparaître au cours de la conservation des souches, il a été important de s'intéresser plutôt à l'étude de l'ADN chromosomique : il s'agit principalement de l'amplification génique par PCR (polymerase chain reaction) et de la restriction enzymatique. Ces deux types de technique peuvent être combinés.

-La PCR

Les techniques de PCR sont, en général, simples à mettre en œuvre et permettent d'avoir des résultats rapidement.

Ces techniques permettent d'amplifier des séquences d'ADN cibles. Quelque soit le genre bactérien, certaines amorces universelles sont utilisées pour l'amplification. Ainsi un élément répétitif hautement conservé appelé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC) a été utilisé de façon universelle car les positions d'ERIC sur le chromosome varient selon les espèces et les souches (Hulton et al., 1991).

Au sein d'un sérotype donné, la technique RAPD « Random Amplification of Polymorphic DNA » est une méthode de typage très utilisée, nécessitant le choix d'une amorce d'une dizaine de nucléotides et s'hybridant à plusieurs endroits du génome ; cette méthode s'avère être discriminante (Hilton et al., 1996) mais la reproductibilité ainsi que la répétabilité de la méthode demeurent cependant médiocres, ce qui en fait une méthode peu fiable à utiliser pour faire un suivi des souches à long terme.

#### -La PCR en temps réel

La PCR en temps réel, également utilisée pour la détection de *Salmonella*, a pour cible différents gènes comme *invA* (Hong et al., 2003), *himA* (Chen et al., 2000), *fimA* (Jothikumar et al., 2003), *iagA* (Liming and Bhagwat, 2004), *agfA* (Doran et al., 1993), *sefA* (Cortez et al., 2006) and the 16S rRNA (Lin et al., 2004).

La PCR en temps réel offre de nombreux avantages en termes de rapidité, de coûts (Malorny et al., 2008) et a largement été utilisée sur *Salmonella* pour générer des données quantitatives (Guy et al., 2006; Seo et al., 2006).

#### -Les techniques basées sur la restriction d'enzyme ou REA « Restriction Enzyme Analysis » : la PFGE et le ribotypage

Les deux techniques basées sur la restriction et qui sont principalement utilisées sont le ribotypage et la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Ces méthodes consistent à couper l'ADN extrait et purifié avec une enzyme de restriction, permettant l'obtention d'un certain nombre de fragments qui seront séparés par électrophorèse en champs pulsés puis dévoilés aux UV après une révélation au BET.

Le ribotypage par hybridation de Southern Blot consiste à transférer des fragments d'ADN séparés sur une membrane de nylon et à révéler une partie de ces fragments à l'aide d'une sonde spécifique. La sonde la plus fréquemment utilisée est celle codant pour les ARN

ribosomaux 16S et 23S d'*Escherichia coli*. Cette sonde universelle permet de révéler les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomaux. Bien que fastidieuse, la méthode est utilisée avec un pouvoir discriminant très variable et dépend du sérotype. Certains ribotypes ne peuvent pas être attribués à un sérotype donné (Selander et al., 1990). Un « Riboprinter », système de ribotypage automatisé, a été développé pour diminuer le temps des manipulations ainsi que de standardiser la technique (De Cesare and Manfreda, 2002). Par la suite l'utilisation des sondes spécifiques d'une séquence donnée du génome, IS200, élément d'ADN mobile sûrement spécifique de *Salmonella*, a été pratiquée pour les sérotypes Enteritidis, Heidelberg, Typhimurium, Dublin, Java, Paratyphi B et pour d'autres sérotypes. Ces travaux de caractérisation avec cette technique est connue sous le noms de « IS-typie » ( Stanley et al., 1991; Ezquerra et al., 1993; Stanley et al., 1993).

L'électrophorèse en champs pulsés ou PFGE est en revanche plus récente. Les analyses génétiques ont pour principe l'extraction d'ADN et permettent de révéler le polymorphisme de la séquence d'ADN. On utilise des enzymes de restriction, avec des sites de reconnaissances de 6 bases. Ainsi, pour un génome bactérien de  $4. 10^6$  paires de bases, 1 000 fragments sont obtenus. Du fait du grand nombre de fragments, l'électrophorèse simple est souvent difficile et des modifications de techniques ont du être adoptées, telles que la macrorestriction ou l'analyse du polymorphisme de restriction par des enzymes, avec des sites de coupure à faible fréquence. Les enzymes utilisées sont *XbaI*, *BlnI* ou *SpeI* (Murase et al., 1995).

Grâce à un pulseur, deux champs électriques différents sont appliqués, pendant des temps définis, permettant aux molécules d'ADN de se réorienter du fait de la différence de direction du courant orientée par les champs électriques. La migration de ces fragments est connue sous le nom d'électrophorèse dite CHEF (Clamped Homogenous Electric Field).

La robustesse et le pouvoir discriminant de la méthode sont diminués lorsque moins de fragments sont visualisés.



## **2. L'épidémiologie de *Salmonella* en élevage avicole de poulets de chair**

### **2.1. Les sérotypes ubiquistes**

Les sérotypes ubiquistes peuvent infecter un large spectre d'hôte différent et le portage asymptomatique est la règle chez la volaille même si des infections entraînant des pertes sont observées chez le poussin. Le pouvoir pathogène est différent selon le sérotype bien que le processus infectieux soit davantage dépendant des conditions propres à l'hôte (âge des oiseaux, dose ingérée) que du type de souches (Roy et al., 2001).

### **2.2. Les sérotypes propres aux poulets de chair de l'espèce *Gallus gallus***

*Salmonella Pullorum* et *Salmonella Gallinarum* sont à l'origine de manifestations aiguës et septicémiques qui affectent principalement la poule, la dinde, mais aussi d'autres espèces telles que les cailles, les canards ou les pintades (Shivaprasad, 2000). *Salmonella Pullorum* et *Salmonella Gallinarum* sont très similaires, appartenant au groupe D du schéma de Kauffman White (antigènes somatiques 1,9 et 12) et présentant des similarités génétiques et biochimiques (Shivaprasad, 1997). Les deux sérovars ne possèdent pas de flagelles et leur croissance est lente sur des milieux de culture comparativement aux autres sérovars (Ribeiro et al., 2009). La pullorose attribuée à *Salmonella Pullorum* affecte les animaux à n'importe quel âge mais les taux de mortalité sont plus élevés chez les jeunes.

Les infections à *Salmonella Gallinarum* peuvent évoluer en forme sub-aiguë ou sur-aiguë, associant des signes digestifs importants (diarrhée jaune, verte, profuse), une déshydratation intense et pouvant entraîner entre 40% et 93% de mortalité (Hall et al., 1949).

### **2.3. L'épidémiologie de *Salmonella* dans la filière des poulets de chair**

#### **2.3.1. En élevage**

Les différentes voies d'entrées de *Salmonella* en élevages sont multiples. Les principales sont schématisées ci dessous (Figure 6).

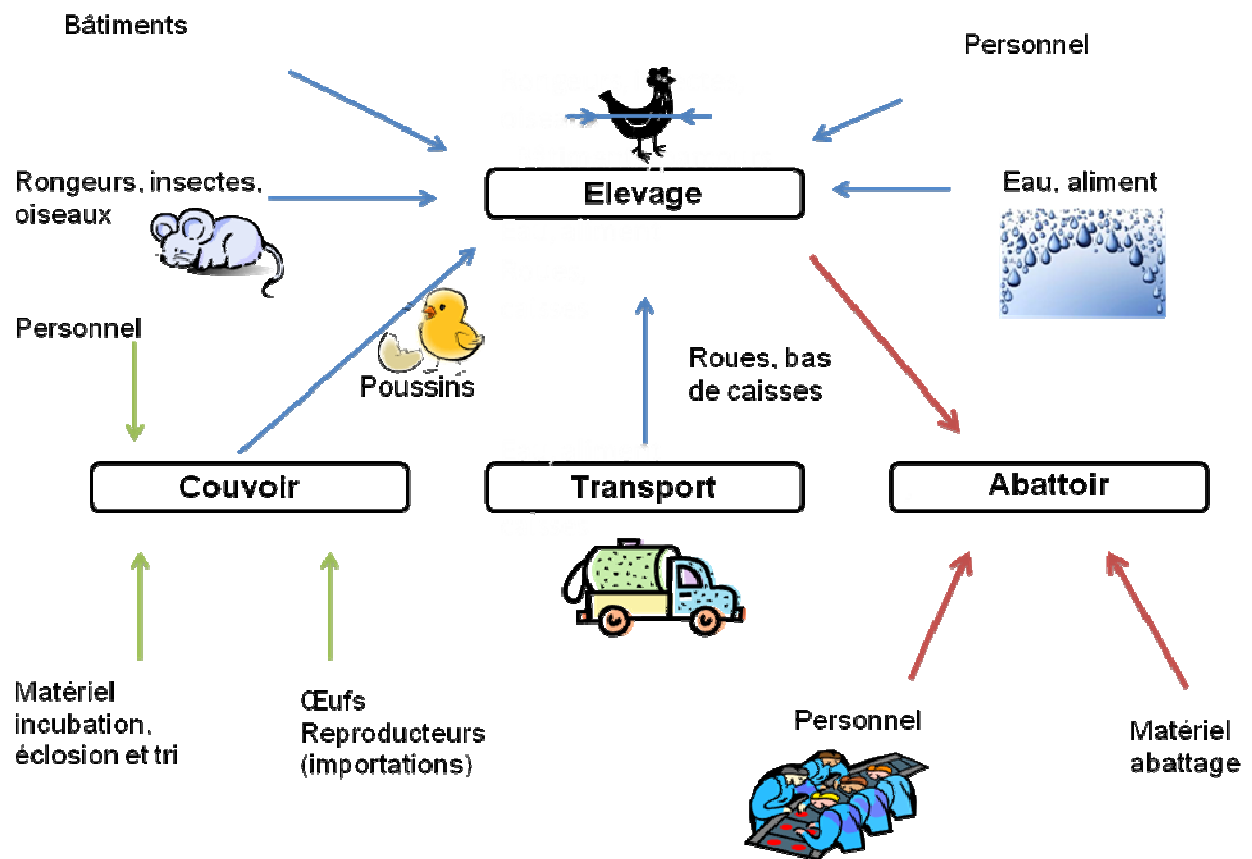


Figure 6 : Voies d'entrée de *Salmonella* en élevages (I.Henry, document personnel)

### 2.3.1.1. Les sources et modes de transmission en élevage

#### -La transmission verticale

La transmission verticale est importante dans la dissémination de *Salmonella* chez les poules pondeuses. Il a été démontré l'importance de la dissémination de *Salmonella* au sein des poulets pour certains sérotypes comme pour *Salmonella* Enteritidis. Les ovaires ainsi que les oviductes des poules pondeuses sont un siège majeur de colonisation de *Salmonella* Enteritidis où la transmission verticale aux œufs peut arriver (Butaye et al., 2006).

D'ailleurs, dans les années 1980, l'émergence de la transmission verticale des souches de *Salmonella* Enteritidis dans les élevages de poulets de chair et de pondeuses furent la cause d'une augmentation du nombre des infections humaines en Europe, Amérique du Nord et d'autres parties du monde (Humphrey and Lanning, 2009).

## **-La transmission horizontale**

De nombreux schémas du cycle épidémiologique ont été proposés par plusieurs auteurs (Baird-parker, 1990; Böhm, 1993; Wray and Davies, 1997) et les voies de contaminations restent nombreuses (Nayak et al., 2004).

L'épidémiologie de *Salmonella* en aviculture implique la présence de nombreux réservoirs ainsi que des contaminations par l'environnement et une excrétion fécale importante. La transmission horizontale peut se faire ainsi via la litière contaminée, les fèces, l'aliment, l'eau, la poussière, les insectes, l'équipement, les poussins malades et via les rongeurs également (Poppe, 2000; Meerburg and Kijlstra, 2007).

Les salmonelles résidentes résistent aux processus de nettoyage et de désinfection en ayant trouvé des niches écologiques favorables. Les salmonelles résidentes contribuent ainsi à l'infection du lot de volailles suivant dans le bâtiment d'élevage (Baggesen et al., 1992; Namata et al., 2009). Les travaux de Lahellec et al. (1986), menés sur 180 élevages de volailles, ont montré que 18.9% des élevages pouvaient être contaminés après les opérations de nettoyage et de désinfection d'où l'importance de l'usage de techniques de nettoyage et désinfection adaptées (Angen et al., 1996; Cardinale et al., 2004a). Ces salmonelles peuvent être ensuite véhiculées par des vecteurs tels que les insectes et les rongeurs (Meerburg BG, 2006; Meerburg and Kijlstra, 2007).

L'aliment peut également être une voie de contamination du bétail en amont de la filière et poser également un risque de contamination pour l'homme (Crump et al., 2002). De nombreuses études ont montré un lien entre la contamination de l'aliment avec les infections, avec des sérovars identiques retrouvés chez les poulets (Boyer et al., 1962; Davies et al., 2001b; Jones et al., 1991), la dinde (Danguy des Déserts et al., 2010; Nayak et al., 2003), les porcs (Österberg et al., 2006) et les vaches (Davies et al., 2003). L'aliment peut être également contaminé après sa fabrication lors de son stockage par les déjections d'animaux sauvages tels que les blaireaux et les rongeurs (Davies and Hinton, 2000).

L'eau est rarement considérée comme un vecteur primaire de *Salmonella* mais constitue un milieu potentiel pour sa survie et sa multiplication dans les abreuvoirs souillés par des matières fécales ou par des matières alimentaires (Francart et al., 1993) et peut être aussi une voie de contamination des élevages (Kinde et al., 1996). Les infections induites par l'eau dans les pays développés mais aussi en Asie, est due à la rareté de l'eau potable et la dépendance des populations vis-à-vis des ressources naturelles pour leur besoin quotidien en

eau (Moganedi et al., 2007). Le ruissellement parcourant les champs ajouté aux effluents d'élevages non traités proche des civilisations contribuent à la multiplication de *Salmonella* dans les ressources naturelles d'eau (Moganedi et al., 2007 ; Jenkins et al., 2008). La présence de *Salmonella* dans l'eau potable présente un risque pour la santé publique même si la dose infectieuse peut être faible de l'ordre de 15-100 CFU (Cobbold et al., 2006; Seo et al., 2006).

D'autres animaux sont également des vecteurs ou des véhicules pour la dissémination de *Salmonella* dans l'environnement tels que les oiseaux sauvages (Davies and Wray, 1996; Gaukler et al., 2009; Lister, 1990; Sousa et al., 2010) ou les ténébrions.

Les ténébrions (*Alphitobius diaperinus*), de la famille des arthropodes, prennent place dans les litières de volailles. Il est écrit que ces insectes sont mis en cause pour les nuisances qu'ils causent dans les élevages et notamment sur le matériel d'isolation ainsi que pour leur rôle dans la transmission d'un certain nombre d'agents pathogènes qu'ils transportent comme les bactéries : *Salmonella* (Baird-parker, 1990; Leffer et al., 2010; Roche et al., 2009; Watson et al., 2000) et *Campylobacter* (Bates et al., 2004) mais aussi des virus (Goodwin and Waltman, 1996), des champignons, des protozoaires (Huber et al., 2007). Les premières publications révélant l'infestation des élevages avicoles par les ténébrions datent des années 1950 (Gould and Moses, 1951). Leur introduction dans les systèmes de production serait apparue via l'aliment contaminé (O'Connor, 1987) et ils se seraient vite répandus par l'épandage de litière comme fertilisant (Le Torch, Phytoma 1979). Il a été démontré la présence de *Salmonella* Typhimurium chez les adultes et les larves d'*Alphitobius diaperinus* (De las Casas et al., 1968). *Salmonella* peut être isolée dans les fèces des ténébrions dans les 28 jours suivant l'exposition d'une durée de 24h à la source contaminée (McAllister et al., 1994).

Ainsi, plusieurs sérotypes comme *S. Heidelberg*, *S. Worthington*, *S. Saint Paul*, *S. Typhimurium* et *S. Indiana* ont été isolés des insectes adultes (Harein et al., 1970; Skov et al., 2004).

Enfin, l'homme joue un rôle au moins en tant que vecteur passif dans la transmission des Salmonelles (Salvat, 1997b).

### 2.3.1.2. La prévalence de *Salmonella* en élevage

Les sérovars de la sous-espèce *enterica* représentent plus de 99.5% des souches isolées. Les sérotypes majeurs identifiés en France dans le secteur santé et production animale sont représentés dans le Tableau 3 ci après

La présence des salmonelles n'épargne aucun pays qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement. Il existe des variations dans l'occurrence des sérotypes de *Salmonella* dans différents pays à des temps différents (Muhammad et al., 2010).

Ce comportement a été attribué à la compétition microbienne (Nogrady et al., 2003). En effet leur présence est répandue dans le monde entier et peuvent être augmentées avec les échanges commerciaux (Uyttendaele et al., 1998).

Outre les impacts qu'elles peuvent induire en santé publique, leur présence peut être un frein aux échanges commerciaux entre les pays.

De nombreuses études relatives à quantifier la prévalence de *Salmonella* dans les élevages avicoles ont ainsi été menées mais elles demeurent difficilement comparables du fait de la variété des techniques utilisées pour la détection des bactéries ainsi que de la diversité des sérotypes pris en compte pour les analyses statistiques.

Tableau 3 : Sérotypes isolés en 2005 dans le secteur Santé et productions animales en France (Moury F. et al., 2006)

Sérotypes	Bovin	Volaille	Porc	Autres espèces	Total
Typhimurium	137	<b>1604</b>	26	30	1797
Senftenberg	0	<b>1441</b>	0	0	1441
Indiana	2	<b>1203</b>	1	2	1208
Kottbus	2	<b>883</b>	1	0	886
Montevideo	74	<b>632</b>	0	4	710
Enteritidis	15	<b>615</b>	0	16	646
Saintpaul	0	<b>320</b>	0	0	320
Infantis	9	<b>223</b>	1	1	234
Hadar	3	<b>210</b>	3	1	217
Virchow	0	<b>175</b>	0	0	175
Agona	5	117	0	1	123
Derby	1	101	7	6	115
Tennessee	0	102	0	1	103
Mbandaka	35	64	2	0	101
Napoli	2	93	0	2	97
Autres Sérotypes	118	908	49	146	1 221
Total	403	8 691	90	210	9 394

En France, en 1999, Rose *et al.* (1999) ont estimé que 69.8% des 86 bandes étudiées en Bretagne étaient infectées par *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ; en revanche les récents travaux menés en France par Le Bouquin *et al.* (2010) ont démontré une prévalence chez les poulets de chair de 8.6% ± 1.5%. Dans d'autres pays, comme en région centrale d'Arabie Saoudite (KSA), la prévalence est de 4.87% (Saad et al., 2007), 10.7% au Royaume Uni

(Snow et al., 2008), autour de 3% en Lituanie (Pieskus et al., 2006), et environ de 34.7% dans l'ouest du Japon (Murakami et al., 2001).

Cependant l'évolution de la contamination des volailles par salmonelles est en diminution dans les pays qui ont appliqué la directive européenne 92/117. Le dernier rapport de l'Efsa 2010 indique des taux de prévalence sur les carcasses allant de 0% pour le Danemark, l'Estonie, la Finlande et le Luxembourg jusqu'à 85.7% pour la Hongrie. En France, la prévalence sur les carcasses a été estimée à 7.6%. Ces résultats doivent tout de même être pris avec précaution car les méthodes d'échantillonnages sont différentes.

Les sérovars identifiés varient selon leur localisation ou selon le temps mais beaucoup sont ubiquistes. Par exemple *Salmonella* Virchow a été identifié aux Pays Bas (van Asselt et al., 2009), en Espagne (Marin and Lainez, 2009), en Israël (Lublin and Sela, 2008), dans le nord de l'Inde (Yadav et al., 2008) et en Corée (Kim et al., 2007). D'autres sérotypes comme *Salmonella* Weltevreden a été identifié en Thaïlande (Padungtod and Kaneene, 2006) et au Vietnam (Vo et al., 2006). D'autres sérotypes sont également en pleine émergence comme *S.* Blockley décrit pour la première fois aux Etats-Unis en 1955. *Salmonella* Blockley a été reporté en Europe en 1976 mais de nombreux rapports témoignent de l'émergence de ce sérovar dans les années 1990. En revanche, en zone tropicale ce sérotype a été identifié en Asie (Limawongpranee et al., 1999) où les auteurs ont démontré son association avec l'environnement du bâtiment d'élevage de poulets de chairs. En Malaisie, *Salmonella* Blockley est également largement répandu à travers le pays (Rusul et al., 1996) et fut identifié dans l'est de l'Asie (Wilson and Whitehead, 2006).

### 2.3.1.3. Les mesures de limitation de la contamination

Les mesures mises en place à l'élevage visent à réduire le niveau de contamination de portage de *Salmonella* par les animaux.

En amont, la mesure de lutte essentielle demeure donc la prophylaxie sanitaire développée, notamment en France, dans l'application des arrêtés du 28 octobre 1998 et de la charte sanitaire afférente.

Ces mesures reposent sur des méthodes d'assainissement des élevages par l'abattage systémique des troupeaux reproducteurs contaminés afin de limiter la contamination verticale des filières (Poirier et al., 2008; Wegener et al., 2003). Les mesures prises au niveau des

troupeaux de production peuvent concerner le contrôle de la contamination des aliments par traitement à l'acide par exemple ou bien par la vaccination (Denagamage et al., 2007), mais aussi assorti à un prix indexé sur le niveau des contaminations des troupeaux (Wegener et al., 2003). Des actions en aval de la filière doivent être également être prises en compte comme la diminution du stress au niveau du transport afin d'éviter l'émission de *Salmonella* que ce soit pour les filières porcines ou avicoles (Mitchell and Kettlewell, 1994; Rostagno et al., 2005).

#### 2.3.1.4. Les bases réglementaires

Ci-après la liste des règlements mis en place chez les volailles reproductrices, les poules pondeuses et les poulets de chair.

##### - **Volailles reproductrices**

- Règlement (CE) n° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.
- Règlement (CE) n° 1003/2005 de la Commission du 30 juin 2005 portant application du règlement (CE) n° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la fixation d'un objectif communautaire de réduction de la prévalence de certains sérotypes de salmonelles dans les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* et portant modification du règlement (CE) n° 2160/2003.
- Règlement (CE) n° 1091/2005 de la Commission du 12 juillet 2005 mettant en œuvre le règlement (CE) n° 2160/2003 en ce qui concerne les exigences communautaires relatives à l'utilisation de méthodes de contrôle spécifiques dans le cadre des programmes nationaux de contrôle des salmonelles.

##### - **Poules pondeuses**

- Règlement (CE) n° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.



- Règlement (CE) n° 1091/2005 de la Commission du 12 juillet 2005 mettant en œuvre le règlement (CE) n° 2160/2003 en ce qui concerne les exigences communautaires relatives à l'utilisation de méthodes de contrôle spécifiques dans le cadre des programmes nationaux de contrôle des salmonelles.
- Règlement (CE) n° 1168/2006 de la Commission portant application du Règlement (CE) n° 2160/2003 en ce qui concerne la fixation d'un objectif communautaire de réduction de la prévalence de certains sérotypes de salmonelles dans les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* et portant modification des Règlements (CE) n° 1003/2005 et 2160/2003 (non encore publié)

- **Poulet de chair**

En ce qui concerne la filière chair, les nouveaux arrêtés mis en place définissent les modalités du plan de lutte des salmonelles aviaires dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière chair.

Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2009, la recherche des infections à *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium doit être réalisée par l'éleveur dans les élevages dont la capacité est supérieure à 250 poulets de chair. Des prélèvements de fientes (2 paires de chaussettes ou une paire de chaussette et une chiffonnette) doivent être réalisés dans le bâtiment respectant un délai de 3 semaines avant abattage.

Pour l'instant, les textes concernant les salmonelles chez les volailles sont les arrêtés du 26 février 2008: ils ne concernent que les reproducteurs *Gallus gallus* (filiale ponte et chair), les poulettes futures pondeuses et les pondeuses. En ce qui les concerne, lorsqu'une salmonelle visée par le plan de lutte (*S. Typhimurium* par exemple) est retrouvée lors des prélèvements de fientes/poussières à l'élevage, une recherche des salmonelles est effectuée dans les muscles et si cette recherche est positive alors la viande est soumise à un traitement assainissant. Ce système avait été mis en place entre autres parce que l'abattage des poules de réforme pose généralement problème, et on craignait que les abatteurs refusent encore plus facilement les poules de réforme issues de troupeaux positifs. En ce qui concerne le poulet de chair, la réglementation est mise en place depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2009, conformément au règlement (CE) 646/2007. A priori, la recherche à cœur n'est pas obligatoire.

Voici ce qui est prévu en termes d'abattage et de valorisation de la viande:

Les dispositions à prendre en cas de confirmation d'infection dans les troupeaux de poulets de chair sont les suivantes d'après les articles ci- après :

Article 17

1- Les lots d'animaux issus de troupeaux d'animaux placés sous APDI ne sont adressés à l'abattoir qu'avec l'autorisation du DDSV d'implantation de l'abattoir.

2- Le vétérinaire, présent lors de l'abattage des dits lots, s'assure :

a. Que les animaux sont abattus en fin de chaîne ou qu'aucune opération d'abattage ne soit reprise sans que les locaux et la chaîne n'aient fait l'objet d'un nettoyage et d'une désinfection ;

b. Que les animaux ont fait l'objet d'un contrôle renforcé à réception en vue de s'assurer de l'absence de signes cliniques.

c. Que la cadence d'abattage est adaptée à l'abattage hygiénique des animaux, en particulier à l'étape d'éviscération des animaux. Au besoin, il la fait ralentir.

d. Que les caisses et les camions ont fait l'objet d'un nettoyage et d'une désinfection corrects avant de quitter l'enceinte de l'abattoir.

Sans préjudice des résultats de l'inspection sanitaire, les carcasses sont revêtues de la marque d'identification communautaire.

3- La fabrication de viandes séparées mécaniquement et de préparations de viandes à partir de ces carcasses obtenues est interdite. En outre, si l'une des conditions énumérées au point 2 ci-dessus n'est pas remplie, les viandes sont destinées à subir un traitement thermique assainissant au regard des salmonelles.

4- Les viscères digestifs, foie inclus, des carcasses de volailles issues d'un troupeau confirmé infecté sont déclarés impropres à la consommation humaine et destinés aux sous-produits de catégorie 2.

Pour résumer des mesures de grande ampleur dans les filières poules pondeuse, poulet de chair et porcine ont été mises en place afin de limiter le risque de transmission de salmonelles et dont le coût se répercute sur le prix de production et donc sur la compétitivité

des filières (Wegener et al., 2003). Pour un pays comme la France, pays d'élevage et de productions animales, les enjeux économiques et commerciaux ne sont pas sans conséquences avec l'image des filières, les contraintes des exportations et le coût des mesures préventives.

### 2.3.2. Les moyens de lutte contre les salmonelles tout au long des maillons de la chaîne de production

Les salmonelles sont rencontrées tout au long de la chaîne alimentaire, de la « fourche à la fourchette ». Nombreux sont les pays qui ont mis en place des moyens de lutte (Gillespie and Elson, 2005; Wegener et al., 2003).

#### 2.3.2.1. *En élevage*

L'application de stratégies de réduction des agents pathogènes au niveau des exploitations agricoles est considérée comme une des premières étapes nécessaire pour réduire la présence d'agents pathogènes d'origine alimentaire dans les œufs et la viande.

En amont, des mesures doivent être prises au niveau des élevages reproducteurs puisqu'ils peuvent intervenir dans la diffusion de la contamination. L'éradication de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* peut ainsi passer par l'élimination pure et simple des parquets de reproducteurs contaminés par ces sérotypes. Or, les bonnes pratiques d'hygiène, de bio-sécurité ainsi que les mesures d'approche de type HACCP, sont autant de mesures à utiliser conjointement pour limiter la présence de *Salmonella* en élevages. Les autres mesures de prévention et de contrôle sanitaire sont la vaccination, l'exclusion compétitive, les acides organiques et les traitements d'inactivation des agents pathogènes.

### 2.3.2.2. *A l'abattoir et dans les ateliers de transformation*

A ce niveau le système HACCP et l'application de bonnes pratiques d'hygiène permettent de détecter et de maîtriser les contaminations (Edel, 1994). Du fait de l'éviscération des carcasses, le risque de contamination via les contaminants digestifs libérés lors de cette étape est relativement fréquent. La maîtrise de cette étape est essentielle mais rare sont ceux qui mettent des dispositifs particuliers en place, du fait de l'effet contraignant que cela peut entraîner (Wong et al., 2002). La décontamination des carcasses en fin de «process» d'abattage est également réalisée comme aux Etats-Unis mais reste pour le moment interdit sur le territoire Européen.

### 2.3.3. A l'abattoir

#### 2.3.3.1. *Les voies de contamination à l'abattoir*

##### - **Durant le transport**

Les containers et les caisses de transports sont des vecteurs pour les organismes qui sont transférés des excréments des volailles via les plumes aux autres volailles (Shackelford, 1988). La remise en cause d'un nettoyage et d'une désinfection inefficace des caisses de transport a déjà été démontrée lors de précédentes études (Mead et al., 1994; Jacobs-Reitsma and Bolder, 1998). Ainsi, l'étude de Corry et al., (Corry et al., 2002) a démontré une faible évidence entre la contamination des volailles et les caisses de transport dites « sales ». Les sérovars identifiés après le nettoyage et la désinfection étaient généralement différents de ceux identifiés chez les lots de volailles ayant été transportés dans ces mêmes caisses. Cette différence peut s'expliquer par la contamination des caisses après le déchargement des volailles lors de leur trempage pour leur nettoyage ou par la présence de matières fécales résiduelles sur les caisses infectées par des lots transportés antérieurement.

Le transport à l'abattoir est également connu pour le stress qu'il peut provoquer chez les volailles (Burkholder et al., 2008). De nombreux auteurs ont rapportés que le stress entraînait une perturbation des fonctions intestinales, pouvait diminuer la résistance de l'animal et augmenter la diffusion des bactéries intestinales (Mulder, 1995; Scherer et al., 2008). Les lots ainsi porteurs seraient davantage sujets à excréter les salmonelles ainsi que les campylobacters (Mitchell and Kettlewell, 1994; Mulder, 1995; Rigby and Pettit, 1979). Slader et al., (2002) a souligné que durant le transport à l'abattoir la prévalence des oiseaux positifs

augmentait du fait de la contamination fécale des oiseaux via la peau et les plumes d'autres oiseaux contaminés. L'excrétion fécale durant le transport facilite les contaminations croisées entre les carcasses durant le «process», augmentant ainsi la contamination des produits finaux (McCrea et al., 2006). Les auteurs ont suggéré qu'une faible prévalence à l'élevage et durant le transport était une stratégie importante pour diminuer le risque de contamination des produits alimentaires.

Durant l'abattage, plusieurs étapes peuvent être également des voies de contamination.

### **-L'eau du bac d'échaudage**

Cette étape constitue un point essentiel de la contamination croisée (Reiter et al., 2007). L'origine de la contamination est multiple : elle peut être due à un mauvais nettoyage et désinfection du bac, à la contamination par les plumes des volailles lors de leur passage dans le bac, mais également du à l'excrétion des fientes libérées lors du relâchement sphinctérien (Lahellec and Meurier, 1973).

### **-La plumaison**

A cette étape du «process», les doigts plumeurs (Figure 7) peuvent être également un nid de contamination croisée avec la présence de contamination fécale où les bactéries telles que les salmonelles sont transférées des carcasses (Cason et al., 1999; Mead et al., 1994; Mulder et al., 1978).



**Figure 7 : Doigts plumeurs, abattoir COE (I.Henry, 2008)**

Cette contamination peut s'expliquer par un mauvais nettoyage et désinfection des doigts plumeurs qui sont difficiles à nettoyer du fait de leur matière en caoutchouc ainsi que de leur structure munie de nombreuses anfractuosités où peuvent se loger les bactéries. Les doigts plumeurs, du fait de leur action de rotation, entraînent un transfert de contamination des plumes chargées de micro-organismes vers les follicules plumeux. Au cours de cette étape suivant l'échaudage, la carcasse subit un refroidissement progressif du fait de l'arrosage par l'eau de rinçage des plumeuses. Au cours de ce refroidissement, les follicules plumeux dilatés se referment et piègent ainsi les bactéries (Thomas and Mc Meekin, 1980).

L'échaudage suivie de la plumaison sont donc les étapes les plus contaminantes du «process» d'abattage des volailles. Après ces deux étapes, 70% à 90% des carcasses peuvent être contaminées en considérant que cette contamination est proportionnelle à la contamination du poulet vivant (Salvat et al., 1993).

#### **- L'éviscération**

L'éviscération automatique (Figure 8) entraîne parfois une rupture des intestins lorsque la machine est mal réglée impliquant alors une augmentation de contamination de *Salmonella* sur les carcasses.



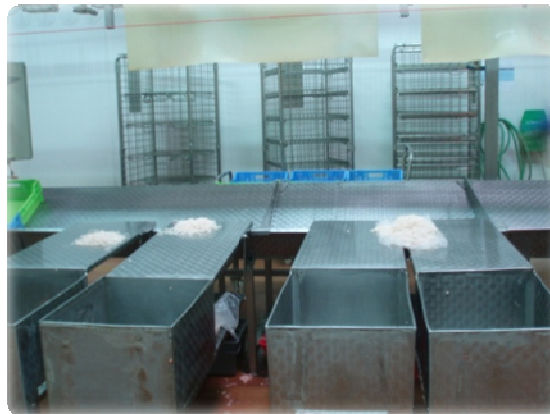
**Figure 8 : Eviscéreuse, abattoir COE (I.Henry, 2008)**

### **-Le refroidissement**

A cette étape, le refroidissement aurait un effet inhibiteur sur la présence de salmonelles. D'après les travaux de Mikolajczyk et al., (2001), le taux de contamination des poulets avant refroidissement est de 44% et de 20% après.

### **-Le calibrage, le bridage et le conditionnement (Figure 9)**

Lors de ces étapes, les carcasses peuvent être contaminées via les surfaces du matériel. La présence de biofilms qui s'y développent également est une source de contamination pour la viande (Joseph et al., 2001; Salvat and Fravallo, 2004). *Salmonella* Typhimurium a ainsi été retrouvée dans des abattoirs malgré les opérations de nettoyage et de désinfection.



**Figure 9 : Tables de bridage, abattoir COE (I.Henry, 2008)**

L'adhésion et la persistance de *S. Typhimurium* sur le sol, les murs, l'équipement et les autres surfaces ont déjà été démontrées par Barker and Bloomfield (2000) qui ont montré une modification de la membrane externe de la bactérie en réponse aux conditions environnementales et ensuite au développement de biofilms.

#### *2.3.3.2. La prévalence de Salmonella à l'abattoir*

Dans l'Union Européenne, 15.7% des carcasses sont contaminées par *Salmonella* avec une variation selon les pays variant de 0% à 26.6% dont un état membre avec une prévalence de 85.6% avec *S. Infantis* identifié comme sérovar majoritaire. La prévalence de la contamination par *S. Enteritidis* et par *S. Typhimurium* est de 3.6%. Par ailleurs, *S. Infantis* et

*S. Enteritidis* sont les deux sérovars les plus fréquents isolés sur les carcasses de volailles. En France la prévalence de *Salmonella* sur les carcasses de volaille est de 7.6% (EFSA 2010).

### **3. *Salmonella*, un impact majeur en santé publique**

#### **3.1. Les infections à *Salmonella***

Les salmonelles peuvent être responsables chez l'homme soit d'infection typho paratyphiques qui sont des septicémies connues sous le nom de fièvre typhoïde soit d'un groupe d'infections dont la forme qui se manifeste est une gastro entérite plus ou moins aiguë qui peut voir apparaître certaines complications.

*Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C ainsi que *Salmonella* Sendai sont étroitement adaptés à l'homme (Kingsley and Baumler, 2000).

Les autres sérovars qualifiés d'ubiquistes sont impliqués dans les TIA.

Depuis les années 1990, l'accroissement des infections dues au sérotype *Enteritidis* peut être attribué à la dissémination de cet organisme dans le monde au sein de l'industrie avicole (Rodrigue et al., 1990).

##### 3.1.1. La prévalence humaine

A l'heure actuelle, de nombreux pays recensent des cas de salmonelloses chez les humains. Ainsi, en 2004, d'après l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), 192 703 cas humains ont été rapportés dans l'union Européenne. Pour cette même année, en France il y a eu 6 352 cas dont 2 064 liés au sérovar *Enteritidis*, 1 666 causés par *Typhimurium* et 2 622 par d'autres sérovars (EFSA, 2006). Les sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium* sont les sérovars les plus incriminés responsables des infections humaines. Des données similaires sont également retrouvées dans d'autres pays, mais la plupart sous-estiment l'ampleur du problème puisque de nombreux cas ne sont pas reportés. En France les 3 sérotypes responsables de 70 % des infections humaines étaient dans les années 2000, respectivement *Salmonella* *Enteritidis* (33%), *Salmonella* *Typhimurium* (32%) et *Salmonella* *Hadar* (6%) (Bouvet and Grimont, 2001). En 2008, en France *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*,



and S. 1,4,[5],12:i- étaient les serotypes les plus fréquemment isolés chez l'homme avec respectivement 46%, 19% et 4% (communication personnelle – Institut Pasteur, France).

En France, les *Salmonella* dites ubiquistes responsables des toxi-infections alimentaires représentent 96% des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme (<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmcncr/salmcncractualites.html>).

### 3.1.2. La pathogénicité

La virulence ainsi que la pathogénicité de la souche ingérée va jouer de manière différente sur la contamination et selon la sensibilité de la personne (Bollaerts et al., 2008). Le sérotype concerné aura également des effets différents (Jones et al., 2008; Shimoni et al., 1999; Weinberger et al., 2004). Le mode de consommation impliquera également un effet dose réponse différent selon l'aliment ingéré. Il est alors plus probable qu'une mayonnaise à base d'œufs crus sera plus contaminant qu'une viande qui aurait mijotée (Bollaerts et al., 2008).

### 3.1.3. Les produits avicoles responsables de toxi-infections alimentaires collectives

La viande de volaille a longtemps été et reste une source de transmission et de contamination chez l'homme (Davies et al., 2001a; Thong et al., 2002; Toyofuku, 2008; Van Schothorst and Notermans, 1980) du fait des nombreuses façons de cuisiner la viande ainsi que les risques fréquents de contamination croisée avec d'autres aliments contaminés (Cardinale et al., 2005).

### 3.1.4. Les symptômes chez l'homme

Chez l'homme, la salmonellose est caractérisée par une diarrhée, de la fièvre à 39°C-40°C, des douleurs abdominales, des vomissements, des maux de tête, des nausées et une fatigue générale (Neto et al., 2010). Le temps d'incubation varie de 8h à 72h, avec une durée

moyenne de 24h et la durée des symptômes peuvent durer une semaine. Chez les sujets immunodéprimés, les jeunes enfants et les personnes âgées, l'infection peut être fatale (FAO).

### 3.1.5. Les diagnostics, les traitements et la prophylaxie

Chez l'homme, seule une coproculture permet d'établir un véritable diagnostic. Cette coproculture, comprend une phase d'isolement puis une identification précise de la bactérie complétée par un antibiogramme. Selon l'état du patient, une antibiothérapie précise est préconisée.

### 3.1.6. *Salmonella* et antibio résistance

*Salmonella* acquiert la résistance aux antibiotiques par des mutations chromosomiques et au travers de mécanismes de transduction, de transformation et de conjugaison (Okolo, 1986). Ces différents mécanismes impliquent le transfert de gènes de résistance par l'ADN plasmidique comme les facteurs R ou plasmide de résistance, par conjugaison de plasmide ou d'éléments chromosomiques (Vidon et al., 1978; Wagner and Hahn, 1999).

*Salmonella* subsp. est caractérisée par une sensibilité à la totalité des antibiotiques actifs sur les entérobactéries. Cependant, au cours du temps, on constate que de nombreuses souches sont devenues résistantes :

La résistance chez *Salmonella* dans les échantillons d'environnement, de volailles, d'autres espèces animales et chez l'homme est probablement due à l'utilisation de médicaments dans l'alimentation (Gast et al., 1988), l'injection d'antibiotiques chez les poussins (Ekperigin et al., 1983), le traitement des autres espèces animales (Pacer et al., 1989), et de l'homme avec des antibiotiques (Holmberg et al., 1984) .

Les souches de *Salmonella* d'origine aviaire sont souvent résistantes à la tétracycline (Poppe et al., 1995), à l'oxytétracycline (Sharma et al., 1996), à la pénicilline (Rahman et al., 2009), aux aminoglycosides (Parveen et al., 2007) et aux fluoroquinolones (Herikstad et al., 1997).

*Salmonella* Hadar a été décrit comme un des sérotypes les plus résistants (Wybo et al., 2004). Depuis quelques années, les souches de *Salmonella* Typhimurium DT 104, souche considérée comme historique et pionnière concernant l'antibiorésistance a été isolée dans des environnements humains et animaux présentant souvent un caractère de résistance aux antibiotiques suivants : l'ampicilline, le chloramphénicol, la streptomycine, les sulfamides et les tétracyclines. DT104 a été décrite dans les années 1960 au Pays de Galles (Anderson, 1968). Le premier réservoir de cette souche a été identifié être les bovins (Wall et al., 1995). Depuis 1993 cette souche serait également prédominante chez les volailles, les ovins et les porcins. Son émergence est également observée dans plusieurs pays européens (Fisher et al., 1997; Gatto et al., 2006), en Angleterre et au pays de Galle (Threlfall et al., 1997). Des épidémies ont également été reportées aux Etats-Unis chez le bétail (Besser et al., 1997) et chez l'homme (Glynn et al., 1998). Aux Etats-Unis le premier cas reporté chez l'homme date de 1985 et son ampleur fut observée dans les années 1990 (Glynn et al., 1998). Au Royaume Uni, DT104 fut isolé pour la première fois en 1984 à partir d'isolats en provenance de mouettes et de perroquet (Humphrey, 2001). *Salmonella* Hadar présente également un fort taux de résistance à l'acide nalidixique (quinolone) (Breuil et al., 2000; Szych et al., 2001).

Les souches non sensibles à une pression de sélection seraient sensibles aux antibiotiques. L'usage intempestif de médicaments en médecine vétérinaire augmente chez les animaux l'acquisition de résistance de *Salmonella* vis-à-vis des antibiotiques.

## **3.2. Les enjeux sanitaires**

### 3.2.1. Les Toxi-infections alimentaires collectives

#### 3.2.1.1. *En France*

Entre 2006 et 2008, 3 127 foyers de Tiac ont été déclarés en France, impliquant 33 404 malades, 2 302 hospitalisations et 15 décès. Le genre *Salmonella* à été à l'origine de 47% des foyers pour lesquels un agent étiologique a été confirmé (

Tableau 4). *S. Typhimurium* était le sérotype prédominant. Dans 69% des cas, les foyers de Tiac sont survenus en restauration collective. Durant cette période, on a assisté au quasi doublement du nombre de déclarations de Tiac.

Cette augmentation est essentiellement due au fait des mesures mises en place permettant aux différents services de faciliter leur déclaration. Cependant le nombre d'hospitalisations reste assez stable, et le système de surveillance permet actuellement de repérer les foyers dans lesquels les malades présentent des signes sévères.

Tableau 4 : Foyers, cas et décès déclarés aux services sanitaires entre 2006 et 2008

Agent causal	Foyers déclarés aux Ddass ou DDSV				
	Foyers		Cas		Décès
	N	%	N	%	N
Salmonella dont Enteritidis	388	46.8	2742	29.8	1
	114	29.4	917	33.4	0
Typhimurium Autres sérotypes Sérotypes indéterminés	156	40.02	874	31.9	0
	14	3.6	159	5.8	1
	104	26.8	792	28.9	0
Clostridium perfringens	58	7.0	1540	16.7	0
Shigella spp.	13	1.6	66	0.7	0
Campylobacter spp.	27	3.3	247	2.7	0
Staphylococcus aureus	133	16.0	1401	15.2	3
Bacillus cereus	37	4.5	688	7.5	0
Histamine	58	7.0	330	3.6	0
Virus	61	7.4	1492	16.2	0
Autres pathogènes	54	6.5	696	7.6	0
Total confirmés	829	26.5	9202	27.5	4
Agents suspectés					
Salmonella	102	8.8	836	6.9	1
Clostridium perfringens	107	9.2	2143	17.7	1
Shigella spp.	3	0.3	17	0.1	0
Campylobacter spp.	172	0.4	21	0.2	0
Staphylococcus aureus	117	37.9	3835	31.7	3
Bacillus cereus	109	14.9	1907	15.8	1
Histamine	103	10.1	580	4.8	0
Virus	1157	9.4	1852	15.3	0
Autres pathogènes	1141	8.9	900	7.4	1
Total agents suspectés	3127	37.0	12091	36.2	7
Agent inconnu		36.5	12111	36.3	4
Total		100	33404	100	15

### 3.2.1.2. A la Réunion

Vingt neuf maladies figurent sur la liste des maladies à déclaration obligatoire dont les toxi-infections alimentaires collectives qui doivent être signalées par tout biologiste médecin, responsable de service hospitalier ou de laboratoire privés et/ou publics. Tout foyer de TIAC doit ainsi faire l'objet d'un signalement et d'une notification, quels que soient les résultats des enquêtes épidémiologiques et environnementales, y compris en l'absence de résultat. La notification doit être faite lorsqu'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en générale gastro-intestinale, dont la cause peut être rapportée à une origine alimentaire.

Entre 1996 et 2005, 72 foyers de Tiac ont été déclarés à la Réunion. Un seul décès connu a été signalé en 1999 suite à *Salmonella* Typhimurium. Le repas consommé dans le cadre familial en est responsable pour 47.2% des cas, 26.4% des cas concernent un restaurant et 12.5% des cas sont attribués aux cantines scolaires.

Les staphylocoques ont été responsables pour 19 foyers, *Salmonella* dans 16 des foyers, *Clostridium perfringens* dans 10 des foyers, l'histamine dans 9 des foyers, *Bacillus aureus* dans 3 des foyers, les coliformes dans 1 et 13 des foyers sont attribués à des agents causals non identifiés.

La distribution du nombre de foyers par catégorie d'aliment causal de Tiac entre 1996 et 2005 était attribué aux poissons et fruits de mer (13 foyers), viande (10 foyers), volaille (8 foyers) (œuf et ovoproduits (7 foyers), lait et produit laitier (4 foyers), autres aliments (15 foyers) et de sources inconnues (15).

### 3.2.2. *Salmonella*, un problème majeur persistant

Quelque soit les pays concernés par les toxi-infections alimentaires, des millions de cas sont estimés (Flint et al., 2005). Des moyens de lutte et des mesures de gestion ont été mis en place ainsi que des mesures classiques d'hygiène, (pasteurisation, réfrigération) couplées à des plans de lutte intégrés et la mise en place de la méthode HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) chez les professionnels de la sphère agro-alimentaire.

Au 21<sup>ème</sup> siècle, de nombreux éléments tendent cependant à favoriser la croissance de ces infections (DuPont, 2007; Sofos, 2008). Les modes de production actuels ainsi que la globalisation des approvisionnements à grande échelle tendent à favoriser l'expansion des

contaminations par large diffusion. Les changements dans les habitudes culinaires par la consommation de produits crus ou peu cuits ainsi que la consommation hors foyers favorisent également les risques d'infection à Salmonelles (Jones and Angulo, 2006). De même que la circulation des aliments et des personnes favorisent l'exposition des consommateurs à des nouveaux pathogènes exotiques. Les populations à risque augmentent quant à elle du fait d'une espérance de vie prolongée et de l'efficacité des soins. Ainsi les personnes âgées fragilisées et immunodépressives (atteintes de HIV) font partie des populations à risque susceptibles de contracter plus rapidement des toxi-infections alimentaires. La persistance des TIA est donc non seulement due à la globalisation des échanges mais aussi aux changements de nos pratiques d'où la stricte nécessité de surveiller les tendances des pathogènes responsables actuellement sur le marché.

Dans les pays industrialisés, *Salmonella* et *Campylobacter* sont en tête des listes concernant les pathogènes responsables de TIA. Salmonelle est la deuxième cause bactérienne de gastroentérites après *Campylobacter* en Europe et aux Etats-Unis (Mead et al., 1999). Sur le territoire américain *Salmonella* est au premier rang concernant les décès relatifs : pour 1.4 millions de cas, 15 000 hospitalisations et 400 décès seraient la cause de *Salmonella* (Voetsch et al., 2004). En Europe 150 000 cas confirmés seraient déclarés (anonymous 2009). Au Royaume Uni, salmonelle est la 4<sup>ème</sup> cause de gastro-entérites aiguës et se place au premier rang en terme de décès relatifs (Flint et al., 2005).

Cependant, une baisse significative de l'incidence des salmonelloses humaines a pu être observée à l'échelle européenne depuis plusieurs années. Malgré ce constat, les salmonelloses restent bien une des principales zoonoses d'origine bactérienne dont la voie majoritaire de contamination est la voie alimentaire. En 2006, 160 649 cas confirmés, principalement associés à Enteritidis et Typhimurium ont été recensés chez l'homme à l'échelle européenne (EFSA 2007). En France, cette diminution coïncide avec la mise en place de mesures de lutte en élevage de volailles (Poirier 2004). Selon les données nationales de 2006, salmonelle a été identifiée dans 42% des foyers de Toxi-infections alimentaire collectives (TIAC) pour lesquels l'agent pathogène a bel et bien été confirmé. Malgré une baisse de 33% des cas entre 1997 et 2001, le nombre de foyers déclarés associés à ce pathogène est stable de 1998 à 2005 avec environ 150 cas par an. Une légère augmentation a cependant été constatée en 2006 avec 799 malades dont 219 hospitalisations et 2 décès, reliés aux contaminations par des salmonelles non typhiques (Jourdan et Vaillant 2008). Il est en revanche important de noter que les cas confirmés correspondent à des malades ayant consulté

un médecin pour une gastro-entérite auxquels à été prescrit une recherche de salmonelles dont les résultats positifs ont été enregistrés dans l'une des bases de données ayant servi à l'estimation faite par l'INVS. Nous sommes donc dans cette configuration actuelle, qu'à la pointe émergée de l'iceberg faisant probablement une sous-estimation importante du nombre réel de cas correspondants. Les taux d'hospitalisation et de décès observés dans les différents pays engendrent des conséquences à court et long terme et n'est pas sans effet sur l'économie du pays (Helms et al., 2006). Dans les années 1990, les salmonelloses d'origine alimentaire représentaient par an de 30 500 à 42 000 infections documentées à l'origine de 5 700 à 10 200 hospitalisations pouvant entraîner de 90 à 540 décès (Vaillant V.,et De Valk 2004).

En France, on a rapporté que le nombre d'hospitalisations du fait des maladies infectieuses transmises par les aliments est compris entre 10.200 et 17.800 par an (Vaillant et al., 2005). Les produits crus à base de volaille et de viande restent la source principale des salmonelles dans beaucoup de pays (Bansel et al., 2006).

Le potentiel de contamination microbienne dépend de la condition des animaux avant l'abattage, des pratiques d'abattage, des mesures prises pour la manipulation et l'entreposage ultérieurs (Jackson et al., 1997).

### **3.3. Les enjeux économiques et les moyens de surveillance mis en place en France**

#### **3.3.1. Les enjeux économiques**

Du fait des nombreuses hospitalisations causées par *Salmonella* le coût pour la collectivité est important Il a été estimé que pour un cas de salmonellose hospitalisé aux Etats-Unis, la dépense est évaluée à 18 000 dollars (Trevejo et al., 2003). Du fait de la place importante que prend la salmonellose en santé publique, le système de surveillance mis en place est justifié de même que les mesures de prévention et de contrôle tout au long des maillons de la chaîne alimentaire. Le ministère de l'agriculture et de la Pêche a eu pour objectif prioritaire de mener un vaste programme d'action visant à ce que les volailles soient particulièrement concernées par la prévention de la contamination par *Salmonella* dans les œufs, et la viande de volaille.



### 3.3.2. Les moyens de surveillance mis en place en France

En France, la surveillance des salmonelloses repose sur plusieurs systèmes complémentaires : le Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella* (CNRSS), Institut Pasteur, Paris qui reçoit pour sérotypage les souches de *Salmonella*, isolées par environ un tiers des laboratoires hospitaliers et privés d'analyses et de biologie médicale (LABM). L'analyse des tendances annuelles et mensuelles, régionales et départementales et l'élaboration de seuils d'alerte permet de détecter des augmentations anormales du nombre de souches pour un sérotype donné.

Les TIAC doivent être obligatoirement déclarées à la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS) ou aux services vétérinaires départementaux (DSV), qui sont chargés de leur investigation.

La surveillance vétérinaire, à laquelle participent 200 laboratoires, qui transmettent des souches isolées chez les animaux, dans des aliments et dans l'environnement. Ces souches sont étudiées au Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire (Agence Française de Sécurité des Aliments (AFSSA), Maisons-Alfort).

En France en 2000, 12 883 souches de *Salmonella* d'origine humaine ont été enregistrées au CNRSS. Parmi ces souches, les sérotypes Enteritidis et Typhimurium représentent respectivement 36% et 29% des isollements. Depuis 1998, le nombre d'isollements humains de tous les sérotypes de *Salmonella* (Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Hadar) a diminué (INVS BEH n°12/2001) .

## **4. *Campylobacter* spp. et campylobactériose humaine**

### **4.1. Généralités**

*Campylobacter* est la bactérie principale responsable des gastroentérites aux Etats- Unis, (Altekruse *et al.*, 1999) , au Royaume-Uni (Anon, 2003), et dans le reste du monde et en particulier dans les pays développés (Bates *et al.*, 2004 ; Charlett *et al.*, 2003).

Le genre *Campylobacter* comprend une douzaine d'espèces parmi lesquelles trois sont responsables de pathologies humaines : *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, et *Campylobacter fetus*. Ainsi, les *Campylobacter* thermotolérants (T min=30°C, T opt = 42°C, T max = 48°C) comme *Campylobacter jejuni* sont responsables de toxi-infections alimentaires chez l'homme (Allos B., 2001).

### **4.2. Bactériologie et taxonomie**

Le genre *Campylobacter* défini en 1963 regroupe des bactéries à Gram négatifs, microaérophiles, incurvées et leur mobilité en forme de vrille est l'une des principales caractéristiques pour leur reconnaissance. De plus, elles possèdent un flagelle unique et polaire relativement étroit (0,2-0,5 µm) et font partie de la branche des Protéobactéries (Vandamme *et al.*,1991).

### **4.3. Habitat et réservoir**

Les *Campylobacter* sont des commensaux du tube digestif des mammifères (et éventuellement génitaux chez les bovins pour certaines espèces de *Campylobacter fetus* responsables d'avortements) et des oiseaux. Leur survie dans l'environnement est limitée et ils sont sensibles à l'air, à la sécheresse et à la chaleur.

Les volailles constituent le réservoir majeur des *Campylobacter* qui sont des hôtes réguliers du tube digestif et notamment des parties terminales tels que le caecum et l'iléum.

Les rats et les oiseaux sont aussi impliqués pour être des vecteurs de *Campylobacter* (Chuma *et al.*, 2000).

#### 4.4. Transmission

Chez l'homme, la principale source des infections à *Campylobacter* est l'ingestion d'aliments contaminés et en particulier celle des viandes crues ou peu cuites et principalement la viande de volaille (Kapperud *et al.*, 1993). Les viandes de volaille ainsi que la consommation de produits avicoles, de viandes crues et le manque d'hygiène dans les cuisines sont souvent responsables de ces infections (Cardinale E., *et al.*, 2003 ; Mattick K., *et al.*, 2003). Au niveau de l'abattoir, la dissémination de ce germe est fréquente et liée essentiellement à des contaminations croisées entre les carcasses (Zrelli S., 2003).

Les sources vectrices de *Campylobacter* sont donc diversifiées, bien que la viande de volaille crue ainsi que le lait restent les principales sources de contamination.

Chez l'animal, la transmission verticale semble peu probable (Van de Giessen *et al.*, 1996) mais il existe de nombreuses voies horizontales d'infection par *Campylobacter* des élevages de volailles comme la litière souillée, les rongeurs, les insectes (Bates *et al.*, 2004 ; Templeton *et al.*, 2006), les oiseaux (Hänninen M.L., 2004), les animaux domestiques (Javid M., Ahmed S., 2002), et la terre présente aux abords de ces élevages (Rivoal K., 2000).

Bien que de nombreuses interrogations sur les méthodes de transmission de *Campylobacter* au sein des élevages sont encore mal définies (Hiatt *et al.*, 2003), il demeure l'hypothèse que les matières fécales de ces animaux sont une source importante de transmission de *Campylobacter* et crée donc un risque supplémentaire pour la contamination des carcasses.

#### **4.5. Symptômes chez l'homme**

Chez l'homme, les infections intestinales sont accompagnées de diarrhées banales, liées à une contamination digestive qui sont rencontrées avec *Campylobacter jejuni* et accessoirement *coli*. Les aliments en cause sont essentiellement les viandes de volailles (*jejuni*) et accessoirement de porc (*coli*). Les *Campylobacter* sont très certainement l'un des premiers, sinon le premier responsable des diarrhées dans le monde. Dans de rares cas l'infection à *C. jejuni* peut provoquer un syndrome grave : le syndrome de Guillain-Barre (Tam *et al.*, 2003).

#### **4.6. Diagnostic, traitement et prophylaxie**

La recherche de *Campylobacter* se fait par coproculture. Il n'existe pas de traitement spécifique mais pour les cas les plus sévères les traitements utilisés sont des antibiotiques tels que l'érythromycine ou les fluoroquinolones afin de diminuer la durée des symptômes.

Cependant, lors de la cuisson de la viande le traitement à la chaleur (60°C pendant 0,2-0,3 minutes) détruit aussi bien les *Salmonella* que les *Campylobacter* (Lake R., 2007).

#### **4.7. Sensibilité aux antibiotiques**

*Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont sensibles à de nombreuses familles d'antibiotiques. Cependant une résistance peut être acquise face aux macrolides, aminosides, tétracyclines et quinolones (Engberg *et al.*, 2001).

#### **4.8. Principaux caractères biochimiques des Campylobacter**

Les *Campylobacter* possèdent une oxydase et n'utilisent aucun sucre comme source de carbone, réduisent les nitrates en nitrites et sont catalases négatives.

## **5. La filière avicole Réunionnaise**

### **5.1. La filière avicole réunionnaise dans l'industrie et l'économie locale**

En 2010, la Réunion compte 802 993 habitants (Insee) et génère le pouvoir d'achat le plus élevé de la zone océan indien. L'économie réunionnaise est caractérisée par :

- un secteur primaire dominé par la culture de la canne à sucre
- un secteur secondaire dont la principale valeur ajoutée est issue de l'industrie agro-alimentaire.

La filière avicole représente un des fleurons de l'industrie agroalimentaire avec plus de 30 000 tonnes de volailles produites en 2009. Elle ne couvre cependant que 27% du marché des volailles brutes de l'île et 13% du marché des produits élaborés, ce qui démontre un potentiel de croissance non négligeable.

La consommation moyenne de volaille par habitant est autour de 40kg/hab/an. La filière doit faire face aux importations massives de produits importés congelés à un prix inférieur à celui du marché local. Les coûts de fabrication sont aussi plus élevés sur l'île avec des économies d'échelles quasi inexistantes. Ainsi pour faire face à cette réalité économique la filière se différencie par la valorisation de ses produits de qualité et par son savoir faire. La filière diversifie son offre en frais, en adéquation avec les goûts culinaires des réunionnais. Le poulet blanc est l'espèce la plus consommée. Les autres espèces (poulet jaune, cou nu noir, dinde, canard, pintade, coq et lapin) sont consommées plus occasionnellement.

Le principal réseau de distribution est la GMS (80% du volume), puis le réseau CHR (11%), les collectivités (8%) et enfin les importateurs grossistes.

### **5.2. L'organisation de la filière avicole**

#### **5.2.1. L'historique de la filière avicole Réunionnaise**

La filière organisée est une industrie datant des années soixante. Ci-après quelques périodes clés dans l'évolution de la filière avicole :

**-De 1960-1990**

Avant 1960 la production de volailles à la Réunion offre le visage de la traditionnelle basse-cour, permettant aux habitants d'assurer eux même une partie de leur alimentation. C'est ensuite en 1960 que des premières ébauches de coopératives et de Sociétés d'Intérêt Collectif Agricole (SICA) se créent (exemple : coopérative laitière SICA-LAIT).

En 1962, la création de FERMEX par la famille Isautier ouvre la voie d'une production moderne avec couvoir, bâtiment d'élevage et usine d'aliments. Rapidement, un petit nombre d'aviculteurs décide de s'unir au sein d'une première coopérative avicole, la COOPEL.

En 1970, est créé le syndicat des producteurs de lapins et entre 1972 et 1982 trois nouvelles structures apparaissent : la Société Avicole de Bourbon (SAB) à la Possession, le Couvoir Bourbon Reuni (CBR) du Tampon et le Couvoir de l'Entre Deux. En mai 1981, la Coopérative des Producteurs de Lapins de la Réunion (CPLR) est créée avec 14 adhérents.

L'union réunionnaise des Coopératives Agricoles (URCOOPA), fournisseur d'aliment pour bétail de l'île, regroupant les savoirs faire de plusieurs coopératives d'approvisionnement est créé en 1982 suivie en 1984 par la création de la Ferme Avicole du 25<sup>ème</sup> Km (FA 25), société d'exploitation avicole qui produit de la volaille ainsi que quelques produits élaborés de volaille.

Alors que les activités de l'URCOOPA deviennent effectives, la première retombée économique de cette union est la baisse du prix de l'aliment de 30%. Très vite, la qualité de l'aliment s'améliore et des éleveurs se lancent.

En octobre 1984, la Société Coopérative Agricole des Aviculteurs de la Réunion (SCAAR) est créée avec 18 Adhérents Fondateurs. L'abattage des volailles produites par cette coopérative se fait dans l'ancien abattoir bovin de Saint-André, mais les conditions d'hygiène insuffisantes vont entraîner une réflexion sur la construction d'un abattoir aux normes européennes.

Il faut donc attendre 1986 pour avoir les prémices d'une professionnalisation de la filière lapin avec la construction d'un abattoir à Saint-Pierre. En 1988, le Couvoir de l'Entre- Deux

est repris par la filiale Sica Silo de l'URCOOPA pour créer SICA SILO Couvoir. Sous l'impulsion de l'URCOOPA et de la SCAAR, un dossier est soumis aux collectivités locales et à la Communauté Economique Européenne (CEE) pour la mise en place un nouvel abattoir d'une capacité de 4.000 tonnes. La baisse du prix du poussin est alors observée en 1989 avec l'intégration du couvoir de l'Entre Deux à l'Urcoopa.

### ***-De 1990 à 1993***

C'est en 1990 que la société Crête d'or Entreprise est créée. Ainsi, entre 1991 et 1993 de nombreux changements s'opèrent avec des fusions et des transferts d'actifs simplifiant le mouvement coopératif. En 1991, avec la construction de l'abattoir GRAND MATIN à Grand Ilet a notamment pour ambition d'avoir un impact positif dans le développement du cirque de Salazie. Crête d'Or Entreprise rachète ensuite les actions de la FA 25 et augmente la capacité d'abattage de l'usine (de 4.000 à 6.000 tonnes par an). Sur l'initiative de l'URCOOPA, la société d'accoupage Couvée d'Or est créée.

Le Syndicat Réunionnais des Eleveurs de Volaille (SREV) est également créé. C'est en juillet que débute le fonctionnement de l'abattoir Crête d'Or Entreprise à l'Etang-Salé et transfert des actifs SCAAR, FA 25 à Crête D'Or et en septembre l'absorption de SICA SILO Couvoir par Couvée D'Or est effectuée. Au même moment, le groupement des éleveurs de grand Ilet (GEGI) section volailles est créé.

En février 1993, est racheté par la SAB des actifs de CBR (couvoir concurrent de Couvée d'Or) et de la SAT (élevage de reproducteur), en préalable à leur absorption. En effet, en septembre, c'est l'absorption de CBR par la SAB.

La filière avicole, en pleine maturité, voit ses différents maillons se spécialiser au cours de deux grandes périodes.

De 1994 à 1998, la filière va encore se développer et accroître ses volumes de façon continue, pour répondre à des objectifs de satisfaction quantitative des besoins du marché.

### ***-De 1994 à 2006***

En avril 1994, création de l'Association Réunionnaise Interprofessionnelle de la Volaille (ARIV) et en janvier 1995 la SAB est absorbée par Couvée d'Or.

Les activités de l'abattoir de Crête d'Or Entreprise s'agrandissent en 1998 et ses activités se diversifient avec la création d'une charcuterie industrielle de 1.000 m<sup>2</sup> et un doublement des capacités de froid négatif.

En août 1999, la SCA OVOCOOP est créée afin de valoriser les œufs des producteurs en vue de leur transformation ovo produits. Une deuxième période, où, après un recul de la production (entre 98 et 99), la filière s'inscrit dans une politique qualitative et de spécialisation effective de ses maillons.

En septembre 2001, l'abattoir de Grand Matin devient la Société d'exploitation de Grand Matin Abattoir (SEGMA) et les abattoirs de Crête d'Or Entreprise et de la SEGMA se rapprochent.

Deux mois après, la société AVICOM est créée pour commercialiser les produits des deux abattoirs.

En janvier 2002, c'est le début de la commercialisation commune des deux abattoirs et le transfert de l'équipe commerciale de Crête d'Or Entreprise et SEGMA à AVICOM. Le GEGI devient le Groupement des Eleveurs de Volailles de l'Est (GEVE).

En juillet 2004 la commercialisation des ovoproduits (fabriqués chez OVOCOOP) est confiée à AVICOM.

En 2005, on assiste à l'intégration des éleveurs du SREV au sein de la SCAAR et un an après en 2006, la SCAAR devient Avi-pôle Réunion.

L'industrie avicole Réunionnaise moderne ne s'est donc développée que depuis une vingtaine d'année. La plupart des exploitations est spécialisée dans la production de poulets de chair, d'autres dans la production d'œufs, mais d'autres exploitations sont réservées à l'élevage d'espèces multiples couplant le porc et la volaille dans des bâtiments proches les uns des autres.

Trois types de bâtiments existent : le type « Colorado » (Figure 12) généralement constitué d'extracteurs d'air dynamique positionnés latéralement ainsi que par des volets de ventilation, le type « Louisiane » (Figure 13) est quant à lui constitué par des grillages de chaque côté latéraux ainsi que par des extracteurs d'air, ainsi que le type « Péi » (Figure 14 et



Figure 15) ou la ventilation y est plutôt naturelle et le bâtiment généralement créé sur la base d'anciens séchoirs à tabac.



**Figure 10 : Bâtiment de type « Colorado » (I.Henry, 2008)**



**Figure 11 : Bâtiment de type « Louisiane » (I.Henry, 2008)**



**Figure 13 : Bâtiment de type « Péi », vue d'extérieur (I.Henry, 2008)**



**Figure 12 : Bâtiment de type « Péi », vue d'intérieur (I.Henry, 2008)**

### 5.2.2. En amont: la station d'accoupage Couvée d'Or et la coopérative Avi-pôle Réunion

La SAS Couvée d'Or est une entreprise d'accoupage à part entière employant une quarantaine de personnes. Les reproducteurs sont importés à 1 jour de chez Hubbard (siège social situé à Quintin dans les Côtes d'Armor) ; ces derniers sont ensuite élevés dans les sites d'élevages pendant 20 semaines puis transférés sur les sites de reproduction. Les œufs à

couver (OAC) sont collectés chaque jour et incubés dans deux couvoirs de capacité équivalente (400 000 OAC).

Chaque année 12 millions d'OAC sont produits, 70 000 à 80 000 reproducteurs sont importés et 8.5 millions de poussins sont commercialisés. 98% des poussins vendus sur l'île sont commercialisés par Couvée d'Or. Les 2 % restant proviennent soit d'OAC soit de poussins issus de métropole. La croissance du marché laisse envisager une progression constante pour les 10 prochaines années.

L'organigramme de la filière avicole est schématisé ci après (Figure 16).

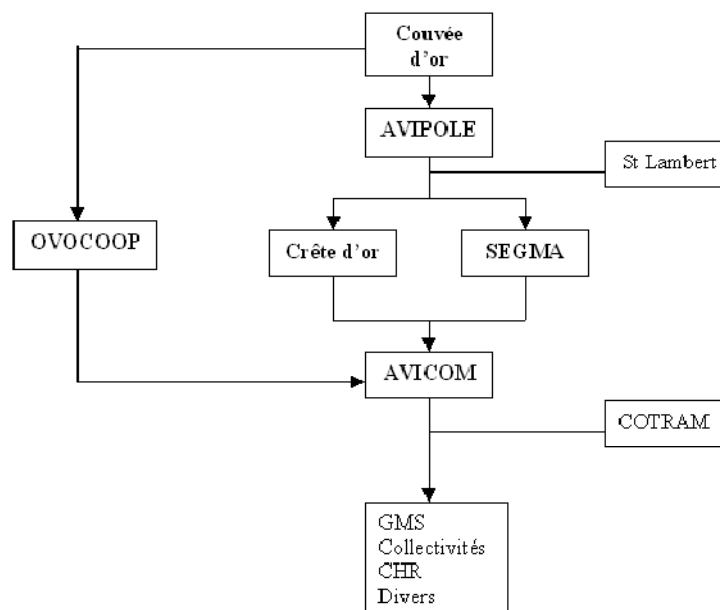


Figure 14 : Organigramme de la filière avicole

### 5.2.3. En aval : l'abattoir et les ateliers de transformation Crête d'Or Entreprise

#### 5.2.3.1. Abattage réalisé en 2009 par Crête d'Or Entreprise et Segma

Le Tableau 5 ci-après résume les caractéristiques générales des abattages réalisés par Crête d'Or entreprise et par Segma en 2009. Segma abbat davantage les espèces secondaires que les poulets blancs.

**Tableau 5 : Abattage réalisé par Crête d'Or et Segma en 2009, en fonctions des espèces (données personnelles)**

Crête d'Or					Segma				
Espèce	Nombre abattus	Volume (kg)	Poids moyen vif (kg)	Age moyen abattage (jours)	Espèce	Nombre abattus	Volume (kg)	Poids moyen vif (kg)	Age moyen abattage (jours)
Poulet 757 Blanc	5 649 450	9 955 115	1,762	45,2	Poulet 757 Blanc	87 612	158 494	1,809	46,2
Poulet Jaune	19 334	37 182	1,923	59,5	Poulet Jaune	287 311	560 132	1,950	59,8
Dinde Mâle+Femelle	110 017	829 651	7,541	87,5	Dinde Mâle+Femelle	6	20	3,333	78,0
Dinde Fermière	1 236	5 034	4,073	152,9	Dinde Fermière	/	/	/	/
Pintade	/	/	/	/	Pintade	120 367	232 919	1,935	82,7
Canard Barbarie	/	/	/	/	Canard Barbarie	36 813	170 280	4,626	89,1
Canette Barbarie	5 936	13 701	2,308	60,6	Canette Barbarie	22 244	54 497	2,450	61,1
CNN	30	51	1,700	72,3	CNN	111 449	260 770	2,340	88,0
Coq	8	35	4,375	97,0	Coq	22 694	85 059	3,748	94,1
Poule Pondeuse Spor	/	/	/	/	Poule Pondeuse Spor	287 256	548 422	1,909	331,5
Baby Dinde	778	2 140	2,751	50,4	Baby Dinde	19 641	56 156	2,859	51,4
Poularde	1 528	4 536	2,969	131,8	Poularde	/	/	/	/
Chapon	4 573	20 486	4,480	157,8	Chapon	144	637	4,424	148,0
Oie	1 727	9 230	5,345	162,0	Oie	/	/	/	/
Cimendef	370	1 050	2,838	112,0	Cimendef	53 793	133 712	2,486	109,0
					Poules/Coq Couvée	62 210	141 629	2,277	334,3
<b>Total Crête d'Or</b>	<b>5 794 987</b>	<b>10 878 211</b>			<b>Total SEGMA</b>	<b>1 111 540</b>	<b>2 402 727</b>	/	/

### 5.2.3.2. Marché de la volaille de 2005 à 2009

Le marché de la volaille de 2005 à 2009 à la Réunion est résumé dans le Tableau 6 ci après.

**Tableau 6 : Le marché de la volaille Réunionnais de 2005 à 2009 (données personnelles)**

Marché de la volaille à la Réunion en kg (%)	2005	2006	2007	2008	2009
AVICOM	6999217	7011609,5	7386136	7260264	7436384,8
(Hors charcuterie et préparation)	(27)	(26,7)	(27,6)	(26,6)	8(25,4)
Importation	13923249	14790855	14720857	15273858	16892589
(Hors préparation)	(54)	(56,3)	(55)	(55,9)	(57,6)
Filière inorganisée					
(Approche par les OAC et poussins)	4960276,3	4480393,2	4641241,88	4796773,46	4981797,1
	2 (19)	3 (17)	(17,4)	(17,6)	7(17)
<b>Total</b>	<b>25 882 742</b>	<b>26 282 858</b>	<b>26 748 235</b>	<b>27 330 895</b>	<b>29 310 771</b>

En 2009, la filière inorganisée représentait 17% de part du marché, Avicom représentait 25% et l'importation 58%.

5.2.3.3. Volume de vente par type de produits toutes espèces confondues de 2006 à 2009

Le Tableau 7 résume les principales caractéristiques de volume de vente par type de produits et par espèces.

Tableau 7 : Volume de vente par type de produits et par espèces de 2009 à 2009 (données personnelles)

Volume de vente par type de produit (kg)	2006	2007	2008	2009
Congelé	1 987 555,89	2 095 579,86	2 189 282,19	2 074 751,91
Frais	6 329 818,98	6 632 562,92	6 416 902,74	6 458 478,86
Charcuterie	1 233 428	1 373 665	1 386 473	1 380 101
Découpe	2 359 261	2 402 550	2 273 669	2 287 484
Entier	4 116 210	4 293 376	4 280 738	4 248 737

La Figure 15 schématise la répartition des volumes en fonction des espèces pour l'année 2009.

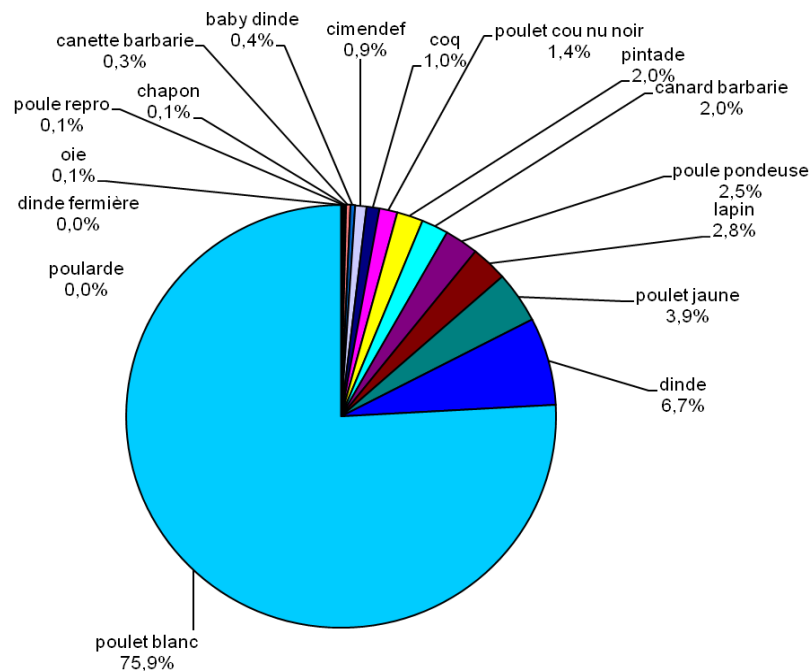


Figure 15 : Répartition des volumes par espèces en 2009 (données personnelles)

**Epidémiologie analytique de *Salmonella* subsp. *enterica* et de  
*Campylobacter* spp. dans les élevages de poulets de chair à la Réunion.**

**Investigation des sources infectieuses de *Salmonella* subsp. *enterica* de la  
production à la transformation.**



**Figure 16 : Coq (I.Henry, 2007)**

## Introduction

*Salmonella* fait partie des agents zoonotiques majeurs dont la maîtrise répond à des objectifs de santé publique. La salmonellose est la première zoonose d'origine alimentaire faisant l'objet d'une approche communautaire intégrée quant à sa surveillance harmonisée et sa maîtrise dans les filières avicoles et porcines. A ce titre, la Salmonellose est une zoonose emblématique. Du fait de l'augmentation des échanges entre les pays de l'Europe, la France grand producteur de denrées alimentaires d'origine animale doit faire face à la concurrence. Celle-ci est d'autant plus importante à la Réunion car elle doit faire face, en plus aux fortes importations de produits avicoles congelés en provenance de métropole. Dans ce contexte de libres échanges économiques, les questions d'ordre de santé publique prennent toute leur importance et constituent des arguments scientifiques majeurs pour certains pays en tant que mesure de sauvegarde. Les salmonelles sont au centre de ces préoccupations. En France, dans la filière avicole, un programme de lutte a été mis en place afin de diminuer le nombre d'infections chez les humains.

L'aviculture moderne occupe une place de choix dans la production animale : le cycle de production est relativement court, le produit est riche en protéines et le prix de vente reste abordable pour un consommateur moyen. Malgré les programmes de prophylaxie sanitaire et médicale mis en place par la coopérative d'éleveurs, la présence de salmonelles et de campylobacters constitue une menace pour les consommateurs et un frein pour le développement de la filière avec le reflet d'une mauvaise image. L'organisation et la hiérarchisation de la production représentent une opportunité non négligeable en matière de gestion puisqu'il est désormais possible d'agir en amont de la filière pour en diminuer les contaminations en aval.

L'amélioration de la qualité des produits finaux destinés à la consommation humaine ne peut se faire que si la maîtrise du système global de production, de « la fourche à la fourchette », est assurée. Pour ce faire, une bonne maîtrise doit avoir lieu aux différents maillons, depuis les élevages reproducteurs, les couvoirs, les élevages de poulets de chair en passant par les points d'abattage et les points de commercialisation.

## Contexte et objectifs du projet de recherche :

En l'absence de connaissances sur le sujet dans la zone Océan Indien, il nous a semblé important de définir dans un contexte insulaire tropical, les traits épidémiologiques majeurs de *Salmonella*, et de *Campylobacter* au niveau élevage, qui permettent à ces bactéries de diffuser dans l'intégralité de la filière.

La filière avicole à la Réunion et notamment l'élevage de poulets de chair, reste un modèle en terme d'organisation et de professionnalisme. Elle constitue une source importante de revenus sur l'île et assure le maintien d'un nombre conséquent d'emplois. Mais pour survivre dans un tel marché international, tourné vers la concurrence, les élevages locaux se doivent de garantir l'innocuité de leurs produits sous peine d'être « dévorés » par les importations de la métropole.

Ainsi, face à cette augmentation, Crête d'Or Entreprise, unité d'abattage et de transformation, se trouve dans la nécessité de fournir à ses consommateurs des produits irréprochables sur un plan sanitaire, c'est-à-dire, dépourvus de la présence de bactéries entéropathogènes, *Salmonella* et *Campylobacter*, responsables de toxi-infections alimentaires. Au-delà des qualités sanitaires, l'enjeu économique de l'entreprise et donc de l'avenir de ses employés, en dépendent.

A la Réunion, aucune étude épidémiologique précise n'a été conduite afin de mener une lutte efficace pour diminuer la prévalence de *Salmonella* au sein des élevages de poulets de chair. Le développement de telles études s'avère aujourd'hui nécessaire afin de mettre en exergue les facteurs majeurs d'infection et de contamination des volailles, pour protéger ainsi l'intérêt de tous, à la fois de la filière, des éleveurs et des consommateurs.

L'objectif général est d'améliorer la qualité sanitaire des poulets de chair sur l'île de la Réunion par une meilleure maîtrise des risques.

Les objectifs spécifiques, consistent à : (i) identifier les risques majeurs d'infection au niveau des élevages par les germes entéropathogènes : *Salmonella* et *Campylobacter* ;(ii) évaluer la contamination et la diversité des sérovars de *Salmonella* présents à l'abattoir et (iii) identifier l'origine des sources infectieuses de *Salmonella* et estimer l'impact sur le consommateur.

Cette étude a permis d'identifier les risques majeurs d'infection et de contamination aux différents maillons de la filière et ainsi de consolider les mesures de maîtrise au niveau de ces points critiques.

Nous avons donc évalué les taux de prévalence de salmonelles et de campylobacters circulant en élevages de poulets de chair afin de faire un état des lieux à la Réunion. En parallèle, l'identification des facteurs de risque d'introduction et d'infection par *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages avicoles est apparue fondamentale pour en assurer une meilleure maîtrise des risques.

Dans un second temps, il nous semblait important d'estimer le potentiel de contamination par *Salmonella* à l'abattoir et souligner l'impact sur la santé publique avec un focus tout particulier sur *Salmonella* Typhimurium.

Une première partie du travail a consisté à mettre en évidence et à quantifier les facteurs de risque d'introduction et de contamination de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair.

La deuxième partie de l'étude est centrée sur les contaminations de *Salmonella* tout au long du «process» d'abattage.

Enfin, la troisième partie s'est attardée à démontrer la diversité des sources infectieuses de *Salmonella* et son impact potentiel sur la santé publique.



# 1. Epidémiologie analytique de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* et de *Campylobacter* spp. dans les élevages de poulets de chair

## 1.1. En production primaire à l'étape élevage

*Salmonella* et de *Campylobacter* contaminent fréquemment les élevages de poulets de chair comme en témoignent les nombreuses études menées à travers le monde dans les pays développés ainsi que dans les pays en voie de développement (Carraminana *et al.*, 1997; Boonmar *et al.*, 1998; Crilly *et al.*, 2001; Cardinale *et al.*, 2004b; Arsenault *et al.*, 2007; Capita *et al.*, 2007;).

Dans la zone Océan Indien, quelques rares investigations sur *Salmonella* chez la volaille ont été menées en Afrique du Sud (Mare *et al.*, 2000; van Nierop *et al.*, 2005), à l'île Maurice (Khoodoo *et al.*, 2002), mais aucune investigation n'avait eu pour terrain d'étude la Réunion.

Les systèmes de production moderne sont semblables à ceux développés en France métropolitaine. L'aviculture moderne réunionnaise s'est développée il y a une soixantaine d'années. Le premier élevage avicole à la Réunion date des années 50. Cependant, le système de production ne peut pas être comparé avec celui de la métropole et des pays européens. Le climat tropical, le contexte socio-économique et culturel sont autant de paramètres spécifiques qui influencent le développement de la production des volailles locales.

Les volailles sont élevées de façon industrielle pour la filière organisée, représentant une part de 25% du marché de la volaille.

Il existe trois grands types de structure de bâtiment :

-le type « Louisiane » avec une ventilation statique naturelle et/ou dynamique avec une entrée d'air des deux côtés ;

-le type « Colorado » dont la particularité est l'entrée d'air via un côté du bâtiment et l'extraction de l'autre ;

-le type « Péi », généralement construit sur les fondations d'anciens séchoirs à tabac ou à partir d'agglos en béton. Pour ce type de structure, la ventilation est essentiellement naturelle avec la rare présence de ventilateurs pour certains d'entre eux.

Pour l'aliment, les matières premières sont importées essentiellement d'Argentine, de France métropolitaine et de l'île Maurice et sont ensuite transformées par les usines locales, chez Urcoopa et Proval- Sanders. L'aliment pour volailles est principalement constitué de maïs, de soja, de son de blé et de son de riz. La gamme alimentaire s'étale du V12 pour l'aliment naissance de démarrage jusqu'au V33 pour l'aliment retrait, administré à partir du 40<sup>ème</sup> jour d'élevage. Entre les jours 20 et 40 de croissance, l'aliment croissance (V22) ainsi que l'aliment finition (V32) est administré.

En élevage, le matériel pour l'alimentation est composé d'assiettes avec chaînes automatiques, ou des trémies à chaîne manuelle et/ou automatique. Le matériel pour l'ab est composé de pipettes ou d'abreuvoirs ; les pipettes sont cependant le mode majoritaire dans les élevages.

La litière est constituée principalement de copeaux de bois de *Cryptomeria* cultivé sur l'île. Quelques élevages utilisent également des granulés pour la litière.

Les poussins d'un jour proviennent du couvoir où 98% de la production est vendue sur l'île. Le reste provient soit d'œufs à couver (OAC), soit de poussins en provenance de métropole. Chaque année 12 millions d'OAC sont produits et 70 000 à 80 000 reproducteurs sont importés à un jour de chez Hubbard (siège social situé à Quintin, Côtes d'Armor).

L'épidémiologie de *Salmonella* a été étudiée dans de nombreux pays, de même que l'étude des facteurs de risque d'introduction de *Salmonella* dans les élevages avicoles mais ce type d'étude reste rare dans les pays tropicaux (Arsenault et al., 2007; Cardinale et al., 2004a; Huneau-Salaün et al., 2009; Marin et al., 2009; Namata et al., 2009; S. Le Bouquin, 2010).

L'unité d'observation est la bande (en élevage) ou le lot (de carcasses). Celle-ci est déclarée infectée vis-à-vis de *Salmonella* et de *Campylobacter* si au moins un prélèvement de fientes s'avère positif. Cette variable est dichotomique : infectée ou non infectée. Toutes les variables sont catégoriques. Le nombre de catégories par variable est limité de façon à ce que chaque catégorie représente au moins 10% de la totalité. Toutes les relations bilatérales entre les variables seront vérifiées ( $\chi^2$ ). Pour les relations bilatérales montrant une association statistique forte et une plausibilité biologique, seule une variable (la plus importante) sera conservée. Par exemple, la variable "chaussures spécifiques" peut être associée avec la variable "tenue spécifique" et seule la variable "tenue spécifique" doit être conservée pour la suite des analyses.

Une procédure en deux étapes a été utilisée pour évaluer l'association entre les variables explicatives et le statut "infection par *Salmonella*" de la bande. La régression logistique sera utilisée selon la méthode décrite par Hosmer and Lemeshow (2000). En premier lieu, une analyse univariée sera réalisée pour mettre en évidence l'infection par *Salmonella* avec chacune des variables explicatives. Seuls les facteurs associés (Pearson  $\chi^2$  test,  $p < 0.25$ ) avec l'infection par *Salmonella* seront inclus dans le modèle pour une analyse multivariée. La deuxième étape sera donc une régression logistique multiple. La contribution de chaque facteur sera testée via la méthode du maximum de vraisemblance par une étape pas à pas. Dans le même temps, les modèles les plus simples seront comparés au modèle complet par le critère d'Akaike (Akaike, 1974). Cette procédure sera poursuivie automatiquement jusqu'à obtenir un modèle ne regroupant que les facteurs majeurs significatifs à  $p < 0.10$ . Les odds ratios seront convertis en risques relatifs selon la méthode proposée par Beaudeau et Fourichon (1998).

Selon Toma et al., (1996) le facteur de risque est défini comme « tout facteur associé à l'augmentation de la probabilité d'apparition ou de développement d'un phénomène pathologique ». Cependant, une association statistique ne signifie pas obligatoirement une relation causale entre le facteur et la maladie. Les auteurs font part de trois conditions logiques afin de parler de facteurs de risque :

- l'antériorité du facteur sur l'effet ;
- la force de l'association entre le facteur et l'effet : la relation causale est d'autant plus probable que l'association est forte ;
- l'absence de tiers facteurs perturbant l'interprétation et le facteur mesuré, connu sous le nom de facteurs de confusions.

Aucune étude épidémiologique portant sur les bactéries entéro-pathogènes en question n'ayant été menée, nous avons donc décidé dans un premier temps de déterminer la prévalence de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair puis d'identifier les risques majeurs d'infection par *Salmonella* et *Campylobacter* dans ces mêmes élevages.

L'évaluation de l'infection des volailles par *Salmonella* et de *Campylobacter* a ainsi été réalisée dans 65 élevages de poulets de chair pour l'étude sur *Salmonella* et dans 50 élevages

pour l'étude portant sur *Campylobacter*. Cependant, du fait des conditions météorologiques non favorables à la circulation routière, telles que la présence de fortes pluies en saison cyclonique, 5 élevages ont été exclus de l'analyse de prévalence et de facteurs de risque de transmission de *Salmonella* étant donné que les 3 visites prévues par exploitation n'ont pu être menées dans leur intégralité.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de deux publications soumises dans « *Epidemiology and Infection* » pour *Salmonella* et dans « *Preventive Veterinary Medicine* » pour *Campylobacter*.

Un poster a également été présenté lors de l'I3S (International Symposium Salmonella and Salmonellosis) organisé à St Malo du 28 au 30 juin 2010.

**Henry I., Reichardt J.F., Lalande F., Chemaly M., Cardinale E.** 2010. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean). In I3S Proceedings, St Malo, 28-30 juin 2010. 281-282.

1.1.1. Résumé et conclusions de la publication 1 : prévalence et facteurs de risque de transmission de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* dans les élevages de poulets de chair à la Réunion.

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'association des pratiques d'élevages et de biosécurité avec l'infection par *Salmonella* des lots de poulets de chair à la Réunion. 65 élevages ont fait l'objet de l'étude de mai 2007 à février 2009. Des échantillons de fientes ont été collectés et un questionnaire a été soumis aux éleveurs. 22% des lots sont contaminés par *Salmonella* en fin de période d'élevage avec pour sérovars majeurs identifiés : *S. Virchow*, *S. Blockley*, *S. Livingstone* et *S. Typhimurium*.

Cinq facteurs associés à un risque d'infection par *Salmonella* ont été identifiés : la proximité des champs de canne à sucre (OR=7.92 ; [1.10 ; 90.05]), le statut positif en *Salmonella* du lot précédent (OR=6.89 ; [1.30 ; 36.45]), l'âge des bâtiments de volailles (OR=5.36 ; [1.20 ; 29.52]) et l'administration d'antibiotiques chez les poussins d'un jour (OR=4.90 ; [1.10 ;

30.95]). En revanche, un facteur protecteur à été déterminé, l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection du bâtiment et des abords « diminue » le risque d'infection par *Salmonella* (OR=0.05 ; [0.01 ; 0.79]).

Cette partie de l'étude a permis de mettre en évidence les facteurs de risque majeurs d'introduction de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair à la Réunion. Certains des facteurs de risque avaient déjà été démontrés dans de précédentes études menées en Europe, aux Etats Unis et également en Afrique mais certains s'avèrent être spécifiques aux conditions locales comme la proximité des champs de canne à sucre avec les bâtiments d'élevages.

1.1.2. Publication 1 : Prevalence and risk factor for the spreading of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in broiler chickens flocks in Reunion Island

**Prevalence and risk factors for the spreading of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in broiler chickens flocks in Reunion Island**



**Figure 17 : Bâtiment d'élevage de poulets de chair (I.Henry, 2008)**

Prevalence and risk factor for the spreading of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in broiler chickens flocks in Reunion Island

\* Isabelle Henry, CIRAD- Crête d'Or Entreprise, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

Jef Reichardt, Avi pole Réunion, ZAC Bel Air, 97450, Saint Louis, Réunion

Mail : [reichardt@avipole.re](mailto:reichardt@avipole.re)

Françoise Lalande, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [f.lalande@afssa.fr](mailto:f.lalande@afssa.fr)

Marianne Chemaly, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [m.chemaly@afssa.fr](mailto:m.chemaly@afssa.fr)

Eric Cardinale, CIRAD UMR Control of animal exotic and emerging diseases, CRVOI 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [eric.cardinale@cirad.fr](mailto:eric.cardinale@cirad.fr)

## Abstract

An epidemiological study was conducted to estimate the prevalence of *Salmonella* infections and to assess the association of managerial practices, general hygiene and *Salmonella* infection in Reunionese broiler flocks. Sixty broiler farms were investigated from May 2007 to February 2009. Samples of fresh droppings were collected and a questionnaire was submitted to the farmers. 22% of the flocks were infected by *Salmonella*, mainly with Virchow, Blockley, Livingstone and Typhimurium serovars. Proximity to sugar cane fields (OR=7.92; [1.10; 90.05]), *Salmonella* status of the previous flock (OR=6.89; [1.30;36.45]), age of poultry houses (OR=5.36; [1.20;29.52]) and administration of antibiotic drugs to one day-old chicks (OR=4.90; [1.10;30.95]) increased the risk of *Salmonella* infection. Nevertheless, the use of thorough cleaning and disinfection procedures (OR=0.05; [0.01;0.79]) decreased the risk.

Keywords : *Salmonella*, risk factors, prevalence, broiler flocks, Reunion Island

## Introduction

*Salmonella* is a Gram negative bacterium in the Enterobacteriaceae family. The infection with *Salmonella* serovars has been a public health concern for many years. Non typhoidal *Salmonella* enterica is recognized as one of the most common bacteria that infects animals and may be transmitted to humans via contaminated food. Food-borne *Salmonella* causes diarrheal illness all around the world (1). Each year, an estimated 1.4 million cases of salmonellosis occur among humans in the United States (2). The incubation period of salmonellosis in humans ranges from 6 to 48 hours and clinical symptoms include fever, nausea, headache and abdominal pain. In poultry, *Salmonella* does not cause discernible illness usually; therefore, infected animals may be transmitting *Salmonella* through the food production chain and pose a threat to the consumer. *Salmonella* are found throughout the world and have been isolated from a variety of wild and domestic mammals, birds, reptiles and their environment (3, 4). Furthermore, as long as the environment is suitable, *Salmonella* will continue to multiply (5).



There are currently 2579 serovars of *Salmonella* (6); only a small number of these have been associated with human infection. Thus, many *Salmonella* serotypes common in food animals do not figure to any significant extent in human infection (7). *Salmonella* Typhimurium is one of the most common serovars isolated from humans, animals and food in Europe and the United States (8, 9). In France, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, (*S.* Typhimurium), *S.* Enteritidis, and *S.* 1,4,[5],12:i:- were those most frequently isolated in 2008 in humans with 46%, 19% and 4 % of clinical isolates, respectively (personal communication - Pasteur Institute, France).

Reunion is a French island in the south-west Indian Ocean, between Madagascar (700 km) and Mauritius (300 km). Reunion Island has a tropical climate, and possesses immense biological diversity. It is also a European territory with modern infrastructures and services for professional activities. Pig and poultry production is one of the main activities in Reunion Island. So, meat and poultry products have to be shielded from contamination to avoid public health risks to consumers and economic problems for Reunion's poultry companies.

The first commercial chicken farm in Reunion Island was constructed 60 years ago and the main slaughterhouse was built in the 1990s. The poultry houses are open on one or both sides with artificial or dynamic ventilation. Various kinds of poultry houses exist but most of all are industrial with dynamic ventilation (called "Colorado" or "Louisiane") and some others are locally made (called "pei" built from old reconverted tobacco drying sheds). The basic feeding stuffs are imported from Argentina, France, and Mauritius. Parents belong to the Hubbard strain and they are imported from continental France. The most commonly used materials for litter are wood shavings. Each year 12 million hatching eggs are produced, around 75 000 breeders are imported and 8.5 million chicks are sold on the island. Ninety eight % of chicks are produced locally and the other 2% came from hatching eggs or from day-old chicks from continental France. Typical vaccinations are against Newcastle disease and Gumboro disease.

Although some Salmonellosis impact on human health has already been identified in Reunion Island (10), the acute human salmonellosis prevalence remains unclear. In Reunion Island, except some hygienic controls carried out in farms by veterinary services, no animal epidemiological study has been undertaken yet. Nevertheless, poultry producers consider *Salmonella* to be a major problem for broiler production. In industrialized countries, broiler farms have often been identified as a primary key point for contamination of *Salmonella* of

retail poultry products (11, 12). So, measures to decrease *Salmonella* include *Salmonella* free feed and water, effective cleaning and disinfection, applying all-in all-out procedures, appropriate biosecurity measures as control of rodents (13, 15).

Thus, our objectives were (i) to assess *Salmonella* prevalence in broiler chicken flocks in Reunion Island and to detect predominant serovars; (ii) to identify risk factors for *Salmonella* infection associated with presence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

## Material and methods

### Sample collection

The study was carried out from May 2007 to February 2009 and involved 65 broiler farms randomly selected among 110 poultry farms (figure 1). Reunion's poultry meat industry produced around 10000 tons in 2009, which represented an average of 5 800 000 birds with a typical weight per chicken of 1.762kg. Broilers were slaughtered at around 45 days old. The industry aims to increase production by 3% per year. To reach this objective, the whole poultry production industry has improved its efficiency in procedures and costs. At the present time, chicken meat production is locally consumed (66% local production and 33% imported frozen from France). Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and an economic problem particularly because the Reunion island population consumes a lot of chicken (more than 35 kg/cap/yr) and also eats 100% chicken sausages.

For our statistical analysis, only 60 broiler farms were considered (figure 1) because among our selection, 2 farmers refused to participate to the study and because of cyclonic conditions, 3 more had been excluded. Only one poultry house was studied in each farm. The address of broiler farms and the day of placing chicks were given by the poultry industry. The aim of study was explained to the farmers before any visit.

### Data collection

Each farm was visited three times. The first visit was made before slaughtering at 43 days old to define the previous flock's *Salmonella* status. The second visit was made just 48 hours before the placement of chicks to assess the efficiency of cleaning and disinfection procedures. The third visit occurred at the end of rearing period of the study flock between day 43 and day 45 days. Data were collected from a questionnaire administered to each

farmer addressing poultry house characteristics, day-old chicks placing, management of dead birds, control of rodents and other domestic animals, watering practices, farm staff, cleaning and disinfection. This questionnaire was always submitted by the same person and it was pre-tested in a preliminary study. The final questionnaire was closed-ended questions. Only the manager was interviewed.

At the first and the third visits, 4 pooled samples of five fresh droppings were collected and we also used one sterile pairs of gauze socks (Sodibox, La Forêt-Fouesnant, France) inside the poultry house. The socks consisted of an elastic cotton tube pulled over the investigator's over boots. This number of samples should detect an infected flock with a within flock prevalence >5% with  $P < 0.05$ , given that the sensitivity of the test is 100% (16). At the second visit, only 1 pair of gauze socks was used on the floor in the poultry house. Fresh droppings and the soiled pair of socks were placed in a sterile plastic bag using a sterile glove and transported to the laboratory within 4–6 h after sampling.

#### Isolation procedure and identification

The samples were analysed individually. *Salmonella* strains were isolated by standard culture method according to the norm ISO 6579. All *Salmonella* isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme (17) and using slide agglutination test with *Salmonella* polyvalent O and H antisera according to the Diagnostic Pasteur, Paris, France.

#### Statistical analysis

The flock was the unit of observation. A flock was infected by *S. enterica* subsp. *enterica* if at least one of the samples (among the 4 pools of fresh droppings and the pair of gauze socks) from the poultry house collected at the end of rearing period tested positive. Thus, the outcome variable was dichotomous (infected versus non-infected).

All variables were categorical with a number of categories per variable limited. Each category exhibited a frequency >10%. All bivariate relationships between explanatory variables were checked ( $\chi^2$ ). For bilateral relationships evidencing strong statistical association and biological plausibility, the one most related to the outcome variable was chosen. For example, the variable “specific shoes” was strongly associated with the variable “specific clothes” and

only “specific shoes” has been kept for further analysis because it was the more related to *Salmonella* status.

### Statistical procedure

To assess the relationship between explanatory variables and *Salmonella* status of the flock, two stage procedures were used. In the first step, a univariable analysis was performed to relate *Salmonella* infection of the flock to each variable. These variables were selected from a preliminary step aimed at lowering the chance of obtaining results affected by multicollinearity in the dataset (18). Factors associated (Pearson  $\chi^2$  test,  $P < 0.25$ ) with *Salmonella* infection of the flock were entered into a full model on R software for multivariable analysis (table2). The second step included a multiple logistic regression. Logistic regression was used according to the method described by Hosmer and Lemeshow (2000). Contribution of each factor to the model was tested with a likelihood-ratio  $\chi^2$  through a stepwise procedure (backward and forward). Goodness-of-fit of the final model was assessed using Pearson  $\chi^2$ , Deviance and the Hosmer–Lemeshow tests (19). Interactions were not tested (because of the small sample size).

### Results

#### Prevalence

In our study, 13 (22%) out of 60 chicken broiler flocks were infected by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* at the end of the rearing period. The main serovars identified were *S. Virchow* (38%), then *S. Blockley* and *S. Livingstone* (15%) and *S. Typhimurium*, *S. Hadar* and *S. Senftenberg* (8%). *Salmonella* infection of the flock was associated with the *Salmonella* status of the previous flock and to the *Salmonella* status of day-old chicks (Table 2).

#### Risk Factors

The risk of broiler flock infection with *Salmonella* was increased when sugar canes fields were close to the poultry house (OR=7.92; [1.1;90.05]), when the previous flock was also infected by *Salmonella* (OR=6.89; [1.3;36.45]), when the poultry house was older than 15 years (OR=5.36; [1.2;29.52]), when antibiotic drugs were administrated to day-old chicks

(OR=4.9; [1.1;30.95]). Nevertheless, the risk for *Salmonella* infection decreased when sanitary measures such as cleaning and disinfection procedures were applied efficiently (OR=0.05; [0.01;0.79])(table 3).

## Discussion

This is the first time that a longitudinal epidemiological survey has been undertaken in the Indian Ocean area. This study was conducted upon the request of the poultry industry. Nevertheless, in tropical countries, *Salmonella* serotypes in poultry have also been investigated in Malaysia (20), in Japan (21), in India (22), and in Taiwan (23). In Reunion Island, only one outbreak of *Salmonella* Weltevreden was investigated in 2008 after a case of food poisoning, but reservoirs remained unknown (10).

The willingness of farmers to cooperate during the lifespan of the flock might well have led to a selection bias. But, both the data collection (i.e. the questionnaire and *Salmonella* sampling) and the 21-month duration of this study, which was carried out by only one trained person, could have helped to improve the accuracy of the results. Nevertheless, the proportion of *Salmonella* infected flocks should be interpreted with caution; actually, even if our poultry farms were randomly selected, the sensitivity of the method was not clearly known.

In our study, 22% of the broiler flocks were infected with *Salmonella* at the end of the rearing period. This result is in conforms with 23.7% prevalence generally observed in European Union (24). Nevertheless prevalence of *Salmonella* spp. in broiler flocks is higher than in continental France. In developed countries, the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks varies from country to country: 8.6%  $\pm$  1.5% in France (Personal communication from Pasteur Institute, France); 4.87% in the central region of the kingdom of Saudi Arabia, (25),10,7% in United Kingdom (26), 3% in Lithuania (27) and 34.7% in western Japan (28).

In Reunion Island, the most prevalent *Salmonella* serovars among broilers were *S. Virchow*, *S. Blockley*, *S. Livingstone*, *S. Typhimurium* and *S. Weltevreden*. *Salmonella* Virchow has also been frequently identified in poultry in the Netherlands (29), in Spain (30), in Israël (31), in Northern India (32) and Korea (33). *Salmonella* Weltevreden was also identified in Thailand (34) and Vietnam (35). *S. Blockley* was first described in the USA in 1955 and was also found in Europe around the same time. Prevalence of *S. Blockley* was reported in Europe as early as 1976 but most reports published stated the serovar emerged in the early 1990s. In tropical countries, *Salmonella* Blockley was also identified in Asia (36) where it was associated with poultry house environment (from floor litter, walls, drinking water, waste water, dust, and

soil). In Malaysia *S. Blockley* appears to be widely spread throughout the country (37). The prevalence of this serotype in broiler flocks was similar to our results. In Malaysia, *S. Blockley* was also one of the four most common serovars isolated in broilers (37). In Reunion Island, it may be possible that the emergence of *S. Blockley* could be associated with imported poultry products from South East Asia (38). For *Salmonella* Livingstone, the prevalence of 15% is in accordance with a survey carried out in the central region of Saudi Arabia (25).

Five main risk factors for *Salmonella* infection of the flock at the end of the rearing period were identified from our study. Most of them have been reported in the literature (39) but some are related to the specific conditions of Reunion Island as the proximity of poultry houses with sugar cane fields. The first risk factor identified was the presence of sugar cane fields next to poultry houses. As demonstrated by Meerburg and Kijlstra (2007), rodents are often implicated in the infection of poultry. Indeed, rodents have been recognized as a vehicle for *Salmonella* (4, 33). In Reunion Island, rodents are a real problem because most of the territory is covered with sugarcane fields, which provide a natural habitat for rodents, and are usually very close to poultry farms (40, 41).

The *Salmonella* status of the previous flock was the second main risk factor identified. The presence of resident *Salmonella* inside poultry houses contributed to infection of the next flock. This observation is in agreement with the descriptive findings of Namata (42) and confirmed the results of Baggesen et al. (43) who reported the *Salmonella* contamination of the previous flock to be a major risk factor for the following one. As Lahellec et al. (44) indicated, if a broiler flock is infected by *S. enterica*, the bacteria can persist if the cleaning and disinfection procedures are not adequate (32). Important is whether the type of houses allows for satisfactory cleaning (Angen et al., 1996).

The third risk identified was the age of the poultry house, particularly when the building is more than 15 years old. This observation could be correlated with the presence of porous walls built with concrete, particularly in poultry houses built from old reconverted tobacco drying sheds. This structure could contribute to the persistence of *Salmonella* because these walls are difficult to clean and because crevices could constitute recesses full of faeces contributing to development of bacteria. This factor could be linked to the inadequate cleaning and disinfection procedures of poultry houses and their surroundings, possibly

leading to the persistence of *Salmonella* in the house environment, as already demonstrated previously in other studies (13, 45).

The fourth factor was the administration of antibiotic drugs to one day-old chicks. Prophylactic use of antibiotic drugs against stress and mortality during the first day of life might reduce the number of colonized and shed bacteria (46). And because of less competition, *Salmonella* may find an easy way to colonize broiler's intestines.

Thorough cleaning and disinfection of poultry house and surroundings decreased the risk for a flock to be *Salmonella* infected. Cleaning is an essential stage for the removal of organic and inorganic debris from a surface which might support micro-organisms and provide insulation that reduces the efficiency

of disinfecting procedures (43). In Reunion island, this stage is not always respected and is particularly difficult in the poultry houses that were built with old materials. Alternatively, the contamination of the flock could be external (e.g. contamination of the surroundings during the removal of the birds and manure) and that is why farmers should pay attention at a good maintenance of surroundings. As Lahellec and Colin (44) showed, when cleaning and disinfection was carried out ineffectively, carry-over of infection was the predominant risk factor in broiler production.

The results of this study indicate that poultry is a potential vector for *Salmonella* in Reunion Island. Five risk factors for *Salmonella* contamination of the flock were identified. Some of them have been described in the literature but there were some very specific to Reunion island. Information about major risk factors to be tackled is necessary to formulate effective preventive and control strategies and this could be reached by collaboration between poultry companies, microbiologists and epidemiologists. Moreover, this study has provided a lot of information to control *Salmonella infection* in chicken broiler flocks in Réunion and recommendations for farmers.

#### Acknowledgements

We are very grateful to the poultry firm Avi-pole Reunion for their assistance with sample collection on poultry farms. We particularly extend our thanks to Jef Reichardt, Jacky Berby,

Jimmy Hoarau, François Penverne and Yvon Euzen. We thank all farmers for their collaboration during the study and their answers to the questionnaires.

Thanks to Afssa of Ploufragan for allowing me to use their serotyping equipment. We would also like to thank Frederic Chiroleu and Claire Bissery for their help in data «process»ing.

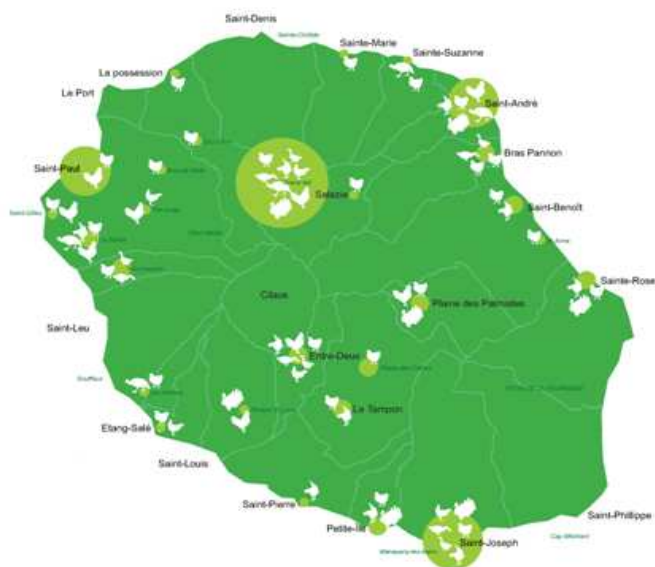


Figure 1: Reunion Island with the location of 60 broiler farms (may 2007 to February 2009)

Table 1: Definition of explanatory variables included in analysis of *Salmonella* contamination and percentage of flocks for each level of the variables (60 flocks: may 2007- February 2009).)

Definition of variables	Level	Percentage (%)
Slaughtering season	Summer	17.0
	Autumn	13.5
	Winter	39.0
	Spring	30.5



Number of broilers into poultry house	$\leq 7\ 700$	47.5
	$>7\ 700$	52.5
Access to the farm	Fence around the farm	42.4
	No fence	57.6
Poultry Houses		
- Names of poultry houses <sup>a</sup>	“Louisiane” and “Colorado”	81.3
	“Péi”	18.7
- Other poultry houses within 500m <sup>a</sup>	Yes	47.4
	No	52.6
- Cemented access around the house <sup>a</sup>	Yes	54.2
	No	45.8
- Type of ventilation	Static	30.5
	Dynamic	69.5
- Number of broiler houses in the farm	=1	25.4
	$\geq 2$	74.6
- Age of Poultry house <sup>a</sup>	$\leq 15$ yrs	57.6
	$>15$ yrs	42.4
- Sugar cane fields nearby <sup>a</sup>	Yes	71.2
	No	28.8
- Number of silos	=1	23.7
	$\geq 2$	76.3

- Equipment lending	Yes	15.2
	No	84.8
-unloading area nearby <sup>a</sup>	Yes	27.1
	No	72.9
- Changing room divided into two areas (dirty and clean areas)	Yes	41.0
	No	59.0
- Working washbasin in the changing room (water, soap and towel)	Yes	42.4
	No	57.6
Conditions of chick placing		
- bird density at day 1 (chicks/m2) <sup>a</sup>	≤18	62.7
	> 18	37.3
- antibiotic treatment at day 1 <sup>a</sup>	Yes	59.3
	No	40.67
	Yes	18.6
- Control of one day old chicks	No	81.4
Dead bird storage		
	Frozen	89.8
	Not Frozen	10.2
Control of Rodents (baits) <sup>a</sup>		
	Yes	96.0
	No	4.0
Presence of litter-beetles in the poultry house		
	Yes	69.5
	No	30.5

Non commercial or ornamental poultry on the farm	Yes	17.0
	No	
Presence of feral birds in the poultry house	Yes	24.0
	No	76.0
Other animals in the farm (sheep, cattle, dogs, cats)	Yes	56.0
	No	44.0
Feeding and watering practices		
- Origin of drinking-water	Public	84.7
	Other (well, bore-hole)	15.3
- Treatment of water	Yes	89.8
	No	10.2
- Type of drinkers	Drinkers	83.0
	Others (pan...)	17.0
- Poultry feeders	Automatic	86.4
	Manual	13.6
- Poultry feeder cleanliness	Yes	69.5
	No	30.5

Manure Disposal	In the farm	8.5
	Outside from the farm	91.5
Flock characteristics		
- Antibiotic treatment during rearing	Yes	59.3
	No	40.7
Farm Staff		
- Family poultry house staff	Yes	52.5
	No	47.5
- Specific clothes	Yes	59.0
	No	41.0
- Specific shoes	Yes	76.0
	No	24.0
Litter	Yes	42.4
- Humid litter	No	57.6
- Litter addition during the rearing time	Yes	47.4
	No	52.6
- Use of disinfectant at one day old	Yes	33.8
	No	66.2
-		

- Use of disinfectant during the rearing period	Yes	45.8
	No	54.2
Cleaning and Disinfection		
- Cleaning surroundings	Yes	52.6
	No	47.4
- Use of detergent for cleaning	Yes	35.6
	No	64.4
- Disinfection (including water system under high pressure)	Yes	27.1
	No	72.9
- 2 <sup>nd</sup> Disinfection	Yes	88.1
	No	11.9
Cleaning and Disinfection of poultry house surroundings <sup>a</sup>		
	Yes	94
	No	6
Silo fumigation		
	Yes	83
	No	17

a : Variable retained after univariate analysis for the logistic model

Table 2: *Salmonella* infection of poultry flocks at the end of the rearing period according to *Salmonella* infection of the previous flock and according the post disinfection procedures (60 flocks, May 2007 – February 2009, Reunion island)

<i>Salmonella</i> infection	Serotype	<i>Salmonella</i> infection at the end of the rearing period (number of flocks)												
		S. Agona	S. Arizonae	S. Blockley	S. Hadar	S. Livingstone	OMC HMC LW	S. Saint Paul	S. Senftenberg	S. Typhimurium	S. Virchow	S. Weltevreden	Négatif	
Previous flock	S. Agona													1
	S. Arizonae													
	S. Blockley			1										1
	S. Hadar													2
	S. Livingstone					1								1
	S. Montevideo													
	OMC HMC LW													1
	S. Saint Paul								1					
	S. Senftenberg									1				
	S. Typhimurium										1			1
	S. Virchow											3		4
	S. Weltevreden													
Négatif			1	1	1	2	0	1	1	2	2	3	50	
Total		0	1	2	1	3	0	1	1	3	5	3	61	
Post disinfection after cleaning and disinfection	S. Agona												1	
	S. Arizonae												1	
	S. Blockley													
	S. Hadar												1	
	S. Livingstone													
	S. Montevideo													
	OMC HMC LW												1	
	S. Saint Paul												1	
	S. Senftenberg													
	S. Typhimurium												1	
	S. Virchow											4		
	S. Weltevreden													
Négatif			1	2	1	3	1	1	1	3	1	3	55	
Total		0	1	2	1	3	1	1	1	3	5	3	61	

The empty cells mean no poultry flocks infected by *Salmonella*

Table 3: Final logistic regression model for risk factors for *Salmonella* infection of broiler flocks in Reunion Island (60 flocks: may 2007, February 2009).

Variables	Study flocks S+ (%) <sup>a</sup>	Logistic regression model <sup>b</sup>	
		OR	90% CI (OR) <sup>d</sup>
Proximity of sugar cane fields			
Yes (<500m)	26.2	7.92	1.10 – 90.05
No (>500m)	11.8	1	-
Salmonella status of previous flock <sup>c</sup>			
S+	53.3	6.89	1.30 – 36.45
S-	11.4	1	-
Age of poultry house			
>15 years	32	5.36	12 – 29.52
<15 years	14.7	1	-
Use of antibiotic drugs at day one			
Yes	31.4	4.90	1.10 -30.95
No	8.3	1	-
Cleaning and disinfection of poultry house and close surroundings			
Yes	19.6	0.05	0.001 – 0.79
No	66.6	1	-

<sup>a</sup> *Salmonella* infected flocks at the end of the rearing period

<sup>b</sup> Intercept = -2.711, Null deviance = 62.23, AIC=53.73, Model df =5 ( $P<0.001$ )

<sup>c</sup> *Salmonella* status (S+: *Salmonella* infected; S-: *Salmonella* free)

<sup>d</sup> OR significant also at  $P<0.05$  (likelihood-ratio  $\chi^2$  test)

## References

- (1) Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection* 2006; 8(7): 1891-7.
- (2) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5(5): 607-25.
- (3) Hughes LA, Shopland S, Wigley P, et al. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005-2006. *Bmc Veterinary Research* 2008; 4.
- (4) Meerburg BG J-RW, Wagenaar JA, Kijlstra A. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(1): 960-2.
- (5) NPCA. *Salmonella*. NPCA TECH REL 1967: 8-67.
- (6) Grimont PAD, Weill FX. *Formules antigéniques des sérovars de Salmonella*. 2007.
- (7) Humphrey T, Jorgensen F. Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using campylobacter and salmonella as examples. *Meat Science* 2006; 74(1): 89-97.
- (8) Doran G, Morris D, O'Hare C, et al. Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(12): 8236-40.
- (9) Martinez-Urtaza J, Liebana E, Garcia-Migura L, Perez-Pineiro P, Saco M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70(7): 4030-4.
- (10) D'ortenzio E, Weill F, Ragonneau S, Lebon JA, Renault P, Pierre V. First report of a *Salmonella enteric* serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. *Euro surveillance* 2008; 13(7-9): 393-5
- (11) Wegener HC, Hald T, Wong DL, et al. *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9(7): 774-80.



- (12) Namata H, Meroc E, Aerts M, et al. Salmonella in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 2008; 83(3-4): 323-36.
- (13) Rose N, Beaudeau F, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P. Risk factors for Salmonella persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. *Preventive Veterinary Medicine* 2000; 44(1-2): 9-20.
- (14) Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. Salmonella enterica Serotype enteritidis in table egg layer house environments and in mice in US layer houses and associated risk factors. *Avian Diseases* 2003; 47(1): 134-42.
- (15) Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. A longitudinal study of environmental salmonella contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathology* 2007; 36(3): 187-97.
- (16) Martin SW, Meek, P. W. *Veterinary Epidemiology: Principles and Methods*: Iowa State University Press/Ames, 1987.
- (17) Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, Gheesling LL. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 2001; 152(10): 907-9.
- (18) Dohoo IR, Ducrot C, Fourichon C, Donald A, Hurnik D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Prev Vet Med* 1996; 29: 221-39.
- (19) Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*. New York: Wiley, 2000: 373.
- (20) Arumugaswamy RK, Rusul G, Hamid SNA, Cheah CT. Prevalence of Salmonella in Raw and Cooked Foods in Malaysia. *Food Microbiology* 1995; 12(1): 3-8.
- (21) Shahada F, Chuma T, Okamoto K, Sueyoshi M. Temporal distribution and genetic fingerprinting of Salmonella in broiler flocks from southern Japan. *Poultry Science* 2008; 87(5): 968-72.
- (22) Murugkar H, Rahman H, Kumar A, Bhattacharyya D. Isolation, phage typing & antibiogram of Salmonella from man & animals in northeastern India. *Indian Journal of Medical Research* 2005; 122(3): 237-42.

- (23) Tsai HJ, Hsiang PH. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of Salmonella and Campylobacter in ducks in Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005; 67(1): 7-12.
- (24) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A. *The EFSA Journal* (2007) 98, 1-85; 98: 1-85.
- (25) Saad AM, Almujaali DM, Babiker SH, Shuaib MAM, Abdelgadir KA, Alfadul YA. Prevalence of Salmonellae in broiler chicken carcasses and poultry farms in the central region, KSA. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2007; 6(2): 164-7.
- (26) Snow LC, Davies RH, Christiansen KH, et al. Survey of the prevalence of Salmonella on commercial broiler farms in the United Kingdom, 2005/06. *Veterinary Record* 2008; 163(22): 649-54.
- (27) Pieskus J, Milius J, Michalskiene I, Zagrebneviene G. The distribution of Salmonella serovars in chicken and humans in Lithuania. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 2006; 53(1): 12-6.
- (28) Murakami K, Horikawa K, Ito T, Otsuki K. Environmental survey of salmonella and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiology and Infection* 2001; 126(2): 159-71.
- (29) van Asselt ED, Thissen J, van der Fels-Klerx HJ. Salmonella serotype distribution in the Dutch broiler supply chain. *Poultry Science* 2009; 88(12): 2695-701.
- (30) Marin C, Lainez M. Salmonella detection in feces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. *Poultry Science* 2009; 88(9): 1999-2005.
- (31) Lublin A, Sela S. The Impact of Temperature During the Storage of Table Eggs on the Viability of Salmonella enterica Serovars Enteritidis and Virchow in the Eggs. *Poultry Science* 2008; 87(11): 2208-14.
- (32) Yadav AS, Singh RP, Kirupasankar M. Occurrence of Salmonella in chicken eggs collected from selected poultry farms and marketing channels. *Indian Journal of Animal Sciences* 2008; 78(8): 887-90.

- (33) Kim A, Lee YJ, Kang MS, Kwag SI, Cho JK. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* 2007; 8(2): 155-61.
- (34) Padungtod P, Kaneene JB. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 108(3): 346-54.
- (35) Vo ATT, van Duijkeren E, Fluit AC, et al. Distribution of *Salmonella enterica* Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the Dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Veterinary Microbiology* 2006; 113(1-2): 153-8.
- (36) Limawongpranee S, Hayashidani H, Okatani AT, Hirota C, Kaneko K, Ogawa M. Contamination of *Salmonella blockley* in the environment of a poultry farm. *Avian Diseases* 1999; 43(2): 302-9.
- (37) Rusul G, Khair J, Radu S, Cheah CT, Yassin RM. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, «process»ing plants and farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 1996; 33(2-3): 183-94.
- (38) Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, et al. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003; 8(2): 41-5.
- (39) Rose N, Beaudeau F, Drouin P, Toux JY, Rose V, Colin P. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Prev Vet Med* 1999; 39(4): 265-77.
- (40) Taylor KD. Rodent problems in Tropical agriculture. *PANS* 1972; 18(1): 81-8
- (41) Pascal M, Lorvelec O, Borel G, Rosine A. Structures spécifiques des peuplements de rongeurs d'agro Ecosystèmes et d'écosystèmes "naturels" de la Guadeloupe et de la Martinique. *Rev Ecol (terre Vie)* 2004; 59: 283-92.
- (42) Namata H, Welby S, Aerts M, et al. Identification of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 2009; 90(3-4): 211-22.
- (43) Baggesen DL, Olsen JE, Bisgaard M. Plasmid profiles and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from successive flocks of chickens on three parent stock farms. *Avian Patho* 1992; 21: 569-79.

- (44) Lahellec C, Colin P, Bennejean G, Paquin J, Guillerm A, Debois JC. Influence of resident Salmonella on contamination of broiler flocks. Poultry Science 1986; 65(11): 2034-9.
- (45) Higgins R, Malo R, Reneroberge E, Gauthier R. Studies on the Dissemination of Salmonella in 9 Broiler-Chicken Flocks. Avian Diseases 1982; 26(1): 26-33.
- (46) Chriel M, Stryhn H, Dauphin G. Generalised linear mixed models analysis of risk factors for contamination of Danish broiler flocks with *Salmonella* Typhimurium. Prev Vet Med 1999; 40(1): 1-17.

*1.1.2.1. Poster : Epidemiological analysis of Salmonella enterica subsp. enterica from chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean)*

## **Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken broiler flocks in la Reunion Island (Indian Ocean)**

Isabelle Henry<sup>a</sup>, Jef Reichardt<sup>b</sup>, Françoise Lalande<sup>c</sup>, Marianne Chemaly<sup>c</sup>, Eric Cardinale<sup>d</sup>,

<sup>a</sup>Cirad - Crête d'Or Entreprise, Sainte Clotilde, Reunion

<sup>b</sup>Avi- pôle Réunion – Saint Louis, Reunion

<sup>c</sup>AFSSA- HQPAP – Ploufragan, France

<sup>d</sup>Cirad-UMR15- CRVOI – Sainte Clotilde, Réunion

### ***INTRODUCTION***

Poultry production is one of the main activities in Reunion Island. So meat and poultry products have to be shielded from contamination to avoid public health risks to consumers and financial problems for the poultry company. Reunion's poultry meat industry produced around 10 tons in 2009, which represented an average of 5 800 000 birds with a typical weight per chicken of 1.762kg. Broilers were slaughtered at around 45 days old. At the present time, chicken is locally consumed (66% local production and 33% imported frozen).

Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and an economic problem particularly because Reunion Island population consumes a lot of chicken

(more than 40 kg per person per year) and also eats 100% chicken sausages.

Although, some Salmonellosis impact on human health has already been identified in Reunion Island, the acute salmonellosis prevalence remains unclear.

Thus, our objectives were (i) to define *Salmonella* prevalence in broiler flocks and (ii) to define specific practices associated with presence of *Salmonella*.

### ***METHODS AND MATERIALS***

The study was carried out from May 2007 to February 2009 and involved 60 broiler farms randomly selected among those affiliated with Production Company in Reunion Island. Only one poultry house was studied in each farm. The location and

the day of placing chicks were given by the poultry company.

A total of 720 samples were collected: litter, faeces, swabs on wall and equipment, changing room, surroundings and beetles. Each chicken farm was visited three times. The first visit was made before slaughtering at 43 days old to define the previous flock's *Salmonella* status. The second visit was made just 48 hours before the settle of chicks to assess the efficiency of cleaning and disinfection procedures. The third visit occurred at the end of rearing period of the study. Data were collected from a questionnaire administered to each farmer concerning poultry house characteristics, practices and treatment on day-old chicks, management of dead birds, control of rodents and other domestic animals, watering practices, farm staff.

The flock was the unit of observation. A flock was infected by *S. enterica* subsp. *enterica* if at least one pooled sample taken from the poultry house collected at the end of rearing period tested positive. Thus, the outcome variable was dichotomous (infected versus non-infected).

#### Statistical procedure

To assess the relationship between explanatory variables and *Salmonella* status of the flock, two stage procedures

were used. Factors associated (Pearson  $\chi^2$  test,  $P < 0.25$ ) with salmonella infection of the flock were input a full model on R software for multivariable analysis. The second step included a logistic multiple regression model (1). Contribution of each factor to the model was tested with a likelihood-ratio  $\chi^2$  through a stepwise procedure.

### **RESULTS**

In our study, 22% of chicken broiler flocks were infected by *Salmonella* at the end of the rearing period (Table 1). The main serovar identified was *S. Virchow* (38%), then *S. Livingstone* (15%) and *S. Typhimurium*, *S. Hadar* and *S. Senftenberg* (8%). The major risk factors are described in Table 1.

### **DISCUSSION**

In our study, 22% of the broiler flocks were infected with *Salmonella*. This result is in conformity with 23.7% prevalence generally observed in European Union. Prevalence of *Salmonella* spp. in broiler flocks is higher than in continental France. In developed countries, the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks varies from country to country:  $8.6\% \pm 1.5\%$  in France (Personal communication); most of risk factors identified in this study have been

reported in the literature (2) but some are specific and related to conditions in Reunion Island.

The first risk factor identified was the presence of sugar cane and plant fields next to poultry houses. Rodents are a legitimate problem because most of the territory is covered with sugarcane fields, natural habitats of rodents that can be very close to poultry farms (3). Rodents have been recognized as a vehicle of *Salmonella* and are often implicated in the infection of poultry (4).

The *Salmonella* status of the previous flock identified is in agreement with the descriptive findings of Namata (5). The age of the poultry house (> 15 years old, often built with tobacco drier) was often correlated with presence of porous walls that could contribute to the persistence of *Salmonella* because these walls are difficult to clean and because crevices could constitute recesses full of faeces contributing to development of bacteria. The administration of antibiotic drugs to one day-old chicks often used as prophylactic drugs against stress and mortality during the first day of life might reduce the number of colonized and shed bacteria (6).

The results of this study indicate that poultry is a potential vector for *Salmonella* in Reunion Island.

## **REFERENCES**

- (1) Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000, Applied Logistic Regression. Wiley, New York, 373 p
- (2) Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., and Colin, P. (1999) Risk factors for *Salmonella enterica* subsp *enterica* contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 39: 265.
- (3) Pascal, M., Lorvelec, O., Borel, G., and Rosine, A. (2004) Structures spécifiques des peuplements de rongeurs d'agro Ecosystèmes et d'écosystèmes "naturels" de la Guadeloupe et de la Martinique. *Rev. Ecol (terre Vie)* 59: 283.
- (4) Meerburg BG, J.-R.W., Wagenaar JA, Kijlstra A. (2006) Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* 72: 960.
- (5) Namata, H., Welby, S., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J.C., Imberechts, H., Vermeersch, K., Hooyberghs, J., Meroc, E., and Mintiens, K. (2009) Identification



of risk factors for the prevalence and persistence of *Salmonella* in Belgian broiler chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 90: 211.

(6) Chriel, M., Stryhn, H., and Dauphin, G. (1999) Generalised linear mixed models analysis of risk factors for contamination of Danish broiler flocks with *Salmonella typhimurium*. *Preventive Veterinary Medicine* 40:1.

**ACKNOWLEDGMENTS:** We are very grateful to Avi-pôle Réunion, AFSSA and le Cirad.

**TABLES AND FIGURES**

Table 1: Prevalence of *Salmonella* isolated at the end of the rearing period

Variables	Logistic regression model	OR	90% CI
Proximity of production to sugar cane and banana		7,92	1.1, 90.05
<i>Salmonella</i> status of previous flock		6,89	1.3, 36.45
Age of poultry house (more than 15 years)		5,36	1.2, 29.52
Use of antibiotics at Day1		4,9	1.1, 30,95

1.1.3. Résumé et conclusion de la publication 2 : prévalence et facteurs de risque d'introduction de *Campylobacter* spp. dans les élevages de poulets de chair à la Réunion

L'étude portant sur la prévalence et l'identification des facteurs de risque d'infection de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair a été réalisée de mai 2007 à février 2009 dans 50 élevages. L'objectif de ce travail était de déterminer la prévalence de *Campylobacter* dans les productions de poulets de chair et de définir les pratiques à risque associées à l'infection par *Campylobacter*. Pendant les visites, des échantillons de fientes ont été prélevés. La détection de *Campylobacter* dans les prélèvements a été réalisée selon la norme ISO 10272. L'identification est basée sur la morphologie des colonies par examen microscopique et par des tests biochimiques. La confirmation génétique a été réalisée par PCR multiplex. La prévalence de *Campylobacter* est de 54% avec pour espèce majeure : *Campylobacter coli* (30%). *Campylobacter jejuni* a été détecté dans 17% des isolats et les infections mixtes *Campylobacter coli* / *Campylobacter jejuni* représentaient 7% des isolats.

Le risque d'infection par *Campylobacter* augmente lorsqu'il y a plus de 2 bâtiments d'élevage sur l'exploitation (OR=11.20 ; [1.05 ; 92.00]), lorsqu'il n'y a pas de détergents utilisés pour le nettoyage (OR=13.1 ; [2.10 ; 78.30]). En revanche, le risque diminue lorsque les exploitations sont séparées d'une distance supérieure à 500m (OR=0.27 ; [0.10 ; 0.80]), et lorsque l'éleveur pulvérise un désinfectant sur les poulets au cours de la période d'élevage (OR=0.15 ; [0.10 ; 0.75]).

La prévalence détectée dans les lots de poulets est inférieure à celle reportée en France en 2007 (80.2%). A l'opposé d'autres études, *Campylobacter coli* est davantage détectée que *Campylobacter jejuni* mais la faible prévalence des espèces mixtes est en adéquation avec des études menées précédemment. Le non usage de bonnes pratiques de nettoyage et de désinfection dont l'absence de l'utilisation d'un détergent augmente le risque majeur d'infection par *Campylobacter*. En effet, les mauvaises pratiques d'hygiène avaient déjà été identifiées comme pratique à risque.

1.1.4. Publication 2: Prevalence and Risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks on Reunion Island (Indian Ocean).

**Prevalence and Risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks on Reunion Island (Indian Ocean)**



**Figure 18 : Poulets de chair (I.Henry, 2008)**

Prevalence and Risk factors for *Campylobacter* spp. in chicken broiler flocks on Reunion Island (Indian Ocean)

\*Isabelle Henry, CIRAD- Crête d'Or Entreprise, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

Jef Reichardt, Avi pole Réunion, ZAC Bel Air, 97450, Saint Louis, Réunion

Mail : [reichardt@avipole.re](mailto:reichardt@avipole.re)

Martine Denis, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [m.denis@afssa.fr](mailto:m.denis@afssa.fr)

Eric Cardinale, Cirad-CRVOI Bios, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [eric.cardinale@cirad.fr](mailto:eric.cardinale@cirad.fr)

#### Abstract

Our objectives were to determine *Campylobacter* prevalence in broiler chicken flocks in Reunion Island and to define specific practices associated with presence of *Campylobacter* spp. Infection in Reunionese broiler flocks. Fifty broiler flocks were studied in Reunion Island from May 2007 to February 2009. A questionnaire was submitted to the farmers and samples of fresh droppings were collected to assess the flock's *Campylobacter* status. Fifty four percent of the flocks were infected by *Campylobacter* spp; 30 % were infected with *C. coli* and 17% with *C. jejuni*; only 7% were infected by both species at the same time. Several poultry houses in the farm (OR=11.2 [1.05-92]) and cleaning without any detergent (OR=13.1 [2.1-78.3]) increased the risk of *Campylobacter* infection. A distance higher than 500m between broiler farms (OR=0.27 [0.1-0.8]) and use of disinfectant during the rearing period decreased this risk of infection (OR=0.15 [0.1-0.75]).

## Introduction

Thermophilic *Campylobacter* species are recognized as being the most common bacterial cause of gastroenteritis in the world. It is predominantly *C. Jejuni* and *C. Coli* which cause acute bacterial food-borne gastroenteritis (World health Organisation: [www.who.int/mediacentre/factsheets](http://www.who.int/mediacentre/factsheets); Moore et al., 2005). As an example, *Campylobacter* remains a leading cause of acute bacterial enteritis in the USA, with an estimated 2.4 million cases annually (Mead et al., 1999). *Campylobacter* is an emerging public health problem for both developed and developing countries (Prasad et al., 2001) but campylobacteriosis incidence remains unknown in Reunion Island. The most important post infectious manifestation is Guillain-Barré syndrome (Smith, 1995). Generally, the most severe cases are induced by *C. jejuni* and Guillain-Barré syndrome occurs in 1 per 3000 *C. jejuni* infections (Leonard et al., 2004) but the risk of severe infection developing may be 40 times higher for subjects who are HIV positive (Sorvillo et al., 1991). In 2007 a total of 200 507 confirmed cases of Campylobacteriosis were reported from 24 European countries corresponding to an incidence of 45.2 cases per 100 000 inhabitants. Campylobacteriosis also has a significant economic impact when taking into account loss of working hours and health care costs (Roberts et al., 2003).

Poultry is regarded as one of the most important reservoirs for *Campylobacter* and represents a very important vehicle for the transmission of *Campylobacter* to humans by contaminated food, particularly through the consumption of raw or undercooked products (Humphrey et al., 2007). As various studies have shown, *Campylobacter* has infected broiler chickens in poultry farms (Stern et al., 2001) and in retail stores (Zhao et al., 2001); but this bacteria has also been isolated from domestic animals, including cattle, swine and sheep (Diker et al., 2000).

Poultry become contaminated by *Campylobacter* spp. particularly through faeces, foodstuffs, litter and also aerosol (JacobsReitsma, 1997). Intestinal colonization in broiler chicks is rarely detected before the age of 7 days. Once colonized, chicks remain asymptomatic carriers until they reach slaughter age. Nevertheless, the epidemiology of *Campylobacter* in broiler production is still, not fully understood (Humphrey et al., 2007) and the importance of vertical transmission from parents to their offspring is unclear (Callicott et al., 2006). Horizontal transmission is, at this time, believed to be responsible for flock colonization (Bull et al., 2006).

Reunion Island has been producing industrial poultry for 60 years and is one of the main industries on the island. Poultry status is particularly important because it is the most eaten meat in the island and in the Indian Ocean and because 100% chicken sausages (meat and skin) are often prepared.

Thus, our objectives were to determine *Campylobacter* prevalence in broiler chicken flocks in Reunion Island and to define specific practices associated with *Campylobacter* spp. infection in Reunionese broiler flocks;

## Materials and methods

### Study sample

Our study was undertaken from May 2007 to February 2009 and involved 50 broiler chickens flocks in Reunion Island (Indian Ocean) randomly chosen. Only one broiler flock was studied on each farm. The location and the day of placing chicks were provided by the poultry industry. The aim of the study was explained to the farmers by phone. In our selection, only 2 farmers refused to participate in the study and because of climatic cyclonic conditions, 3 more poultry farms were excluded from the study.

The first industrial chicken farm on Reunion Island was created 60 years ago and the main slaughter house was built in the 1990's. The poultry houses are open sided with artificial or dynamic ventilation. Various kind of poultry houses exist but most are industrial "Colorado" or "Louisiane" types along with some locally made houses called "pei" built from old tobaccoist drying sheds. The basic foodstuffs are imported from Argentina, France, and Mauritius. Parents belong to the Hubbard strain and they are imported from continental France. Each year 12 million hatching eggs are produced, around 75 000 breeders are imported and 8.5 million chicks are sold on the island.,98% of chicks are locally produced and the remaining 2% come from hatching eggs or from day old chicks from continental France. The typical prophylactics consist of vaccinations against Newcastle and Gumboro diseases.

### Data collection

Each chicken farm was visited once at the end of the rearing period. The visit was done between 43 and 45 days of age (before slaughtering) to define the flock's *Campylobacter* status.

Twenty pooled samples of five fresh droppings were taken to assess the *Campylobacter* status of the flock. The droppings were taken according to a systematic walking pattern in the poultry house (Refregier-Petton et al., 2001). Fresh droppings were placed in a sterile plastic bag using a sterile glove and transported to the laboratory within 4-6 h after sampling.

Data were collected from a questionnaire submitted to each farmer concerning poultry house characteristics, practices and treatment of day-old chicks, management of dead birds, control of rodents and other domestic animals, watering practices, farm staff, cleaning and disinfection. This questionnaire was always submitted by the same person and it was pre-tested in a preliminary study. The questionnaire consisted of closed-ended questions. Only the manager was interviewed.

#### Isolation procedure and identification

In all our analyses, *Campylobacter* culture was carried out in a micro-aerophilic atmosphere (7% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 83% N<sub>2</sub>) at a temperature of 42°C (Campygen, Oxoid).

The protocol used is based on (Denis et al., 2001). Samples were added to 90 ml of Preston broth (Oxoid, France) with Preston antibiotic supplement and incubated for 24h. Streaking on Virion plates and on Karmali plates (Karmali et al. 1986) was performed after 24h of enrichment steps. After 48h of incubation on agar plates, suspected colonies were isolated on blood agar plates for purification (Merck).

#### DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)

Identification of every isolate was confirmed by PCR using SYBR Green Jumpstart (Sigma) with specific primers: Col 2 and Col 3 for *Campylobacter coli*. For *Campylobacter jejuni*, map1 and map2 were used (Denis et al., 2001). Each PCR tube contained SYBR green (ADD MIX) (12.5 µl), primer (1 µl for each) and H<sub>2</sub>O (8 µl). DNA amplification was carried out in a thermocycler Biorad using an initial denaturation step at 94°C for 2 min followed by 35 cycles. Cycling conditions were as follows: denaturation 95°C for 15 s, annealing 59°C for 1 min; extension 72°C for 1 min.

## Statistical analysis

The flock was the unit of observation; it was considered infected by *Campylobacter* when one or more samples taken at the end of the rearing period was positive. Thus our outcome variable was dichotomous (infected versus non infected)

All variables were categorical with a number of categories per variable limited. All frequencies of categories were > 10%. Statistical analysis for the association between the independent variables was performed by using the chi2 test.

To assess the association between explanatory variables and *Campylobacter* status of the flock, two stage procedures was used. The first step consisted of performing a univariate analysis to test the association between *Campylobacter* infection and each independent variable. Variables associated (Pearson  $\chi^2$  test,  $P < 0.25$ ) with *Campylobacter* infection of the flock were entered into a full model (R software – library MASS) for multivariate analysis (table 1). This second step included a logistic multivariate regression model. Logistic regression was used based on the method described by (Hosmer and Lemeshow, 2000). 90% CI of the OR estimates were used. Contribution of each factor to the model was tested with a likelihood-ratio  $\chi^2$  through a stepwise procedure. Goodness-of-fit of the final model was assessed using Pearson  $\chi^2$ , Deviance and the Hosmer–Lemeshow tests. Interactions were not tested (because of the small sample size).

## Results

54 % [41% - 67%] of the 50 flocks were tested positive for *Campylobacter* at the end of the rearing period (Table 2); 30% [18% - 42%] were infected with *Campylobacter coli* and 17% [7% - 27%] with *C. jejuni*; only 7% [1% - 13%] were infected by both species at the same time.

The risk of broiler flock infection with *Campylobacter* (Table 3) was increased when there were more than 2 poultry houses in the farm (OR=11.2), when cleaning was done without using detergent (OR=13.1). Nevertheless, the risk of broiler infection with *Campylobacter* decreased when the distance from other poultry farms was more than 500 meters (0.27) and when disinfectant was used during the rearing period (OR=0.15).



## Discussion

The required willingness of farmers to cooperate during the lifespan of the flock might have led to a selection bias. The use of questionnaires for collection of baseline data could also introduce bias, but most questions were objective and closed. For subjective questions, a detailed description for each of the categories was provided. Moreover, data collection exclusively by two trained workers throughout the study's duration should have contributed to the precision of the results. For these reasons, the proportion of *Campylobacter* infected flocks should be interpreted with caution.

In our study we used conventional bacteriological standard (AFNOR, 1996) and real time PCR detection which is one of the more sensitive and specific method (Denis et al., 2001).

We recovered *Campylobacter* from 54% of the flocks. The value obtained is consistent with previous data (Humphrey et al., 1993; Nielsen et al., 1997; Atanassova et al., 1998). Range of detection in the European member states were between 2 and 100% for detection in the intestines (EFSA 2010). Nevertheless, prevalence in broiler chicken flocks was lower than results reported in France in 2007 (80.2%) (EFSA 2009). In recent studies throughout the European Union, *Campylobacter* were detected in 71.2% of the intestines of the broiler slaughter group and on 77% of the carcasses. Little information is available from tropical countries or islands but our results were consistent with those from Nigeria (Adekeye et al., 1989) or from Senegal (Cardinale et al., 2004) where thermophilic *Campylobacter* were isolated from 52.7% and 63% of the broiler flocks respectively.

In contrast with other studies (Reich et al., 2008; Kudirkienė et al., 2008) *C. coli* was more prevalent than *C. jejuni* in broiler flocks (30% versus 17%). *C. coli* is generally found in swine (Altekruse, 1998); but even if some farmers in Reunion island reared broilers and pigs in the same time, no statistical association was highlighted by our statistical analysis. However, this finding should be compared to *Campylobacter* isolated from humans in Reunion Island; but this information is still not available as well as from the other countries in Indian Ocean. Nevertheless, lower rates (8%) of flocks infected with both *Campylobacter* species have been reported in previous studies (McDowell et al., 2008). In contrast with Jose et al. (2010) in Europe, no clear seasonal peak of campylobacteriosis has been detected in Reunion Island as elsewhere in the tropics (Allos, 2001).

Two variables related to hygienic practices were significant in our model. Moreover, the confidence limits on the OR estimates were quite large, given the small sample size, therefore some caution is needed in interpreting these results. Using a detergent for cleaning was associated with a decreased risk for a flock to be *Campylobacter* infected. Cleaning is an essential stage for the removal of organic and inorganic debris from a surface which might support micro-organisms and provide insulation that reduces the efficiency of disinfecting procedures. But, some poultry producers in Reunion Island did not perform any thorough cleaning and had the impression of maintaining sterile conditions simply because disinfectants were used, when only a sanitized condition could be achieved at best. When cleaning and disinfection was carried out ineffectively, carry-over of infection was the predominant risk factor in broiler production (Lahellec and Colin, 1985).

The use of disinfectant during the rearing period was associated with a decreased risk of contamination by *Campylobacter* in the broiler house. Disinfection of the drinking water is particularly important because surface water is known to be a potential reservoir for *Campylobacter* (Kapperud et al., 1993; Altekruse et al., 1994; Allen et al., 2007) and many farmers also used well water in Reunion island, which is also considered as a means of *Campylobacter* colonization (Pearson et al., 1993; Morris and Levin 1995; Lind et al., 1996) have already confirmed many *Campylobacter* infections resulting from water ingestion. This disinfection procedure must be applied thoroughly in tropical countries such as Reunion Island because the conditions (high temperature 33°C average) are ideal for *Campylobacter* maintenance and multiplication This risk factor was often underestimated due to the presence of viable non culturable or stressed forms of the bacteria as Newell et al. (2001) explained.

We showed that *Campylobacter* infection was increased on farms with more than 2 broiler houses as described in other studies (Refregier-Petton et al., 2001). Several houses on the same site probably led to an increased risk of *Campylobacter* introduction into the houses from the environment. As Jacobs-Reitsma has explained, *Campylobacter* is generally transmitted to broilers horizontally from the environment; Studer et al., (1999) confirmed 68% of the ground samples near houses were contaminated by *Campylobacter*. Wild birds and traditional poultry might contaminate the surrounding soil (Genigeorgis et al., 1986). Rodents in particular are known to be *Campylobacter* vehicles (Annanh-Prah and Janc, 1988) and because most of Reunion Island is covered with sugar cane fields that are natural habitats of rodents, rats are regularly found nearby. Meerburg BG, (2006) have shown that rodents may be carriers of *Campylobacter* and transfer this pathogen to animal stocks or amplify the

number of bacteria in the farm environment. Another hypothesis for *Campylobacter* spread is that

insects, such as flies can act as vectors and transmit *Campylobacter* into broiler houses (Hansson et al., 2010).

Distance (more than 500m) between poultry houses was associated with a decreased risk of *Campylobacter* infection. This information highlighted the role that could be played by insects, wild birds and rodents. Airborne transmission may also play a role in spreading *Campylobacter* (Bull et al., 2006; Waldenstrom et al., 2007). As an example, Rosef and Kapperud, (1983) isolated *Campylobacter* from more than 50% of a total of 146 houseflies captured in the surroundings of a poultry production farm. Bull et al. (2006) argued that transmission of *Campylobacter* via the air may be also important for spreading the organism between broiler flocks, as *Campylobacter* was detected in the air exiting broiler sheds. Chinivasagam et al., (2009) explained that airborne dispersal might be a possible means of transmission from one house to adjacent houses, especially when the soiled litter is taken out and the floor brushed mechanically.

This investigation put emphasis on the importance of reducing *Campylobacter* infection in broilers in order to reduce contamination of the carcasses, which in turn would lessen the infection risk to consumers. Actually, digestive contents are likely to contain *Campylobacter* which could spread to other carcasses during «process»ing (Arsenault et al., 2007). The presence of *Campylobacter* in poultry could be reduced by good hygiene and husbandry practices, but even if some risk factors have already been described in the literature many practices are specific to the conditions in Reunion Island. It is now necessary to inform farmers of the measures to be taken urgently to tackle *Campylobacter* efficiently.

#### Acknowledgements

We are very grateful to production company Avi-pole Reunion for their collaboration in sample collection on poultry farms. We would like to thank in particular Jef Reichardt, Jacky Berby, Jimmy Hoarau, François Penverne and Yvon Euzen. Thanks to Crête d'Or Entreprise. We acknowledge all farmers for their cooperation in this study and for their answers to the questionnaires. We would also like to thank Frederic Chiroleu and Claire Bissery for their help in data «process»ing.

Table 1: Definition of explanatory variables included in analysis of *Campylobacter* contamination and percentage of flocks for each level of the variables (50 flocks)

Definition of variables	Level	Percentage (%)
Slaughtering season <sup>a</sup>	Summer	15
	Autumn	17
	Winter	33
	Spring	35
Access to the farm <sup>a</sup>	Fence around the farm	56
	No fence	44
Poultry Houses		
- Concrete floor <sup>a</sup>	Yes	56
	No	44
- Other poultry houses within 500m <sup>a</sup>	Yes	48
	No	52
- Cemented access around the house	Yes	56
	No	44
- Type of ventilation <sup>a</sup>	Static	36
	Dynamic	64
- Number of broiler houses in the farm <sup>a</sup>	=1	25
	$\geq 2$	75
- Age of Poultry house	<15 yrs	50
	$\geq 15$ yrs	50
- Sugar cane fields nearby <sup>a</sup>	Yes	68

	No	32
- Number of silos	=1	23
	$\geq 2$	77
- Equipment lending	Yes	15
	No	85
- Changing room divided into two areas (dirty and clean areas)	Yes	37
	No	63
- Working washbasin in the changing room (water, soap and towel)	Yes	40
	No	60
Conditions of chick placing		
- bird density at day 1 (chicks/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	< 18	62
	$\geq 18$	38
- antibiotic treatment at day 1	Yes	64
	No	36
- Control of one day old chicks	Yes	20
	No	80
Management of dead birds	Kept in the farm	7
	Eliminated	93
Dead bird storage	Frozen	87
	Not Frozen	13
Control of Rodents (baits)	Yes	89
	No	11

Presence of litter-beetles in the poultry house	Yes	65
	No	35
Non commercial or ornamental poultry on the farm	Yes	21
	No	79
Presence of feral birds in the poultry house	Yes	29
	No	71
Other animals in the farm (sheep, cattle, dogs, cats)	Yes	52
	No	48
Feeding and watering practices		
- Origin of drinking-water <sup>a</sup>	Public	85
	Private (well, bore-hole)	15
- Treatment of water	Yes	91
	No	9
- Type of drinkers	Drinkers	79
	Others (pan...)	21
- Drinker maintenance <sup>a</sup>	Frequent	55
	No frequent	45
- Poultry feeders	Automatic	85
	Manual	15
- Poultry feeder maintenance <sup>a</sup>	Frequent	71
	No frequent	29
Manure Disposal <sup>a</sup>	In the farm	10
	Outside from the farm	90

### Flock characteristics

- Antibiotic treatment during rearing	Yes	10
	No	90

### Farm Staff

- Specific poultry house staff	Yes	35
- Specific clothes	No	65
	Yes	52
- Specific shoes <sup>a</sup>	No	48
	Yes	73
- Cleanness of clothes and shoes	No	27
	Yes	61

### Litter

- Humid litter <sup>a</sup>	No	39
	Yes	43
- Litter addition during the rearing time <sup>a</sup>	No	57

### Disinfection

	Yes	48
- Use of disinfectant at one-day old <sup>a</sup>	No	52
	Yes	39
- Use of disinfectant during the rearing period <sup>a</sup>	No	61
	Yes	48
	No	52

### Cleaning and Disinfection

- Empty period < 15 days <sup>a</sup>	Yes	50
	No	50

- Cleaning indoors	Yes	93
	No	7
- Use of detergent for cleaning <sup>a</sup>	Yes	66
	No	34
- Disinfection (including water system)	Yes	77
- 2 <sup>nd</sup> Disinfection	No	33
	Yes	89
- Cleaning and Disinfection of poultry house surroundings <sup>a</sup>	No	11
	Yes	48
	No	52
- Silo fumigation	Yes	66
	No	34

---

a : Variable retained after univariate analysis for the logistic model

Table 2: Percentage of flocks contaminated with *Campylobacter* spp. at the end of the rearing period (50 flocks, Reunion Island, 2009)

---

Campylobacter Status and relative species	% of flocks
C. jejuni only	17
C. coli only	30
C. jejuni and C. coli	7
Negative	46

---



Table 3: Final logistic regression model for risk factors for *Campylobacter* contamination of broiler flocks in Reunion Island (50 flocks)

Variables	% of <i>Campylobacter</i> + flocks <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	90% CI <sup>d</sup> (OR)
Number of poultry houses in the same farm			
=1	22	1	
\$2	88	11.2	1.05 – 92
Other Poultry farms			
<500 m	58	1	0.1 – 0.8
\$500 m	42	0.27	
Use of detergent for cleaning			
Yes	58	1	
No	42	13.1	2.1 – 78.3
Use of disinfectant during the rearing period			
Yes	44	0.15	0.1 – 0.75
No	66		

a : Intercept = 3.29 model deviance = 66.2, AIC = 57.1, model df. = 4 (p<0.001)

b : *Campylobacter* contaminated flocks at the end of the rearing period

c: Odds Ratio

d: Confidence Interval

## References

- Adekeye, J.O., Abdu, P.A., Bawa, E.K., 1989, *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in poultry reared under different management systems in Nigeria. *Avian Diseases* 33, 801-803.
- AFNOR, 1996, *Microbiologie des aliments: méthode horizontale pour la recherche de Campylobacter thermotolérants*. NF ISO 10272. Association Française de Normalisation, 11-14.
- Allen, V.M., Tinker, D., Atterbury, R.J., Harris, J.A., Howell, M., 2007, Assessment of *Campylobacter* numbers and visual cleanliness on poultry transport crates and modules prior to plant modifications. *Zoonoses and Public Health* 54, 136-136.
- Altekruse, S.F., Hunt, J.M., Tollefson, L.K., Madden, J.M., 1994, Food and Animal Sources of Human *Campylobacter-jejuni* Infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 57-61.
- Annanh-Prah, A., Janc, M., 1988, The mode of spread of *Campylobacter jejuni/coli* to broiler flocks. *Journal of Veterinary Medicine* 35, 11-18.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., 2007, Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. *Journal of Food Protection* 70, 1820-1828.
- Atanassova, V., Altemeier, J., Kruse, K.P., Dolzinski, B., 1998, The detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in fresh poultry. *Fleischwirtschaft* 78, 364-366.
- Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J., Humphrey, T.J., 2006, Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 645-652.
- Callicott, K.A., Fridriksdottir, V., Reiersen, J., Lowman, R., Bisailon, J.R., Gunnarsson, E., Berndtson, E., Hiatt, K.L., Needleman, D.S., Stern, N.J., 2006, Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5794-5798.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E.F., Cisse, M., Salvat, G., 2004, Risk Factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* In Press.

- Chinivasagam, H.N., Tran, T., Maddock, L., Gale, A., Blackall, P.J., 2009, Mechanically Ventilated Broiler Sheds: a Possible Source of Aerosolized Salmonella, Campylobacter, and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7417-7425.
- Denis, M., Refregier-Petton, J., Laisney, M.J., Ermel, G., Salvat, G., 2001, Campylobacter contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of Campylobacter jejuni and Camp. coli. *Journal of Applied Microbiology* 91, 255-267.
- Diker, K.S., Esendal, O.M., Akan, M., 2000, Epidemiology of ovine Campylobacter infection determined by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47, 739-743.
- EFSA (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A. The *EFSA Journal* (2007) 98, 1-85. 98, 1-85.
- Genigeorgis, C., Hassuneh, M., Collins, P., 1986, Campylobacter jejuni infection on Poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughtering. *Journal of Food Protection* 49, 895-903.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000, *Applied Logistic Regression*. Wiley, New York, 373 p.
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen, M., 2007, Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology* 117, 237-257.
- Humphrey, T.J., Henley, A., Lanning, D.G., 1993, The colonization of broiler chickens with Campylobacter jejuni: some epidemiological investigations. *Epidemiology and Infection* 110, 601-607.
- JacobsReitsma, W.F., 1997, Aspects of epidemiology of Campylobacter in poultry. *Veterinary Quarterly* 19, 113-117.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M., Potter, M., 1993, Epidemiological investigation of risk factors for campylobacter colonization in Norwegian broiler flocks. *Epidemiology and Infection* 111, 245-255.

- Kudirkiene, E., Malakauskas, A., Serniene, L., Malakauskas, M., 2008, Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by PCR-RFLP in broiler flocks. *Veterinarija Ir Zootechnika* 42, 44-47.
- Lahellec, C., Colin, P., 1985, Relationship between serotypes of *Salmonellae* from hatcheries and rearing farms and those from «process»ed poultry carcasses. *British Poultry Science* 26, 179-186.
- Leonard, E.E., Tompkins, L.S., Falkow, S., Nachamkin, I., 2004, Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barre syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. *Infection and Immunity* 72, 1199-1203.
- Lind, L., Sjogren, E., Melby, K., Kaijser, B., 1996, DNA fingerprinting and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from epidemic outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 892-896.
- McDowell, S.W.J., MenzieS, F.D., McBride, S.H., Oza, A., McKenna, J.P., Gordon, A.W., Neillab, S.D., 2008, *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: Epidemiology and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 84, 261-276.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999, Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- Meerburg BG, J.-R.W., Wagenaar JA, Kijlstra A., 2006, Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* 72, 960-962.
- Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S.G., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Megraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P., 2005, *Campylobacter*. *Veterinary Research* 36, 351-382.
- Newell, D.G., Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Domingue, G., Bull, S., Humphrey, T., Mead, G., 2001, Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during «process»ing in abattoirs. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2636-2640.
- Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M., 1997, Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 19, 47-56.

- Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J., Colwell, R.R., 1993, Colonization of Broiler-Chickens by Waterborne *Campylobacter*-*Jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 987-996.
- Prasad, K.N., Dixit, A.K., Ayyagari, A., 2001, *Campylobacter* species associated with diarrhoea in patients from a tertiary care centre of north India. *The Indian Journal of Medical Research* 114
- <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.21598570>, 12-17.
- Refregier-Petton, J., Rose, N., Denis, M., Salvat, G., 2001, Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 50, 89-100.
- Refregier\_Petton, J., Rose, N., Denis, M., Salvat, G., 2001, Risk factors for *Campylobacter* spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 50
- <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.21342518>, 89-100.
- Reich, F., Atanassova, V., Haunhorst, E., Klein, G., 2008, The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 116-120.
- Roberts, J.A., Cumberland, P., Sockett, P.N., Wheeler, J., Rodrigues, L.C., Sethi, D., Roderick, P.J., 2003, The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact. *Epidemiology and Infection* 130, 1-11.
- Rosef, O., Kapperud, G., 1983, House-Flies (*Musca-Domestica*) as Possible Vectors of *Campylobacter*-*Fetus* Subsp *Jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 381-383.
- Smith, J.L., 1995, Arthritis, Guillain-Barre-Syndrome, and Other Sequelae of *Campylobacter*-*Jejuni* Enteritis. *Journal of Food Protection* 58, 1153-1170.
- Sorvillo, F.J., Lieb, L.E., Waterman, S.H., 1991, Incidence of *Campylobacteriosis* among Patients with Aids in Los-Angeles County. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 4, 598-602.
- Stern, N.J., Fedorka\_Cray, P., Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E., Hiatt, K.L., Musgrove, M.T., Ladely, S., Cosby, D., Mead, G.C., 2001, Distribution of *Campylobacter* spp. in

- selected U.S. poultry production and «process»ing operations. *Journal of Food Protection* 64, 1705-1710.
- Studer, E., Luthy, J., Hubner, P., 1999, Study of the presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in sand samples from four Swiss chicken farms. *Research in Microbiology* 150, 213-219.
- Waldenstrom, J., On, S.L.W., Ottvall, R., Hasselquist, D., Olsen, B., 2007, Species diversity of campylobacteria in a wild bird community in Sweden. *Journal of Applied Microbiology* 102, 424-432.
- Zhao, C., Ge, B., De\_Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., Meng, J., 2001, Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Applied and Environmental Microbiology* 67

## 1.2. Discussion de la première partie

Bien que la production de volailles soit identique au modèle métropolitain et à plus grande échelle au modèle européen, la filière avicole Réunionnaise tend à se développer sur une démarche productiviste tout en s'adaptant au contexte climatique, socio-économique et culturel des Réunionnais.

A l'heure actuelle, la production Réunionnaise ne répond pas à 100% à la demande locale mais elle cherche à augmenter sa part de marché à hauteur de 3% par an ainsi que conquérir des marchés extérieurs tels que les Etats Arabes Unis pour l'exportation de ses produits locaux comme la charcuterie fabriquée à base de 100% de viande de volailles.

*Salmonella* et *Campylobacter* sont les premiers germes impliqués dans les TIAC dans le monde, dans les pays industrialisés et en développement d'où la nécessité de vigilance des professionnels et des pouvoirs publics, d'autant plus que la réglementation va vers une obtention de produits sains quels que soient les moyens utilisés par les professionnels.

### 1.2.1. De la méthodologie

La méthodologie utilisée pour la mise en évidence des facteurs de risque a rassemblé les méthodes de référence de l'épidémiologie analytique tout en les adaptant au contexte local pour la récolte des données nécessaires à l'analyse de risque ; l'objectif étant d'identifier les facteurs de risque majeurs de transmission de *Salmonella* dans les élevages de poulets de chair afin de mettre en place un ensemble de mesures permettant de mieux les maîtriser en amont de la filière.

La méthode d'enquête utilisée a été de type longitudinal. Le type d'enquêtes rétrospectives cas/témoins permettant de mettre en évidence les facteurs de risque sur des échantillons de taille modérée (Toma et al., 1996) n'a pas pu être utilisé dans notre étude car aucune donnée pré existante sur le sujet n'avait été collectée auparavant.

Le choix de l'unité épidémiologique d'une bande et non de la sélection de quelques individus épars au stade de l'élevage a permis de garantir une meilleure représentativité ainsi qu'une meilleure qualité de l'information relative à la contamination par *Salmonella* et *Campylobacter*.

La collecte de données ainsi que la récolte des prélèvements par une seule et même personne ont contribué à une meilleure homogénéité des résultats fondés tant sur la qualité que sur la fiabilité des données récoltées.

En ce qui concerne la représentativité de notre échantillonnage, cette dernière peut être discutée. Un réel tirage aléatoire pour la sélection des élevages en fin de période d'élevage n'a pas pu être réalisé du fait que nous avons besoin de l'accord des éleveurs pour mener l'étude. De ce fait un léger biais a pu être introduit bien que très peu d'éleveurs sollicités aient refusé.

Notre échantillonnage est cependant représentatif de la production locale car toutes les zones géographiques de l'île où se trouvaient des exploitations, ont été prises en considération ; il est de même représentatif dans le temps puisque l'étude s'est étalée sur plus de deux ans et a permis de prendre en compte l'effet « saisons ». Il aurait été également intéressant de géolocaliser les exploitations investiguées pour voir si une différence d'altitude entre les élevages des hauts et ceux des bas n'influencerait pas la présence de *Salmonella* et de *Campylobacter*.

#### 1.2.2. De la détermination des facteurs de risque

La détermination des facteurs de risque a permis de mettre en évidence ceux qui étaient communs avec les pays où l'aviculture est développée et d'autres propres aux conditions locales d'élevage.

Pour les facteurs de risque communs il s'agit principalement des bonnes pratiques d'hygiène comprenant un nettoyage et une désinfection performants afin de diminuer la persistance des *Salmonella* résidentes en élevage. Les travaux de Lahellec et al., (1986) et Angen et al., (1996) avaient également démontré que la bactérie pouvait survivre à des procédures de nettoyage et de désinfection non adéquates. La persistance de *Salmonella* contribue ainsi à la contamination des lots suivants comme cela a pu être déjà démontré par Namata et al., (2009) qui confirmait les travaux antérieurs réalisés par Baggesen et al., (1992).

Ces contaminations révèlent des failles dans la biosécurité des élevages concernés. Différentes actions ont déjà été entreprises et constitueront, pour les mois à venir, la priorité dans le suivi technique et sanitaire des éleveurs : amélioration des barrières sanitaires en



élevage, informations et implications des partenaires, actions de formation et actions sur le terrain en matière de dératisation.

La qualité de ces bonnes pratiques prend toute son importance à la Réunion. Certains éleveurs utilisent uniquement du détergent, d'autres seulement des désinfectants, peu utilisent les deux et quelques uns font parfois un cocktail de différents produits pensant pouvoir en améliorer leur efficacité. Durant les enquêtes, nous nous sommes rendus compte également que de nombreux éleveurs ne connaissaient pas le nom des produits qu'ils utilisaient ainsi que les doses administrées. Ces constatations sont finalement en adéquation avec une réalité, qui est l'illettrisme largement présent sur l'île et qui prouve que seuls les éleveurs dotés d'une technicité certaine peuvent gérer efficacement leur exploitation.

Divers types de matériels peuvent également influencer la qualité du nettoyage et de la désinfection. Certains éleveurs ont recours aux canons à mousses, d'autres à des pulvérisateurs et d'autres à des thermo-nébulisateurs. L'usage de la thermonébulisation serait plus efficace car ce sont de fines particules qui sont déposées lors de l'application des produits.

Durant la période d'élevage de nombreuses voies d'entrées peuvent expliquer la présence de *Salmonella* et de *Campylobacter* chez les poulets de chair.

Le problème majeur à la Réunion, comme dans de nombreux pays tropicaux (Taylor, 1972) est celui de la présence de rongeurs (rats, souris, musaraignes) dont les populations ne cessent d'augmenter. Chaque année, lors de la période de la coupe de cannes à sucre s'étalant du mois de juin à décembre, les rats tendent à se déplacer de leur habitat naturel, les champs de canne, vers les exploitations pour chercher de la nourriture. Les rongeurs sont reconnus être des vecteurs de *Salmonella* et de *Campylobacter* (Meerburg, 2006; Meerburg and Kijlstra, 2007) et représentent un risque non négligeable de transmission de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages avicoles ainsi que de leurs dispersions dans l'environnement à travers leurs déjections. La Réunion compte environ 5 rats par habitant (4 fois plus qu'en métropole), d'où l'importance de la pression infectieuse exercée par ces petits mammifères. Il convient donc de s'interroger sur la lutte contre les rongeurs dans le département et d'entreprendre une action commune entre les différents acteurs concernés pour mieux cerner les attentes et les contraintes de chacun dans cette lutte.

D'autres vecteurs de *Salmonella* présents sur l'île, tels que les lézards (*Agama agama*) ou des margouillats, noms créoles donnés à des geckos locaux, auraient pu faire l'objet de nos

investigations afin d'évaluer si la présence de ces reptiles présentait un facteur de risque important pour la transmission de *Salmonella* comme précédemment démontré au Niger (Otokunefor et al., 2003).

En tant que vecteur actif, l'homme contribue également à la diffusion de ces pathogènes entre les différents bâtiments de son exploitation. Ce risque peut être d'autant plus important si l'éleveur ne se change pas, ou ne porte ni chaussures ou sur-chaussures spécifiques lors de son entrée dans chacun de ses bâtiments d'élevage. A la Réunion, certains éleveurs possèdent des élevages mixtes de porcs et de volailles d'où l'importance de respecter ces bonnes pratiques afin de diminuer la circulation des pathogènes à la fois intra espèces mais aussi inter espèces.

Concernant les vecteurs passifs de transmission de ces bactéries dans l'environnement, les effluents d'élevage ainsi que l'épandage contribuent à leur propagation. Le fumier qui sert également en tant qu'engrais pour les cultures maraîchères peut également être une voie de propagation de *Salmonella*.

Les véhicules constituent quant à eux des vecteurs mécaniques potentiels favorisant la contamination des abords du bâtiment quand ces derniers (camion d'aliment, de livraison de poussins, d'enlèvement) ne respectent pas les mesures de sécurité sanitaire qui consistent à effectuer une désinfection des bas de caisses et de roues avant leur entrée sur le site.

De plus lors de l'enlèvement des poulets les tracteurs rentrant dans les bâtiments peuvent également contribuer à la propagation de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans l'environnement. Ces camions interviennent dans l'enlèvement d'animaux provenant de plusieurs bâtiments et ne sont pas nettoyés entre chaque exploitation bien que le nettoyage et la désinfection des bâtiments effectués à posteriori devrait permettre leur élimination.

Les poussins peuvent être également des vecteurs de *Salmonella* bien que ces derniers subissent des contrôles au niveau du couvoir.

L'eau et l'aliment avaient déjà été mis en cause dans de précédentes études mais les recherches n'ont pas été menées car les sérotypes associés sont en général exotiques et différents de ceux retrouvés sur les animaux à l'élevage. Il serait donc intéressant de poursuivre la recherche de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les vecteurs et véhicules cités précédemment et n'ayant pas fait, pour le moment, l'objet de nos recherches.

L'absence de rigueur parfois observée sur le terrain, notamment les mesures de biosécurité insuffisantes comme l'absence de vêtements spécifiques au bâtiment, l'absence de bottes ou de surchaussures, l'absence de pédiluves, la non fonctionnalité ou le non usage des centrales de désinfection à l'entrée du bâtiment, contribue à la diffusion de *Salmonella* et de *Campylobacter*.

Les résultats obtenus, dans cette première partie permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de *Salmonella* et de *Campylobacter* dans les élevages de poulets de chair dans un contexte particulier. La lutte contre ces bactéries doit donc se faire en amont de la filière mais elle doit également inclure une démarche intégrée tout au long de la chaîne de production. Tous les acteurs de la filière doivent donc s'impliquer dans la lutte contre *Salmonella* et *Campylobacter*. Il nous a donc semblé important de poursuivre l'étude à l'abattoir sur les lots précédemment étudiés en élevage ; ceci dans le but d'évaluer les contaminations croisées à l'abattoir ainsi que de définir la distribution de *Salmonella* tout au long du «process» d'abattage et sur les carcasses de poulets de chair.

## 2. Investigation épidémiologique de *Salmonella* à l'abattoir

Depuis la mécanisation de l'abattoir, certaines étapes clés ont été reconnues comme responsables dans la contamination des carcasses.

Les premières étapes (accrochage, électronarcose et la saignée) n'interfèrent pas dans la recrudescence d'un danger microbiologique lors de l'abattage des volailles (Salvat, 1997a). En revanche, les étapes suivantes sont responsables de contaminations croisées entre les lots.

**-L'échaudage** est le siège de contaminations croisées. L'origine de la contamination est multiple suite à un mauvais nettoyage et désinfection des bacs, ou à la contamination du plumage des animaux, ou la contamination par les fientes libérées lors du relâchement sphinctérien dû à la mort. Lors de précédents travaux menés par Salvat et al. (1993), 61% des eaux d'échaudage en abattoir de poulets s'étaient avérées positives en *Salmonella*. Cette contamination est d'autant plus importante à prendre en considération que c'est par l'intermédiaire du film liquidien déposé à la surface des carcasses que les bactéries se fixent à la peau. Les bactéries sont capturées dans les follicules plumeux dilatés et piégées à l'intérieur du follicule lors du refroidissement de la carcasse, elles deviennent ainsi inaccessibles à tout traitement de décontamination.

**-La plumaison** est également le siège de contaminations croisées du fait de la pression exercée par les doigts plumeurs sur les carcasses qui contribue ainsi au piégeage bactérien par un transfert de la contamination des plumes vers les follicules plumeux. Au cours de cette étape, les carcasses se refroidissent du fait de l'arrosage de la carcasse par l'eau de rinçage des plumeuses. C'est ce refroidissement qui entraîne la fermeture des follicules plumeux et contribue au piégeage des bactéries.

La contamination peut être également le résultat d'une mauvaise opération de nettoyage et de désinfection des doigts plumeurs en caoutchouc dotés de nombreuses anfractuosités et sur lesquels les biofilms tendent à se former.

L'étape de plumaison contribue d'une part à une contamination des carcasses mais également à un piégeage des bactéries sur les carcasses.

**-L'éviscération** auparavant décrite comme l'une des étapes les plus contaminantes s'avère aujourd'hui être mieux maîtrisée mais représente toujours un risque dans la contamination des

carcasses. En effet, l'éviscération automatique peut entraîner une rupture de l'intestin si les machines sont mal réglées ou défectueuses.

A la Réunion, l'abattoir datant d'une vingtaine d'année est mécanisé. L'ampérage de l'électronarcose est de 53mA et la température du bac d'échaudage de 54.8°C avec une vitesse d'accrochage de 3 800 volailles par heure.

Notre recherche à l'abattoir a été effectuée sur 71 lots de poulets de chair qui avaient fait précédemment l'objet de l'étude sur la prévalence et les facteurs de risque de transmission de *Salmonella* en élevage. Le but de ces travaux était de déterminer la prévalence de *Salmonella* tout au long de la chaîne, de comparer les sérotypes circulants présents à l'abattoir avec ceux précédemment trouvés en élevage et d'évaluer si l'abattoir contribuait à la propagation des *Salmonella* ou si l'élevage restait l'étape clé de contamination par *Salmonella*.

Les résultats de ce travail ont été soumis dans le journal « International Journal of Food Microbiology ».

#### 2.1.1. Résumé et conclusion de la publication 3 : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolé de carcasses et de l'environnement d'abattoir sur une île tropicale (Ile de la Réunion, Océan Indien) : prévalence, caractérisation génétique et sensibilité aux antibiotiques »

Entre octobre 2007 et janvier 2009, 71 lots de poulets ont été investigués à l'abattoir. Les échantillons ont été collectés sur des poulets vivants, sur les carcasses et également dans l'environnement de l'abattoir.

A l'abattoir, *Salmonella* spp. a été isolée dans 40 lots sur les 71 (56% [45-67]). Les sérovars prédominants ont été Blockley (31%), Typhimurium et Brancaster (14%), Hadar (10%), S.I 4,12 :i :- et Virchow (8%). *S. Livingstone*, *S. Saint Paul*, *S. Senftenberg*, *S. Llandoff*, *S. Infantis* et *S. Indiana* ont été définis comme sérotypes minoritaires. En fin de période d'élevage, 27% de ces mêmes lots avaient été testés positifs pour *Salmonella* spp.

Sur 497 échantillons d'environnement collectés, *Salmonella* a été isolée sur 124 échantillons, soit dans 25% des cas.

Dans la plupart des cas, il n'y a pas de relation entre les profils génétiques obtenus par PFGE et les profils de résistance aux antibiotiques. La plupart des isolats sont sensibles aux antibiotiques testés excepté pour *S. Hadar*, qui montre de hauts profils de résistance.

Cette partie de l'étude a souligné que l'infection primaire de *Salmonella* était l'élevage mais que les étapes en aval de la production pouvaient amplifier la contamination par *Salmonella*.

2.1.2. Publication 3: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken carcasses and environment at slaughter in a tropical island (Reunion - Indian Ocean): prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility

***Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken carcasses and environment at slaughter in a tropical island (Reunion - Indian Ocean): prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility**



**Figure 19 : Chaîne d'abattage à COE (I.Henry, 2008)**

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken carcasses and environment at slaughter in a tropical island (Reunion - Indian Ocean): prevalence, genetic characterization and antibiotic susceptibility

\*Isabelle Henry, CIRAD- Crête d'Or Entreprise, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

Sophie Granier, Afssa CEB, 23 ave Général de Gaulle, 94706 Maisons Alfort Cedex, France

Mail : [sophie.granier@anses.fr](mailto:sophie.granier@anses.fr)

Céline Courtillon, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [celine.courtillon@anses.fr](mailto:celine.courtillon@anses.fr)

Françoise Lalande, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [françoise.lalande@anses.fr](mailto:françoise.lalande@anses.fr)

Marianne Chemaly, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [marianne.chemaly@anses.fr](mailto:marianne.chemaly@anses.fr)

Gilles Salvat, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [gilles.salvat@anses.fr](mailto:gilles.salvat@anses.fr)

Eric Cardinale, CIRAD UMR Control of animal exotic and emerging diseases, CRVOI 2 rue Maxime Rivière Bios, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [eric.cardinale@cirad.fr](mailto:eric.cardinale@cirad.fr)

Corresponding author:

Isabelle Henry

CIRAD-Crête d'Or Entreprise

2 rue maxime rivière

97 490 Sainte Clotilde

La Réunion

Tél: (+262) (0) 2 62 93 88 24



Gsm: (+262) (0) 6 92 60 56 57

Fax: (+262) (0) 2 62 93 88 01

Mail: isabelle.henry@cirad.fr

## Abstract

*Salmonella* contamination of 71 chicken broiler flocks was investigated at the slaughterhouse in Reunion Island between October 2007 and January 2009. Samples were collected from live broiler chickens and chicken carcasses as well as the slaughterhouse environment.

*Salmonella* spp. could be isolated from 40 of 71 (56% [45-67]) broiler-chicken flocks at slaughter. The most prominent serovars were Blockley (31%), Typhimurium and Brancaster (14%), Hadar (10%), SI4,12:i and Virchow (8%) and Livingstone, St Paul, Seftenberg, Llandoff, Infantis and Indiana. At the farm, 27% of the broiler-chicken flocks tested positive for *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. could be isolated from 124 of 497 environmental samples (25%). In most cases, there were no relationship between PFGE pattern and antibiotic resistance pattern. The predominant *Salmonella* serovars were susceptible to most of the tested antibiotic drugs but *S. Hadar* exhibited high levels of resistance.

This study highlighted the primary source of *Salmonella* was the farm of origin and downstream stages in processing could not remedy to but amplify this *Salmonella* contamination

## 1. Introduction

*Salmonella* is a leading cause of bacterial food-borne disease outbreaks in developed countries (White et al., 1997) and is also a public health concern in tropical countries (Medeiros et al., 2001; Sow et al., 2000). *Salmonella* usually causes an intestinal infection in humans, accompanied by diarrhoea and fever that often lasts for a week or more.

People of all ages are affected, but in the very young, the elderly or in people whose immune systems are deficient, infection can spread to the bloodstream or the meningeal linings of the brain leading to severe or occasionally fatal illness (Tauxe, 1996). The most-commonly

incriminated foods in outbreaks of human salmonellosis are those of animal origin (D'Aoust, 1989). Most of these infections have been attributed to consumption of poultry meat and eggs (Thong et al., 2002; Van Schothorst et al., 1980). In addition to *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium, many other serovars have been associated with food poisoning incidents from contaminated poultry meat (Davies et al., 2001).

Reunion Island is a French island of the Indian Ocean, between Madagascar (700 km) and Mauritius (300 km). Chicken meat production is only 30 000 t a year (in 2009) but it is also the first source of animal protein (40kg/inh/yr) and approximately 25% of chicken is consumed in the form of «process»ed meat products (sausages particularly). Foodborne poisoning outbreaks due to *Salmonella* are regularly reported in la Reunion (D'ortenzio et al., 2008) in which poultry meat seems to be involved.

To prevent chicken carcass contamination, it is important to control *Salmonella* infection along the food production chain (Mochizuki et al., 1992). In fact, poultry become infected with *Salmonella* during hatching and rearing operations (Smith, 1971). With infected birds, the organisms tend to concentrate in the gastrointestinal tract from where they may be excreted and spread rapidly to the other birds. The problem of cross-contamination may continue during «process»ing in the slaughterhouses. Because various attempts with very limited success have been made to reduce the incidence of *Salmonella* spp. in farm animals, the abattoir level is considered a key point in controlling *Salmonella* spp. (van\_Schothorst et al., 1985).

In Reunion Island, no data are available about the prevalence of broiler chickens with *Salmonella* at slaughter. The aim of the study was to show the distribution of *Salmonella* in chicken carcasses and the environment in slaughterhouse and to compare their genetic and antibiotic susceptibility profiles to highlight any potential cross-contamination.

## 2. Materials and methods

Experiments were carried out in the only chicken slaughterhouse located in the south of the island. The slaughterhouse received around 6 000 000 broiler chickens per year with a middleweight per chicken of 1.762 kilogram. Broilers were slaughtered around 45 days-old. The average linespeed was approximately 3 000 carcasses per hour. The slaughter

«process»es from bleeding to veterinary inspection took place on one line. Scalding took place by a complete immersion of the chicken in a tank containing water of 54.8°C.

## 2.1 Sample collection

Samples were collected from live broiler chickens and chicken carcasses as well as the slaughterhouse environment. A total of 71 broiler chicken flocks, randomly chosen, were studied between October 2007 and January 2009. Our observation unit was the flock at slaughter.

For each flock, at the farm, 5 pooled samples of five fresh droppings were collected; this number of samples should detect an infected flock with a prevalence >5% with  $P < 0.05$ , given that the sensitivity of the test is 100% (Martin et al., 1987).

At the slaughterhouse, 50 intestines, 60 neck skins and 5 carcass rinses (each carcass was rinsed in a sterile 3.500 ml stomacher plastic bag with 400 ml of chilled buffered peptone water) were taken from 115 chickens randomly chosen.

Environmental samples were collected during the slaughtering «process» of each flock as follows:

- Transport crates : 20 transport crates were randomly chosen and swabbed with one sterile swab (Sodibox, La Forêt-Fouesnant, France),
- Scalding : samples of 25 ml of water were collected with sterile pipettes and put into sterile jars
- Defeathering : rubber fingers (upper part of the machine) were swabbed before and after defeathering of the flock
- Evisceration: a surface of 1000 cm<sup>2</sup> was swabbed.
- Trussing: the table was swabbed before and after the flock.

Seven environmental samples were collected for each flock.

## 2.2 Isolation procedure

From the intestine contents, 125g (pool of 5 intestines) were mixed into a stomacher bag; neck skins were also pooled by five. All the other samples were analyzed individually.

Samples were analyzed for *Salmonella* according to ISO-6579 standard. Samples were homogenized in 1:10 sample/broth ratio in a Masticator with 150 ml of buffered peptone water (Oxoid, France) for pre-enrichment. After incubation for 18±2 h at 37°C, 0.1 ml was transferred to 10ml of selective Rappaport- Vassiliadis broth (Oxoid) and incubated for 24h to 42°C. 1ml of pre-enrichment broth was inoculated to 10ml of Muller Kauffmann tetrathionate broth and incubated for 24h to 37°C.

A loopful of broth culture was streaked on Xylose Lysine Desoxycholate (Oxoid), Hektoen enteric agar (Oxoid) and *Salmonella Shigella* (Oxoid).

Colonies with typical *Salmonella* characteristics were identified with biochemical assays including glucose fermentation, lactose oxidation, gaz and H<sub>2</sub>S production (Kligler-Hajna medium), lack of galactosidase (ONPG test) and presence of decarboxylase.

A maximum of five presumptive positive colonies from each sample was examined. For serotyping and statistical analysis, one isolate by each sample was serotyped. Confirmation of biochemical characteristics was confirmed by cupules of Rapid one (Oxoid). All *Salmonella* isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme (Popoff et al., 2001) using slide agglutination test with *Salmonella* polyvalent O and H antisera according to the diagnostic Pasteur, Paris, France.

### 2.3 Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was tested by the disk diffusion method following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008)

The isolates were tested for their susceptibility to ampicilin (A; 10 µg), amoxicilin – clavulanic acid (AMC;20/10 µg), cefotaxime (CTX;30 µg), chloramphenicol (C;30 µg), cephalothin (CF;30 µg), ceftazidime (CAZ;30 µg), cotrimoxazole (SXT;1.25/23.75 µg), sulfonamides – NCCLS (Su;300 µg), gentamicin (Gm;10 µg), streptomycin (S;10 µg), kanamycine (K;30 µg), tetracyclin (T;30 µg), colistine (Cs;10µg), nalidixic acid (Na;30 µg), ofloxacin ( Ofx;5 µg) and enrofloxacin (Enr; 5 µg). *Escherichia coli* (ATCC25922) was used as control strain.

## 2.4 Molecular typing: RFLP/PFGE

The following harmonized protocol was used for the study as described previously (Kerouanton et al., 2007). After overnight growth on PCA or nutrient broth, cells were harvested by centrifugation and re-suspended in suspension buffer. The final cell density for plug preparation was 1.3-1.6 at 600nm. Proteinase K was added to the cell suspension followed by mixing lysates of cell suspension 1:1 with Seakem gold Agarose. The resultant plugs were washed at least twice in distilled water and four times in TE buffer.

### Enzymatic digestion

The genetic typing was carried out by RFLP-PFGE PulseNet protocol (Ribot et al., 2006) and total DNA was digested with one restriction enzyme XbaI (Roche Applied Science), and the obtained fragments were separated in 1% agarose (Seakem gold Agarose,) gels using the CHEF-DR-III system (Biorad Laboratories, USA).

## 2.5 Electrophoresis

Electrophoresis was carried out with 0.5X TBE buffer at 6 V/cm and 14 °C. The running time was 20h and the pulse ramp time was 2.2–63.8 s. *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was used as a molecular size marker.

Gels were visualized on an UV transilluminator and photographs were captured by a digital imaging system (Video gel doc system, Bio rad). Fragment restrictions patterns were analysed by Bionumerics software (Applied Maths, Sint Marteen, Belgium), performed using UPGMA (unweighted pair-group method with an arithmetic mean) and a dice similarity coefficient (Nei et al., 1979) with a tolerance index of 5 %, a position tolerance setting of 1% and optimization setting of 1% which generating dendrogram. Fragments smaller than 30 kb were disregarded according to the PulseNet guidelines for standardization (Tenover et al., 1995).

### Discrimination power

Discrimination power was calculated by determining the Simpson discrimination indices (D) according to (Hunter, 1990). These values represent the probability that two distinct isolates will be ranged into different typing groups.

### 3. Results

*Salmonella* spp. could be isolated from 40 of 71 (56% [45-67]) broiler-chicken flocks at slaughter. The most prominent serovars were Blockley (31%), Typhimurium and Brancaster (14%), Hadar (10%), SI4,12:i and Virchow (8%) and Livingstone, St Paul, Seftenberg, Llandoff, Infantis and Indiana. 22 flocks exhibited several serovars at the same time (up to five different serovars at the end of slaughtering «process»). Within flock *Salmonella* detection was different according the way of sampling; 34 flocks were detected positive for *Salmonella* by rinsing carcasses, 18 by neck skins and 11 by intestines (Chi2: p<0.05).

At the farm, 27% of the broiler-chicken flocks tested positive for *Salmonella* spp. The most prevalent serovars isolated were Typhimurium, Blockley, Virchow and Livingstone (19% each) then Hadar, Seftenberg (9%) and Agona (5%). Several *Salmonella* serovars were recovered in four farms.

*Salmonella* spp. could be isolated from 124 of 497 environmental samples (25%). *Salmonella* was recovered from 15% of transport crates samples, 17% of scalding water samples, 28% of defeathering fingers swabs (before the flock), 44% of defeathering fingers swabs (after the flock), 20% of evisceration machine swabs, 20% and 25% of trussing table swabs (before and after the flock respectively).

Strains belonging to the four most commonly isolated *S. enterica* serovars (Blockley, Typhimurium, Brancaster and Hadar) were further characterized by *Xba*I-macrorestriction. For *S. Blockley*, the PFGE of *Xba*I-digested DNA from 77 isolates gave stable and reproducible patterns consisting of 14-18 fragments. We obtained 4 patterns with *Xba*I enzyme. Pattern B2 was the predominant genotype accounting for 95% of the strains (figure1). For *S. Typhimurium* (50 isolates) and SI4,12:I, (15 isolates), macrorestriction with *Xba*I yielded 8 patterns consisting of 14 -18 fragments (Figure 2). B54 was the predominant profile with 35% of the strains. The dendrogram showed three clusters with 82, 86 and 85% similarity respectively; the first cluster (23% of the isolates) comprised 2 profiles from seven chicken strains and eight environmental strains; the second one (31%) 3 profiles from nine chicken strains and eleven environmental strains and the third one (46%) from 17 chicken strains and 13 environmental strains. *Salmonella* SI4,12:i was integrated within the analysis because it exhibited the same genetic profiles (B73 and B69). For *S. Brancaster* (17 isolates), macrorestriction with *Xba*I yielded 2 different patterns consisting of 16 fragments (Figure 3)

with an overall similarity of 97%, from 14 chicken strains and three environmental strains. For *S. Hadar* (26 isolates), macrorestriction exhibited three different patterns consisting of 14-15 fragments with a similarity of 92% (Figure 4) from 9 chicken strains and 17 environmental strains.

All the isolates of *Salmonella* Blockley were susceptible to the antibiotic drugs tested (Table 1). Twenty isolates (44%) of *S. Typhimurium* were resistant to Streptomycin and Tetracyclin and seven (14%) to Ampicillin whereas 100% of the *S. 4,12:i* isolates were resistant to the same antibiotic drugs. The main resistance pattern for *S. Typhimurium* was SSuT accounting for 22 isolates (44%) and ASSuT for *S. 4,12:I* accounting for 10 isolates (66%). Most of the *S. Brancaster* isolates remained susceptible to the tested antibiotics except Streptomycin. *S. Hadar* isolates exhibited 100% of resistance against Streptomycin and Tetracyclin, 54% against Cephalotin and 81% against Nalidixic acid and Enrofloxacin. The most common resistance pattern was a seven-resistance profile AAmcCfEnrNaST accounting for 46% of the isolates (Table 2).

The comparison between the *Salmonella* status of chicken carcasses with the *Salmonella* status of live broiler chickens and abattoir environment samples showed that 35% of the slaughtered flocks remained negative when these steps were also negative. Among the positive slaughtered flocks, 28% exhibited the same strain than the one present in live broiler chickens and 72% with one in abattoir environment (Table 3).

#### 4. Discussion

Because many factors could interact with *Salmonella* detection (Jorgensen et al., 2002), we chose to use different ways of sampling: intestines, neck skins and carcass rinses. Generally, intestinal contents have been reported to provide the best sensitivity (Arsenault et al., 2007) but some other studies have shown *Salmonella* was more frequently isolated from samples containing chicken skin (Jorgensen et al., 2002). In our study, *Salmonella* was detected preferentially in carcass rinses even if *Salmonella* are firmly attached to the chicken skin and are not easy to dislodged by rinsing (Lillard, 1988); but carcass rinses were analysed individually and use of pooled samples (for intestines and neck skin) might have lead to a reduction in culture sensitivity (Achen et al., 1998).

56% of the broiler-chicken flocks at slaughter tested positive for *Salmonella* spp. These rates of contamination are far higher than the ones in Europe (15.6%) and particularly in France

(7.4%) (Efsa, 2010). These differences are directly related to the climatic conditions since in Reunion Island, temperature and humidity are always high along the year and the production systems are different too (open-sided poultry houses, tropical feeding raw materials...). The distribution of *Salmonella* serovars was also different from the distribution in Europe where *S. Infantis* and *S. Enteritidis* were the most prominent ones (EFSA, 2010). *S. Typhimurium* and *S. Hadar* have also been recovered in Europe where they are among the top ten serotypes associated with broiler-chicken. The presence of *S. Typhimurium* in poultry (live broiler chickens as well as chicken carcasses) is of considerable importance from the standpoint of public health (Sarwari et al., 2001) and particularly in Reunion island where it is the most frequent serovar incriminated in food poisoning (D'ortenzio et al., 2008). The high level of *S. Typhimurium* contamination could be attributed to the specific conditions in Reunion Island; most of the island is covered by sugarcane fields that are natural habitats of rodents and rodents are known to be vehicles of *S. Typhimurium* (Meerburg et al., 2007). Because most of poultry houses are open-sided, rats can come into close contact with broilers and transfer these bacteria. The atypical *Salmonella enterica* I 4,[5],12:i:- emerged few years ago in Reunion Island and because of the close genetic relationship, it is certainly a monophasic isolate of *S. Typhimurium* (Switt et al., 2009). *S. Blockley* and *S. Brancaster* were not detected in Europe in the latest studies (EFSA, 2010); however, *S. Blockley* is among the five most frequently isolated serotypes from both avian and human sources in Japan (Limawongpranee et al., 1999), Malaysia (Arumugaswamy et al., 1995), and Thailand (Sasipreeyajan et al., 1996). The high degree of overall similarity (>90% of similarity) from PFGE suggested that the strains originated from a single clone and this clone could have been introduced in the island few years ago by importing some avian products from Thailand. *S. Brancaster* is also one of the predominant serovar in Reunion Island; information on the epidemiology of *Salmonella* Brancaster is rather limited. Beli et al., (2001) found this serovar in chicken-meat samples in Albania and Cardinale et al., (2004) in Senegal. It was also isolated in the Toscana region of Italy (Fontin et al. 1993; Pacini et al. 1994), and in the USA from human cases. Data from the Danish Veterinary Laboratory of the Ministry of Agriculture, Food and Fisheries showed that *Salmonella* Brancaster was occasionally isolated from both pig and cattle herds and from meat, especially from beef and pork, and also from turkey meat (Baggesen et al. 1999). In Reunion Island, *S. Brancaster* is the second most important *Salmonella* serovar recovered from poultry but its human incidence remains unknown.



This study highlighted the primary source of *Salmonella* was the farm of origin and downstream stages in «process»ing could not remedy to but amplify this *Salmonella* contamination. Poultry slaughter is a multi-stage operation and because of cross-contamination the *Salmonella* incidence of carcasses often exceeds that of infection in live birds (Humphrey et al., 1988). Defeathering fingers were the most contaminated step in the slaughtering «process» with 36% positive samples. The surface of the fingers becomes roughened with increasing use allowing bacteria to colonise crevices on the surface and to multiply overnight if not disinfected properly; then, during next defeathering, bacteria are transferred from the rubber fingers to the carcasses (Musgrove et al., 1997). Twenty per cent of evisceration machine samples were positive; this result confirmed the need for thorough feed withdrawal before slaughtering in accordance with Lillard et al. (1984) who recovered a significantly higher *Salmonella* incidence from fully eviscerated carcasses than from non-eviscerated carcasses because of reduced opportunity for cross-contamination. Because of only one scalding tank in this slaughtering «process», scalding water remained a cross-contamination step; Cason et al. (2000) have shown that *Salmonella* contamination was only reduced after the third tank. Trampel et al. (2000) explained *Salmonella* could survive in scald water because of likely protection by faecal particles, feathers or even by carcass temperature which does not reach the temperature of scalding water itself. Our study highlighted also the need of effective crate cleaning procedure as 15% of these transport crates were *Salmonella* positive. Rigby et al. (1981) had already shown that poorly-washed crates were an important source of *Salmonella*. Another problem in Reunion was the risk of cross-contamination during transport from the farms to the slaughterhouse since broiler-chicken flocks were mixed into the same truck.

The predominant *Salmonella* serovars were susceptible to most of the tested antibiotic drugs but *S. Hadar* exhibited high levels of resistance. As described in England (Threlfall et al. 1997) and France (Breuil et al. 2000), *S. Hadar* emerged in Reunion island as particularly resistant to Na (81%) and this resistance was also associated with reduced efficacy of fluoroquinolones, such as enrofloxacin (81% also). According to Malorny et al. (1999), the development of quinolone-resistant strains in humans and animals is related to the introduction of these antibiotics in veterinary medicine. This worldwide overuse of antimicrobials has created enormous pressure for the selection of antimicrobial resistance among bacterial pathogens (WHO, 2000); this explained why the same pulsotype (B37) did

not exhibit the same antibiotic resistance profile which is directly related to the use of drugs at the farm level (Usera et al., 2000). In Reunion Island, quinolones were introduced in poultry production in 1996 in order to treat respiratory and intestinal diseases but they are forbidden now since 2006. As everywhere else in Europe, antibiotics may only be used therapeutically and prophylactically (Anon 2003c).

The comparison between the *Salmonella* serovars (and their pulsotypes) isolated from chicken carcasses and those from live broilers confirmed that broiler-chickens are infected primarily at the farm. Horizontal transmission on the farm during the rearing period could occur because of numerous factors: inadequate cleaning and disinfection of broiler rearing houses leading to contamination of the following flock, a poor level of hygiene and contamination of feed (White et al. 1997). In our study, in most cases (28%), once a specific strain had infected the birds, it seemed to persist till the end of the slaughtering «process». These results are in contradiction with those of Lahellec and Colin (1980) who said the serotypes present in broiler houses did not persist after «process»ing but they were working only on serotypes; but the results are in accordance with Kim et al. (2007). Along the «process»ing line, generally, many serovars could contaminate the chicken carcasses even if the initial contamination with farm-origin *Salmonella* strain remained. In our study, most of the chicken flocks at slaughter (30%) became infected after leaving the farm. Contamination of *Salmonella*-negative flocks occurred either during transport with contaminated crates or during «process»ing when the plant was contaminated. Again, the strains isolated on chicken carcasses at the end of «process»ing were identical phenotypically (serovar) and genotypically (pulsotype) with those isolated on transport crates or in the slaughtering plant. Contrary to results from studies in the 80s (Lahellec and Colin, 1985; Higgins et al., 1981) that considered the very first stages of production (parent flocks, hatchery) most involved in *Salmonella* infection, there is a clear decrease of their relative importance whereas horizontal transmission of *Salmonella* to broilers during rearing and to broiler carcasses in the slaughterhouse seem to be the main determinative factors today (Heyndrickx et al., 2002). Improved hygiene management during transport of broilers and in slaughterhouses can significantly reduce the risk of *Salmonella* contamination of poultry meat and then the risk of food poisoning in Reunion Island.

Table 1: Percentage of antimicrobial resistance for the four serovars isolated in poultry and abattoir environment (Reunion island, 2007 – 2009, 185 isolates)

	S. Blockley (n=77)		S. Typhimurium (n=50)		S. 4,12:i (n=15)		S. Brancaster (n=17)		S. Hadar (n=26)	
	Chick en	En vt	Chick en	Envt	Chick en	Envt	Chick en	En vt	Chick en	Envt
Ampicillin (A)			17(3)	20(4)	100(7)	100(8)			80(8)	62(10)
Amoxicillin – clavulanic Acid (AMC)									70(7)	37(6)
Chloramphenicol (C)										
Ceftazidim (CAZ)										
Cephalotin (Cf)									70(7)	44(7)
Colistine (CS)										
Cefotaxim (CTX)										
Enrofloxacin (ENR)									70(7)	88(14)
Gentamicin (GM)										

---

Kanamycin (K)							10(1)	19(3)
Nalidixic Acid (NA)				1(7)			70(7)	88(14 )
Ofloxacin (OFX)								
Streptomycin (S)	26(13)	79(1 9)	100(7)	100( 8)	65(11)	6(1 )	100(1 0)	100(1 6)
Sulfonamid (Su)								
Cotrimoxazol (SXT)		4(1)						
Tetracyclin (T)	29(17)	63(1 5)	100(7)	100( 8)	6(1)		100(1 0)	100(1 6)

---

Table 2: Antimicrobial resistance pattern and PFGE pattern for *S. Blockley*, *S. Typhimurium*, *S. 4, 12: I*, *S. Brancaster* and *S. Hadar* isolates (Reunion Island, 2007-2009, 185 isolates).

Salmonella Serovars	Broiler chicken			Environment		
	PFGE Pattern	Antibiotic pattern	susceptibility	PFGE Pattern	Antibiotic pattern	susceptibility
<i>S. Blockley</i> (n=77)	B1 (2)					
	B2 (48)			B2 (25)		
	B4 (1)			B3 (1)		
<i>S. Typhimurium</i> (n=50)	B50(2)	ASSuT(1)		B50(4)		
	B54(15)	SSuT(15)		B54(8)	SSuT(7)	
				B60(1)		
	B62(5)			B62(3)	SuT(1)	
	B73(1)	ASSuT(1)		B73(3)	ASSuT(3)	
	B74(1)	ASSuT(1)				
<i>S. 4,12:i:-</i> (n=15)	B77(2)	T(2)		B77(5)	T(5)	
	B69(1)	ASSuT(1)		B69(3)	ASSuT(3)	
<i>S. 4,12:i:-</i> (n=15)	B73(6)	ASSuT(6)		B73(5)	ANaSSuT(1) ASSuT(4)	
	<i>S. Brancaster</i> (n=17)	B5(14)	S(10) T(1)		B5(2)	S(2)
				B6(1)		
<i>S. Hadar</i> (n=26)	B37(7)	AAmcCfEnrNaST(4)		B37(13)	AAmcCfEnrNaST(8)	
		AAmcCfNaST(1) EnrNaST(1) ST(1)			AAmcCfNaST(1) EnrNaST(4)	
				B39(2)	AKST(1) S(1)	
	B40(2)	AKST(1) ST(1)		B40(2)	AKST(2)	

Table 3: Salmonella status of the chicken flock at the end of slaughtering «process» according to Salmonella status of live broiler chicken flocks and environmental samples from the abattoir (Reunion island, 2007-2009, 71 flocks)

		Negative Flocks	Positive Flocks contaminated with	
			One serovar	Several serovars
Live Broiler chickens	Negative	25(35%)*	11(15%)	15(21%)
	Positive	6 (8%)	7(10%)	7(10%)
	Identical Serovar + Pulsotype		6(8%)	5(7%)
	Identical Serovar + different Pulsotype			
	Different Serovars		1(1%)	2(3%)
Environment	Negative	24(34%)	2(3%)	
	Positive	7(8%)	15(21%)	23(32%)
	Identical Serovar(s) + Pulsotype(s)		11(15%)	18(25%)
	Identical Serovar + different Pulsotype			
	Different Serovar(s)		8(11%)	10(14%)

\*number of flocks (percentage)

## **2.2. Discussion de la deuxième partie**

### 2.2.1. De la méthodologie

Nous avons choisi différentes méthodes d'échantillonnage car de nombreux facteurs peuvent intervenir dans la détection de *Salmonella* (Jorgensen et al., 2002). La prévalence constatée sur les lavages de carcasses, les peaux de cou ou sur les intestins varie selon les études. Généralement la détection dans les intestins serait davantage sensible (Arsenault et al., 2007), mais dans d'autres études il s'agirait des peaux de cou (Jorgensen et al., 2002). Dans les travaux de Jorgensen et al., (2002) la prévalence détectée sur les lavages de carcasses était significativement plus faible que celle obtenue sur les peaux de cou. ; ces différences pouvant s'expliquer par le fait que les bactéries soient fermement attachées à la peau des poulets (Lillard, 1988) et qui ne seraient pas facilement détachables lors du rinçage des carcasses ; cependant d'autres facteurs comme la présence de flores bactériennes connexes pourraient également y jouer un rôle.

Le pool des échantillons des peaux de cou ainsi que des intestins a sûrement dû contribuer à une diminution de la sensibilité pour la détection de *Salmonella* (Achen et al., 1998).

### 2.2.2. Des résultats

Si l'on compare nos résultats avec ceux obtenus dans le rapport de l'Efsa (EFSA, 2010), les prévalences sur les carcasses (56%) sont supérieures à celles établies en Europe (15.6%) et en France (7.4%). Ces différences sont probablement liées aux différences de climat ; il serait donc intéressant de pouvoir collecter les données météorologiques (hygrométrie, température, vitesse des vents...) et de les corrélérer avec la présence de *Salmonella* afin de voir si ces variables pourraient influencer sur la présence de *Salmonella*.

De même, les sérotypes majeurs diffèrent de ceux observés en Europe. A l'inverse de *S. Enteritidis* et de *S. Infantis* qui figurent en tête des listes en Europe, *S. Blockley*, *S. Typhimurium*, *S. Brancaster* *S. Hadar*, *S. 1,4,[5]12:i:-* sont les sérotypes majeurs identifiés circulant à l'abattoir. De 1996 à 2005, selon la DRASS, sur les 16 TIAC dues à *Salmonella* (72 foyers de TIAC au total), 4 TIAC étaient provoquées par *Salmonella Typhimurium*. En

plus de ce sérovar, *S.* I 4,[5],12 :- est en pleine émergence sur l'île d'où l'importance de mettre en place des mesures afin de limiter leur propagation.

*S.* Blockley, rarement détecté en Europe, est un sérotype fréquemment identifié en Asie, chez la volaille mais également chez l'être humain (Limawongpranee et al., 1999; Sasipreeyajan et al., 1996). De ces constatations, et à la vue des résultats obtenus par PFGE qui montre une faible diversité génétique, nous supposons que ce sérotype a été introduit il y a peu de temps à la Réunion par l'importation de produits issus de pays asiatique.

Sur la chaîne d'abattage, certains matériels s'avèrent être plus difficiles à nettoyer que d'autres du fait de leur structure et de leur composition tels que les doigts plumeurs composés en caoutchouc qui constituent des niches écologiques de choix pour les bactéries. De ce fait, il n'est pas surprenant que ce soit l'étape la plus contaminée (36% des échantillons positifs). Il est nécessaire que le nettoyage et la désinfection à cette étape soient appliqués de manière rigoureuse afin d'éviter la multiplication des *Salmonella* à cet endroit. En revanche, le protocole utilisé à l'abattoir pour le nettoyage est rigoureux et est réalisé en 7 étapes qui sont les suivantes :

1-Pré-nettoyage haute pression

2-Passage alcalin chloré à 3% au canon à mousse (matière active Hypochlorite de sodium)

3-Temps de contact minimum de 20 minutes

4-Rinçage basse pression

5-Passage au désinfectant à 1% au canon à mousse (matière active Aldéhyde glutarique 50.5g/l ; chlorure d'Alkyl Diméthyl ; Benzyl Ammonium 50.5g/l)

6-Temps de contact minimum de 30 minutes

7-Rinçage basse pression

Les contaminations croisées durant le «process» pourraient cependant être diminuées avec l'utilisation de plusieurs bacs d'échaudage à la place d'un seul bac comme actuellement utilisé. Cason et al., (2001) ont démontré une diminution de *Salmonella* après le passage dans un troisième bac d'échaudage. Toutes les structures ne permettent cependant pas d'installer plusieurs bacs d'échaudage, car cela représente un coût d'investissement supplémentaire pour l'abattoir.



Les contaminations peuvent également provenir des caisses de transport ; elles sont nettoyées automatiquement et replacées directement sur les camions. Cependant, il arrive que des fientes y restent accrochées et contribuent donc à la persistance des *Salmonella* sur les caisses de transport qui rentreront à nouveau dans les élevages. Actuellement un autre problème de contamination réside durant le transport des animaux car différents lots de plusieurs élevages sont mélangés sur le même camion bien que les lots positifs soient récupérés en dernier afin de limiter le risque de contamination.

Globalement, les risques de contaminations au niveau de l'abattoir se situent aux mêmes endroits que dans les abattoirs européens mais la distribution des sérovars est différente et peut influencer sur le mode de gestion du risque.

Au vu de ces constatations il est important de diminuer la prévalence de *Salmonella* au cours du « process » et in fine au sein des produits finis. A la Réunion, la consommation de volaille est très importante avec plus de 40 kg/hab/an ; de nombreux produits de charcuterie à base de volaille sont élaborés dont les saucisses où sont incorporées non seulement la viande mais aussi la peau, siège majeur de *Salmonella* pour leurs fabrications. Les analyses portant sur ce type de produits ont fait l'objet de nos investigations mais cette piste serait nécessaire d'être approfondie du point de vue quantitatif afin d'évaluer l'impact possible sur le consommateur.

Dans la continuité de cette remarque, il serait également intéressant d'approfondir nos recherches dans la restauration à la Réunion et en particulier chez les vendeurs de barquettes en bords de route afin de connaître avec davantage de précisions les conditions de préparation et de cuisson et estimer le risque pour le consommateur.

La résistance aux antibiotiques observée est faible, bien que des phénomènes de résistance inquiétants soient décelés pour *S. Hadar*, notamment pour les quinolones ; la résistance chez l'animal et l'homme a été corrélée avec l'introduction de ces antibiotiques en médecine vétérinaire. A la Réunion l'usage des quinolones est interdit depuis 2006 et les antibiotiques sont utilisés à des fins thérapeutiques et prophylactiques uniquement et non plus comme facteurs de croissance. Contrairement à ce qui avait été démontré dans les études des années 80 qui énonçaient que les étapes en amont de la production étaient responsables de l'infection par *Salmonella*, il s'avère que les étapes en aval contribueraient également à leur dissémination. L'amélioration des pratiques d'hygiène restent nécessaires et primordiales dans la lutte contre *Salmonella* en filière avicole afin de diminuer le risque de contamination

des aliments destinés à la consommation humaine. L'impact sur la santé publique et la diversité des sources infectieuses par *Salmonella* fait l'objet de notre dernier chapitre détaillé ci après.

### 3. Diversité des sources infectieuses par *Salmonella* et impact sur la santé publique

#### 3.1. Diversité des sources infectieuses

L'épidémiologie de *Salmonella* s'avère complexe et l'origine des sources infectieuses souvent multiple. Bien que de nombreuses mesures puissent être mises en place lors de la transformation pour limiter les contaminations microbiennes, la majorité des cas de toxi-infections alimentaires reste liée à *Salmonella* et *Campylobacter*. *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis, sont responsables, à elles seules, de la moitié des TIAC en France (Bouvet and Grimont, 2001). A la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, deux phénomènes majeurs sont apparus, celui de l'augmentation des infections à *Salmonella* Enteritidis liée à la consommation de produits à base d'œufs et celui de l'augmentation de résistance aux antibiotiques pour *Salmonella* Typhimurium. En France, les *Salmonella* dites ubiquistes responsables des toxi-infections alimentaires, représentent 96% des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme.

La meilleure prévention est la réduction de la contamination des denrées alimentaires d'origine animale par une meilleure maîtrise de toutes les étapes en amont, depuis le contrôle des matières premières alimentaires pour les volailles, en passant par toutes les étapes de production; ainsi la maîtrise des risques en amont s'avère être un enjeu économique et de santé publique primordial.

La réglementation actuelle en plus des sérovars Enteritidis et Typhimurium prend en compte 3 autres sérovars, Hadar, Virchow et Infantis. Il va s'en dire que la plupart des gens sont sensibles à la présence de *Salmonella* quelque soit le sérovar si le nombre de bactéries par gramme est suffisamment important (EFSA, 2010).

A la Réunion, très peu d'informations sont disponibles sur les TIAC et les déclarations sont sous-estimées. Malgré ce constat, et parmi les déclarations effectives, *S.* Typhimurium serait la cause la plus importante ; d'autres sérovars ont par ailleurs été investigués comme *S.* Weltevreden (D'ortenzio et al., 2008).

Dans notre étude, nous avons cherché à mettre en évidence la proximité des souches animales et humaines pour voir si les souches identifiées à partir de la volaille pouvaient être responsables de TIA chez l'homme.

De plus, nous avons tenté de mettre en évidence des phénomènes de résistance aux antibiotiques dans les sérovars majeurs identifiés afin d'évaluer si le niveau de résistance des salmonelles chez la volaille pouvait, à plus ou moins long terme, être un danger pour le consommateur.

Les résultats de cette partie de l'étude ont fait l'objet d'une soumission dans « Applied and Environmental Microbiology »

3.1.1. Résumé et conclusion de la publication 4 : étude épidémiologique de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Hadar, Blockley, Virchow et Weltevreden isolés de poulets, d'hommes et d'environnement par PFGE et par sensibilité aux antibiotiques à l'île de la Réunion (Océan Indien) »

*S. Blockley*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Weltevreden* sont les principaux sérovars isolés chez les poulets blancs à la Réunion. Le but de cette partie de l'étude était d'investiguer l'épidémiologie de ces sérovars isolés de sources différentes par deux techniques : d'une part la PFGE et d'autre part par des tests de sensibilité aux antibiotiques dans le but d'évaluer le potentiel infectieux de la viande de volaille pour l'homme.

Entre octobre 2007 et janvier 2009, 228 souches ont été collectées et identifiées : 37% (84 souches) étaient des *S. Blockley*, 33% (75 souches) des *S. Virchow*, 16% (38 souches) des *S. Hadar* et 14% (31 souches) des *S. Weltevreden*. La majorité des souches (51%) provenaient de volailles, 38% d'environnement de fermes et d'abattoir, et 12% de patients locaux atteints de diarrhée causée par *Salmonella*.

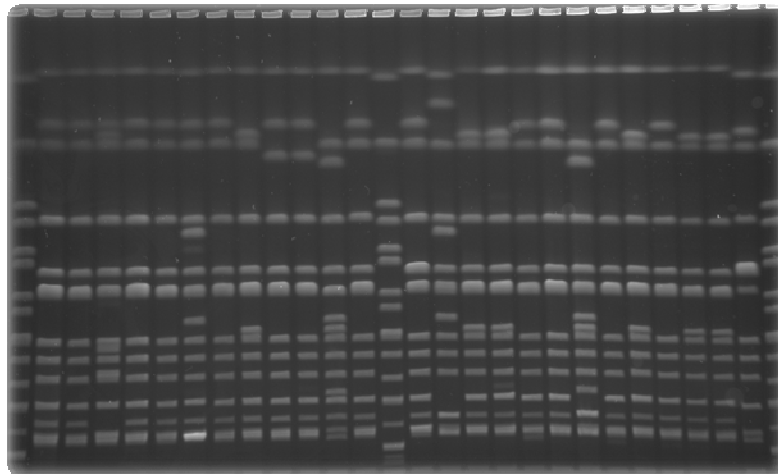
D'après les résultats d'analyses obtenues par PFGE, 4 profils distincts ont été obtenus pour *S. Blockley*, 12 profils pour *S. Virchow* et *S. Weltevreden* et 5 profils pour *S. Hadar*. Des résistances à différents antibiotiques ont été observées essentiellement pour *S. Virchow* (13% des isolats) et pour *S. Hadar* (82%).

La similarité observée entre les profils de souches humaines et de volailles souligne une possibilité de transmission de *Salmonella* entre la volaille et l'homme via la viande contaminée.

Cette étude a souligné que des efforts entre les différents acteurs de la filière étaient nécessaires pour diminuer l'incidence de *Salmonella* chez l'homme.

3.1.2. Publication 4 : Epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Hadar, Blockley, Virchow and Weltevreden from broiler chickens, humans and environment using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility in Reunion Island (Indian Ocean).

**Epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Hadar, Blockley, Virchow and Weltevreden from broiler chickens, humans and environment using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility in Reunion Island (Indian Ocean).**



**Figure 20 : Gel obtenu de la PFGE après révélation aux UV (I.Henry, 2009)**

Epidemiological study of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Hadar, Blockley, Virchow and Weltevreden from broiler chickens, humans and environment using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antimicrobial susceptibility in Reunion Island (Indian Ocean).

\*Isabelle Henry, CIRAD- Crête d'Or Entreprise, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

Marianne Chemaly, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [marianne.chemaly@anses.fr](mailto:marianne.chemaly@anses.fr)

François Xavier Weill, Institut Pasteur, Unité des bactéries Pathogènes entériques, Centre National de Référence des Salmonella, Paris, France

Mail : [fxweill@pasteur.fr](mailto:fxweill@pasteur.fr)

Sophie Granier, Afssa CEB, 23 ave Général de Gaulle, 94706 Maisons Alfort Cedex, France

Mail : [sophie.granier@anses.fr](mailto:sophie.granier@anses.fr)

Françoise Lalande, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [francoise.lalande@anses.fr](mailto:francoise.lalande@anses.fr)

Céline Courtillon, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [celine.courtillon@anses.fr](mailto:celine.courtillon@anses.fr)

Gilles Salvat, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [gilles.salvat@anses.fr](mailto:gilles.salvat@anses.fr)

Eric Cardinale, Cirad Bios, CRVOI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion. Mail : [eric.cardinale@cirad.fr](mailto:eric.cardinale@cirad.fr)

\*Corresponding author

Isabelle Henry

CIRAD-Crête d'Or Entreprise

2 rue maxime rivière

97 490 Sainte Clotilde

La Réunion

Tél: (+262) (0) 2 62 93 88 24

Gsm: (+262) (0) 6 92 60 56 57

Fax: (+262) (0) 2 62 93 88 01

Mail: [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

## Short title

Epidemiology of the main *Salmonella* serovars in Reunion Island

## Key words

*Salmonella*, Broiler chickens, humans, PFGE, Reunion Island, antibiotic susceptibility

## Abstract

*Salmonella enterica* serovars Blockley (*S. Blockley*), Virchow, Hadar and Weltevreden are the main *Salmonella* serovars isolated from poultry in Reunion Island, a French territory in the Indian Ocean. *Salmonella* Typhimurium is also a predominant *Salmonella* serovar but it has been presented in another article. The aim of this study was to investigate the epidemiology of these *Salmonella* serovars from broiler chickens, humans and environment by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility and to assess the significance of broiler chicken meat as a source of human infection.

A total of 228 strains were collected between October 2007 and January 2009. Fifty percent (117 strains) were isolated from broilers, 38% (85 strains) were isolated from environment, 12% from local patients with sporadic diarrhea (26 strains). Thirty seven % (84 strains) were *S. Blockley*, 33% (75 strains) *S. Virchow*, 16% (38 strains) *S. Hadar*, and 14% (31 strains) *S. Weltevreden*.

The PFGE of *Xba*I digested chromosomal DNA gave 4 distinct profiles for *S. Blockley*, 12 for *S. Virchow* and *S. Weltevreden*, 5 for *S. Hadar*. Multi-drug resistance (more than two antibiotic drugs) was encountered for *S. Virchow* (13% of the isolates) and *S. Hadar* (82%).

The sharing of similar PFGE profiles among isolates from humans and poultry provided indirect evidence of *Salmonella* transmission from contaminated broiler meat. However, most of the *Salmonella* isolates remained drug sensitive.

Efforts are needed to reduce *Salmonella* incidence from poultry meat intended to human consumption. This study has also highlighted the need for continuous surveillance to monitor antimicrobial resistance in bacteria associated with animals and humans.



## Introduction

*Salmonella* spp. is a member of the *enterobacteriaceae* family. They are gram negative, facultative anaerobes and inhabit the intestinal tract of animals (12) and may be recovered from a variety of hosts: poultry, swine, small mammals, humans and environment (14, 16, 17, 22, 31, 43 ). There are currently 2579 serovars of *Salmonella* (10).

Salmonellosis is a food-borne disease of primary concern in developed as well as developing countries; salmonellosis has been the second most frequently reported human zoonotic disease for many years in the European Union. In 2008, *Salmonella* was the most common causative agent accounting for 1,888 outbreaks in the EU (8). Each year, an estimated 1.4 million cases of salmonellosis occur among humans in the United States (21). Chicken meat and products were reported to be the most frequent cause of infections, followed by eggs and egg products, bakery products, pig and meat products (9).

Moreover, although most infections are self limited, antibiotic treatment is essential for severe illness. Resistance to antibiotic drugs is of utmost importance to public health and control of antimicrobial resistance is necessary to limit the transfer of resistant *Salmonella* from animals to human.

Reunion is a French Island in the Indian Ocean (figure 1) where poultry production is one of the main activities. In Reunion Island, vectors as rodents also pose a serious sanitary risk as vehicles of several diseases to human and domestic animals such as salmonellosis (17, 23, 27). Actually, contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and an economic problem particularly because the Reunion island population consumes a lot of chicken (more than 35 kg/cap/yr) and also eats 100% chicken sausages made up of chicken skin and meat. Little information on prevalence and antibiotic susceptibilities of *Salmonella* spp. in Reunion Island is available; no animal epidemiological study has been undertaken yet.

Then, the aim of our study was to investigate the epidemiology of *Salmonella* serovars from broiler chickens, humans and environment by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility and to assess the significance of broiler chicken meat as a source of human infection.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Four *Salmonella* serovars (Blockley, Virchow, Hadar and Weltevreden), the most commonly associated with poultry in Reunion island, were used for PFGE and antibiotic-susceptibility analysis. A total of 228 isolates were included in this study: 26 were isolated from Reunionese patients with sporadic diarrhoea (1 *S. Blockley*, 7 *S. Virchow*, 8 *S. Hadar* and 10 *S. Weltevreden*), 117 from broiler chickens (54 *S. Blockley*, 41 *S. Virchow*, 12 *S. Hadar* and 10 *S. Weltevreden*) and 85 from environment (29 *S. Blockley*, 27 *S. Virchow*, 18 *S. Hadar* and 11 *S. Weltevreden*). The poultry isolates all came from live broiler chickens (faeces and litter) and from carcasses. The environment isolates came from farm environment (changing room, wall and equipment, surroundings, litter beetles (tenebrionidae), trucks (wheels) and rodents, from abattoir environment (transport crates, at defeathering, on trussing table, at the evisceration step, from scalding water, from utensils and cutting table) and also from some feral birds (*Puffinus lherminieri bailloni*). Four strains from ducks were provided by the local veterinary laboratory. And 2 isolates from chicken sausages were also added to our study. For humans, the strains were provided from one hospital (GHSR Reunion – 10 strains), private laboratories (4 strains) and from Pasteur Institute (Paris, France – 12 strains) which hosts the French National Reference Centre for *Salmonella*. *S. Typhimurium* was also isolated and its epidemiology has been described in another submitted paper.

### Microbiological methods

*Salmonella* strains were isolated by standard culture method according to the NF U47-100:2007 (French Normalisation Association) as previously described (34). All *Salmonella* isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme (10) and using slide agglutination test using *Salmonella* polyvalent O and H antisera (Bio rad).

### Genotypic characterization: RFLP/PFGE

#### DNA extraction

The genetic diversity of all clinical *Salmonella* isolates was assessed by PFGE of genomic DNA digested with XbaI (Roche, Mannheim, Germany), as described previously (15). The running conditions and the molecular size marker were as described in the standardized PulseNet protocol (13). BioNumerics 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used for image normalization and construction of similarity matrices. Bands were assigned manually. Clustering was carried out by the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) based on the Dice similarity index, using a 1% optimization parameter and 1% band-position tolerance. Each profile that differed by one or more extra bands > 30 kb in size was assigned a type (e.g., type X10).

### Electrophoresis

Electrophoresis was carried out with 0.5X TBE buffer at 6 V/cm and 14 °C. The running time was 20h and the pulse ramp time was 2.2–63.8 s. *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was used as a molecular size marker.

Gels were visualized on an UV transilluminator and photographs were captured by a digital imaging system (Video gel doc system, Bio rad). Fragment restrictions patterns were analysed by Bionumerics software (Applied Maths, Sint Marteen, Belgium), performed using UPGMA (unweighted pair-group method with an arithmetic mean) and a dice similarity coefficient (25) with a tolerance index of 5 %, a position tolerance setting of 1% and optimization setting of 1% which generating dendrogram. Fragments smaller than 30 kb were disregarded according to the PulseNet guidelines for standardization (36).

### Discrimination power

Discrimination power was calculated by determining the Simpson discrimination indices (D) according to Hunter (13). These values represent the probability that two distinct isolates will be ranged into different typing groups.

## Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was performed using the disk diffusion method following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI guidelines (32)). The isolates were tested for their susceptibility with the following antimicrobial agents: ampicillin (A; 10 µg), amoxicillin –clavulanic acid (AMC;20/10 µg), cefotaxime (CTX;30 µg), chloramphenicol (C;30 µg), cephalothin (CF;30 µg), ceftazidime (CAZ;30 µg), cotrimoxazole (SXT;1.25/23.75 µg), sulfonamides – NCCLS (Su;300 µg), gentamicin (Gm;10 µg), streptomycin (S;10 µg), kanamycin (K;30 µg), tetracycline (T;30 µg), colistin (Cs;10µg), nalidixic acid (Na;30 µg), ofloxacin (Ofx;5 µg) and enrofloxacin (Enr; 5 µg). *Escherichia coli* (ATCC25922) was used as control strain.

## Results

### PFGE typing

*S. Blockley*. The PFGE of *XbaI* digested DNA from 84 isolates gave 4 stable and reproducible patterns consisting of 14-18 fragments. Pattern B4 was the predominant genotype accounting for 95% of the strains. The genetic relatedness of the PFGE profile, as demonstrated by the dendrogram (figure 2) showed one cluster with 54(64%) strains from broiler chickens, 27(32%) strains from abattoir environment, one from farm environment, one from human, and one from duck. The discriminatory ability (D-value) was 0.09 for the entire panel.

*S. Virchow*. Macrorestriction with *XbaI* yielded 12 patterns consisting of 17-18 fragments. The predominant genotype was B26 accounting for 87% of the strains. The dendrogram showed 2 clusters (figure 3). The first exhibited 96.8% of similarity and the second 94.9%. The first cluster comprised 3 profiles (B34, B35, B36) from 4 broiler isolates, 2 from farm environment and one from abattoir environment. The second cluster consisted of 7 profiles (B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32) from 37 broiler strains, 8 from farm environment strains, 14 from abattoir environment, 1 wild bird strain and 7 human strains. The discriminatory ability (D-value) was 0.43 for the entire panel.

*S. Hadar*. Digestion with *XbaI* demonstrated 5 patterns consisting of 14-16 fragments. The *XbaI* dendrogram (figure 4) showed only one cluster with 91.6% of similarity. The discriminatory ability (D-value) was 0.38 for the entire panel. This cluster accounted 12(31%) broiler strains, 13(34%) abattoir

environment, 3(8%) from farm environment, 1(3%) from duck, 1(3%) from sausage and 7(18%) from human strains.

*Salmonella* Weltevreden. The PFGE of *Xba*I digested DNA from 31 isolates gave 12 patterns (figure 5) consisting of 13-17 fragments with one main cluster accounting for 71% of the strains (84% similarity). The discriminatory ability (D-value) was 0.45 for the entire panel.

Antibiotic resistance patterns

*Salmonella* Blockley: all the isolates were susceptible to the antibiotic drugs tested.

*Salmonella* Virchow: a total of 69 strains (92%) were resistant to nalidixic acid, 10 strains were resistant (13%) to tetracyclin, 6 strains (8%) to chloramphenicol, 7 (9%) to cotrimoxazole; 5 (7%) to sulfonamides and 2 strains (3%) were resistant to kanamycine. The most common resistance profile for *S. Virchow* was a single resistance to nalidixic acid. It was observed in 34 isolates from broilers, 3 from humans and 23 from environment. One multi-resistant profile to chloramphenicol, nalidixic acid, sulfonamide, cotrimoxazole, tetracyclin was recovered from 3 isolates from broilers and 2 from environment. The other resistance profiles are shown in table 1.

*Salmonella* Hadar: A total of 30 strains (80%) were resistant to tetracycline, 28 (74%) to streptomycin, 26 (68%) to nalidixic acid, 23 (60%) to ampicillin, 5 (13%) to kanamycin and 3 (8%) to cephalotin. The main antimicrobial resistance profile for *S. Hadar* was Na, S, T detected in 2 broilers strains, 5 abattoir environment strains, one strain from duck, one from sausage and 2 from humans (table 2). The second most recovered profile was A, Na, S, T observed in 7 broilers strains and 3 environment strains. Three isolates, 1 from broilers and 2 from environment, exhibited the A, Cf, Na, S, T profile. *S. Weltevreden*: Only one human strain (3%) was found to be resistant to tetracycline.

Resistance to antibiotic drugs is summarized in table 3.

## Discussion

The PFGE has been widely recommended for differentiation of *Salmonella* (Threlfall et al. 1994) because of its discriminatory power and successful application in previous epidemiological investigations (30, 40, 44). Use of PFGE with endonuclease *Xba*I has been recognized as a sensitive means for fingerprinting several *Salmonella* serovars (18, 19, 42).

The main pulsotype (B2) accounting for 94% of all *S. Blockley* isolates has been recovered on isolates from broilers, farm and abattoir environment and humans. Nevertheless, only 5% different broilers houses were positive to *S. Blockley* and most of the strains identified came from the abattoir environment. These results underlined the potential cross contamination between broiler flocks at the abattoir where *Salmonella* seems to persist. This persistence could be explained by inadequate cleaning and disinfection procedures resulting in development of biofilms (2). *S. Blockley* has been identified from humans, suggesting a possible infection due to the ingestion of contaminated chicken. The high degree of overall similarity (>90% of similarity) suggested that the strains originated from a single clone. The assumption is that as the time passes and organisms spread, divergence may occur. *S. Blockley* may have been introduced few years ago on the island by importation of avian products from Thailand. In this country, *S. Blockley* was the main serovar identified from poultry and environment (26). In Reunion island, all *S. Blockley* isolates remained sensitive to antibiotic drugs probably because of no selection pressure at the farm (use of antibiotic is under control since 2006); these observations are different from those from Greece where Politi et al., (28) showed that *S. Blockley* harbored a TEM-52 gene-carrying plasmid as it is also one of the five most frequent serotypes among non typhoid *Salmonella* isolated from humans (35) and a prominent serotype among poultry isolates.

The human and poultry isolates showed a common PFGE pattern for *S. Virchow*. The same common pattern (B26) was also isolated from farm and abattoir environment; most of the strains circulating in Reunion island were probably derived from a single clone, as the isolates belonged to two main clusters and had limited genetic diversity (87% similarity). These observations showed that *S. Virchow* was widely disseminated throughout the broiler production. In a pyramidal organisation like the broiler production, several explanations could be proposed for such dissemination. As *S. Virchow* was often isolated from one-day-old chicks coming from the only hatchery in Reunion Island (data unpublished), direct spreading from the hatchery is possible. And contaminated hatcheries are known to be a major risk for *Salmonella* infection in broilers (6). But the broiler chickens could also have been infected from the environment; actually, many vehicles could introduce *S. Virchow* into poultry houses. In accordance with Davies and Wray (7), one way could be wild birds since *S. Virchow* was recovered from Tropical Shearwater (*Puffinus Iherminieri bailloni*) in our study. These birds are regularly met in

some poultry houses where they can enter because the house is open-sided or because the wire netting has been damaged. In addition to high rates of resistance to multiple antibiotics, this serovar displayed notable rates of nalidixic acid resistance (about 92%). This rate of quinolone resistance was by far higher than the rates reported for *Salmonella* serovar Virchow generally in Europe (38) but close to what has been observed in Belgium (3, 33) also showed that this kind of *S. Virchow* phenotype could be associated with reduced susceptibility to ciprofloxacin. However, all the tested isolates were susceptible to enrofloxacin or ofloxacin according to the CLSI criteria.

The high degree of similarity found among isolates from poultry indicates a close genetic relationship between avian strains of *S. Hadar* and those isolated from humans and environment. Most of the isolates shared the same PFGE pattern, B37. However, these strains showed different antibiotic-resistant patterns within the B37 profile, most being resistant to Na,S,T but some also to A and Cf. This variability could be explained by genetic changes, linked, for example, to the selective pressure of drugs used at farm level (41) during the 80s and 90s. As described in England (39) and France (4) *S. Hadar* emerged in Reunion as particularly resistant to Na (68%) and this resistance is often associated with reduced efficacy of fluoroquinolones, such as ciprofloxacin; but no high resistance against enrofloxacin or ofloxacin has been highlighted in our study. According to Malorny et al., (20), the development of quinolone-resistant strains in humans and animals is related to the introduction of these antibiotics in veterinary medicine. In Reunion Island, quinolones were introduced in poultry production in 1996 in order to treat respiratory and intestinal diseases but they are forbidden now since 2006. The presence of *S. Hadar* in raw chicken sausages confirmed that they could be vehicles for transmitting *Salmonella* through consumption as already demonstrated by Murmann et al., (24).

The human and poultry isolates showed very close similarity for *S. Weltevreden*. This serovar was the one of the most isolated from humans in Thailand during the years 1993-2002 (1) and from Malaysia between 1983 and 1992 (45). This serovar was also responsible for an outbreak of gastroenteritis involving 26 guests of a wedding dinner that occurred in August 2007 in Reunion Island (5). In the case control study, these authors showed that the most relevant food exposure was the chicken eaten by 88% of the cases and 58% of the controls. Usually, *S. Weltevreden* is associated with seafood

mainly in USA (11) and Asian countries (29) or fruits and vegetables (37) but Padungtod and Kaneene (26) also confirmed that this serovar was the most frequently isolated from chickens in Thailand.

Even allowing for some genomic diversity within each serovar, this study strongly indicates a close relationship between isolates of serovars Blockley, Virchow, Hadar and Weltevreden from humans and those from broiler-chicken meat products and environment. However, unlike European continental countries, the serovar prevalence in poultry is not similar to that of humans, suggesting that poultry meat is not the only source of *Salmonella* human infections. In fact, collective foodborne poisoning is subject to mandatory disease notifications, but between 1996 and 2005, only 72 food-borne outbreaks have been notified. Among these outbreaks, 16 (22.2%) were due to *Salmonella* (Typhimurium=4; Enteritidis=1; unknown species=11) (D'Ortenzio and Renault 2007). These data are certainly incomplete because of the recognized under-reporting of such events in Reunion. For a better knowledge of *Salmonella* epidemiology on the island and in the South-West Indian Ocean, it is necessary to increase awareness among physicians for rapid notifications of food-borne outbreaks and to improve collaboration between epidemiologists, clinicians, microbiologists and veterinarians for future outbreak investigations. Even though most of the *Salmonella* isolates were susceptible to antibiotics, this study has also highlighted the importance of continuous surveillance to monitor antimicrobial resistance in bacteria associated with animals and humans.

#### Acknowledgments

The Authors wish to thank the staff of Avi Pole Reunion for their collaboration in collecting samples from poultry farms: Jef Reichardt, Jacky Berby, Jimmy Hoarau, François Penverne and Yvon Euzen; thanks also to the farmers.

The Authors would also like to thank the staff of the slaughterhouse for their organization of sample collection: Benjamin Boulanger, Eric Pascal and his staff, Stephanie Yeung, Pierre Reype and Guillaume Burel. Thanks to Dr. Michault, Sandrine Picot (GHSR Reunion) and Dr Rogier for human isolates. The Authors thank all the corresponding laboratories of the French National Reference Centre for Salmonella (FNRC-Salm) network for their collaboration and "The FNRC-Salm is partially



funded by the *Institut de Veille Sanitaire*". The Authors are grateful to the staff of the AFSSA HQPAP and AFSSA CEB laboratory for their help in molecular analyses.

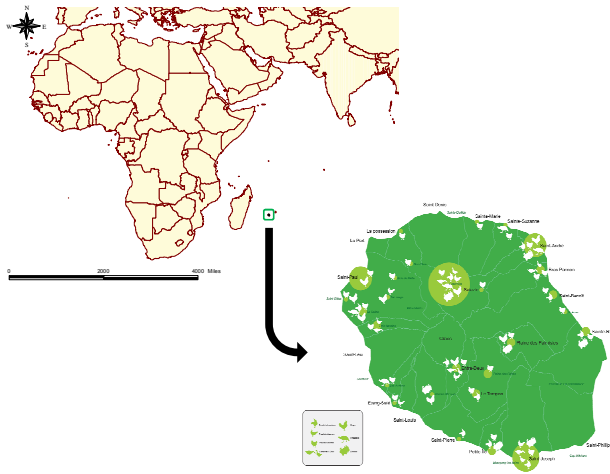


Figure 1: Location of Reunion Island : a French island

located in the Indian Ocean, east of Madagascar,

about 200 kilometers south west of Mauritius

Table 1 Antimicrobial resistance and PFGE patterns for isolates of *S. Virchow* (Reunion Island, 2007-2009, 75 isolates).

<i>Salmonella</i> Virchow			
Source	n	PFGE pattern	Resistance profile (n)
(n, number of strains)			
Broilers (41)	31	B26	Na (31)
	2	B28	Na (2)
	2	B29	C, K, Na, Su, Sxt, T (2)
	1	B31	
	1	B32	Na (1)
	3	B34	C, Na, T (2); C, Na, Sxt, T (1)
Human (7)	1	B36	C, Na, Su, Sxt, T (1)
	3	B26	Na (3)
Farm Environment (10)	4	B29	
	5	B26	Na(5)
	2	B28	Na(2)
	1	B32	Na(1)
	1	B34	C, Na, Su, Sxt, T(1)
	1	B35	C, Na, Su, Sxt, T(1)
Abattoir environment (15)	14	B26	Na(14)
	1	B34	Na, Sxt, T(1)
Wild bird	1	B30	Na (1)
Duck	1	B33	T (1)

Table 2 Antimicrobial resistance and PFGE patterns for isolates of *S. Hadar* (Reunion Island, 2007-2009, 38 isolates).

<i>Salmonella</i> Hadar			
Source (n, number of strains)	n	PFGE pattern	Resistance type (n)
Broilers (12)	10	B37	A, Na, S, T(7)
			Na,S,T (2)
	2	B40	A, Cf, Na, S, T (1)
			A, K, S, T (1) S, T (1)
Human (8)	5	B37	A (1)
	2	B38	Na,S,T (1)
	1	B41	Na,S,T (1)
Farm Environment (3)	3	B37	A,Na,S (1)
			A,Na,S,T (1) A,Cf,Na,S,T (1)
Abattoir environment (13)	9	B37	Na,S,T (5)
			A,Na,S,T (2)
			A, Na,S (1)
			A, Cf, Na, S, T (1)
			A, K, S, T (2)
Sausage (1)	1	B37	A, K, S, T (2)
			A, K, S, T (2)
Duck (1)	1	B37	Na,S,T (1)

Blank in R pattern shows absence of resistance

Table 3: Percentage of antimicrobial resistance for the four serovars isolated in poultry, humans and environment (Reunion Island, 2007 – 2009, 228 isolates)

	S. Virchow (n=75)			S. Hadar (n=38)			S. Weltevreden (n=31)
	Broilers (41)	Humans (7)	Environment (27)	Broilers (12)	Humans (8)	Environment (18)	Human (31)
Ampicillin				11(92%)	1 (12%)	11(61%)	
Amoxicillin – clavulanic Acid							
Chloramphenicol	4 (10%)		2(7%)				
Ceftazidime							
Cephalotin				1(8%)		2(11%)	
Colistine							
Cefotaxime							
Enrofloxacin							
Gentamicin							
Kanamycin	2(5%)			1(8%)		4(22%)	
Nalidixic acid	40(98%)	3(43%)	26(96%)	10(83%)	2(25%)	14(78%)	
Ofloxacin							
Streptomycin				8(67%)	2(25%)	18(100%)	
Sulfonamid	3(7%)		2(7%)				
Cotrimoxazole	4(10%)		3(11%)				
Tetracycline	6(15%)		4(15%)	12(100%)	2(25%)	16(89%)	1(3%)

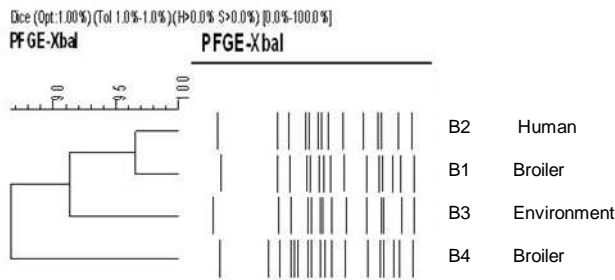


Figure 2 Dendrogram showing the cluster analysis of the different PFGE XbaI pattern from 85 isolates of serovar Blockley generated by bionumerics software using the UPGMA method (Reunion island, 2007 – 2009)

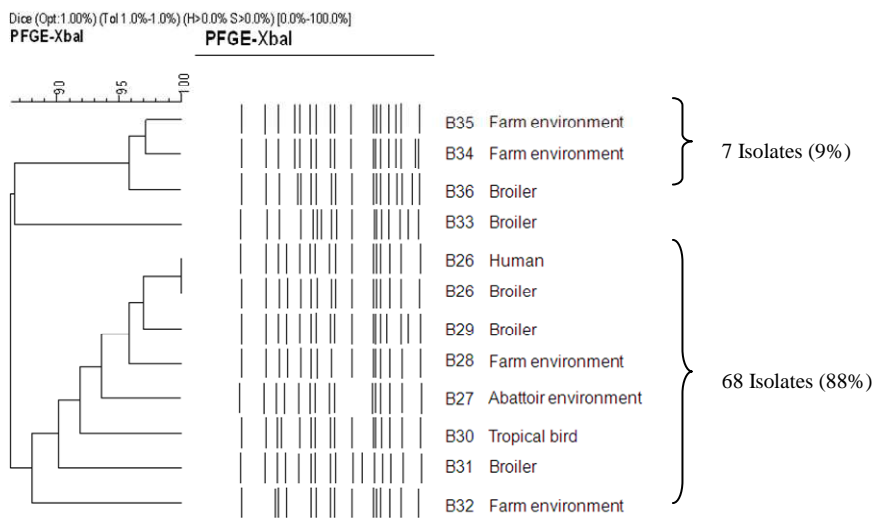


Figure 3 Dendrogram showing the cluster analysis of the different XbaI-PFGE patterns from 77 isolates of *S. Virchow* (Reunion Island, 2007 – 2009).

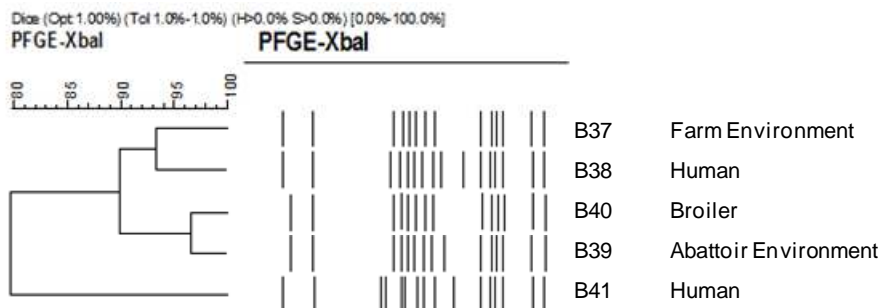


Figure 4 Dendrogram showing the cluster analysis of the different XbaI-PFGE patterns from 37 isolates of *S. Hadar* (Reunion island, 2007 – 2009)

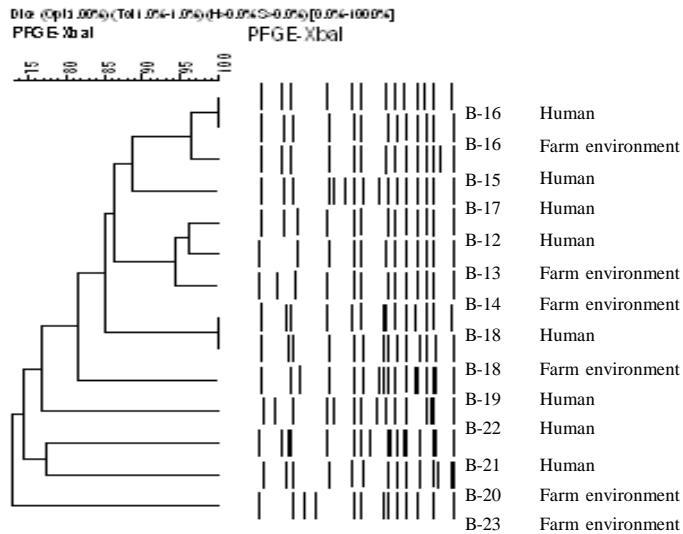


Figure 5 Dendrogram showing the cluster analysis of the different XbaI-PFGE patterns from 31 isolates of *S. Weltevreden*

#### References

1. **Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwong, C. Pulsrikarn, P. Sawanpanyalert, R. S. Hendriksen, D. Wong, and F. M. Aarestrup.** 2004. Salmonella serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerging Infectious Diseases* **10**:131-136.
2. **Barker, J., and S. F. Bloomfield.** 2000. Survival of Salmonella in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. *Journal of Applied Microbiology* **89**:137-144.
3. **Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. D. Grimont, and J. M. Collard.** 2006. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* **44**:2897-2903.

4. **Breuil, J., A. Brisabois, I. Casin, L. Armand-Lefevre, S. Fremy, and E. Collatz.** 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**:965-971.
5. **D'ortenzio, E., F. Weill, S. Ragonneau, J. A. Lebon, P. Renault, and V. Pierre.** 2008. First report of a *Salmonella enterica* serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. *Euro surveillance* **13**:393-395
6. **Davies, R. H., and S. Bedford.** 2001. Observations on *Salmonella* contamination in five turkey hatcheries, p. p.22, The "Current Topics in Veterinary Science" 55th Annual Conference, , Scarborough.
7. **Davies, R. H., and C. Wray.** 1996. Studies of contamination of three broiler breeder houses with *Salmonella enteritidis* before and after cleansing and disinfection. *Avian Diseases* **40**:626-633.
8. **EFSA.** 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008
9. **EFSA.** 2007. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A. The *EFSA Journal* (2007) 98, 1-85. **98**:1-85.
10. **Grimont, P. A. D., and F. X. Weill.** 2007. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*.
11. **Heinitz, M. L., R. D. Ruble, D. E. Wagner, and S. R. Tatini.** 2000. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection* **63**:579-592.
12. **Holt, P. S., R. J. Buhr, D. L. Cunningham, and R. E. Porter.** 1994. Effect of 2 Different Molting Procedures on a *Salmonella-Enteritidis* Infection. *Poultry Science* **73**:1267-1275.
13. **Hunter, P. R.** 1990. Reproducibility and Indexes of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1903-1905.
14. **Kang, Z. W., J. H. Jung, S. H. Kim, B. K. Lee, D. Y. Lee, Y. J. Kim, J. Y. Lee, H. K. Won, E. H. Kim, and T. W. Hahn.** 2009. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Salmonella Enteritidis*

- Isolated from Chickens and Humans in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science* **71**:1433-1438.
15. **Kerouanton, A., M. Marault, R. Lailier, F. X. Weill, C. Feurer, E. Espie, and A. Brisabois.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathogens and Disease* **4**:293-303.
  16. **Kim, Y. H., I. K. Kwon, and J. H. Han.** 2010. Seroprevalence of Swine Salmonellosis in Korean Swine Herds. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **30**:62-65.
  17. **Leon, V., J. Frascina, and M. Busch.** 2009. Rodent control at different spatial scales on poultry farms in the province of Buenos Aires, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**:1113-1118.
  18. **Liebana, E., L. Garcia-Migura, M. F. Breslin, R. H. Davies, and M. J. Woodward.** 2001. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:154-161.
  19. **Lyytikainen, O., J. Koort, L. Ward, R. Schildt, P. Ruutu, E. Japissou, M. Timonen, and A. Siitonen.** 2000. Molecular epidemiology of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Newport in Finland and the United Kingdom. *Epidemiology and Infection* **124**:185-192.
  20. **Malorny, B., A. Schroeter, and R. Helmuth.** 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**:2278-82.
  21. **Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **5**:607-625.
  22. **Meerburg BG, J.-R. W., Wagenaar JA, Kijlstra A.** 2006. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol.* **72**:960-2.
  23. **Michault, A.** 1998. Insularity and the risks of epidemics in Reunion island. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique* **91**:52-55.



24. **Murmann, L., M. C. dos Santos, and M. Cardoso.** 2009. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control* **20**:191-195.
25. **Nei, M., and W. H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, p. 5269-5273, vol. 76.
26. **Padungtod, P., and J. B. Kaneene.** 2006. Salmonella in food animals and humans in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology* **108**:346-354.
27. **Paganin, F., A. Bourdin, C. Dalban, J. P. Courtin, P. Poubeau, G. Borgherini, A. Michault, J. C. Sally, F. Tixier, R. Genin, and C. Arvin-Berod.** 2007. Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases. *Intensive Care Medicine* **33**:1959-1966.
28. **Politi, L., P. T. Tassios, M. Lambiri, A. Kansouzidou, M. Pasiotou, A. C. Vatopoulos, K. Mellou, N. J. Legakis, and L. S. Tzouvelekis.** 2005. Repeated occurrence of diverse extended-spectrum beta-lactamases in minor serotypes of food-borne Salmonella enterica subsp enterica. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:3453-3456.
29. **Ponce, E., A. A. Khan, C. M. Cheng, C. Summage-West, and C. E. Cerniglia.** 2008. Prevalence and characterization of Salmonella enterica serovar Weltevreden from imported seafood. *Food Microbiology* **25**:29-35.
30. **Rivoal, K., J. Protais, S. Queguiner, E. Boscher, B. Chidaine, V. Rose, M. Gautier, F. Baron, N. Grosset, G. Ermel, and G. Salvat.** 2009. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of Salmonella serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* **129**:180-186.
31. **Rodriguez, A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, and F. A. Draughon.** 2006. Prevalence of Salmonella in diverse environmental farm samples. *Journal of Food Protection* **69**:2576-2580.
32. **Smith, K. P., J. George, K. M. Cadle, S. Kumar, S. J. Aragon, R. L. Hernandez, S. E. Jones, J. L. Floyd, and M. F. Varela.** Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and

- genotyping of *Salmonella enterica* isolates from clinical cases of salmonellosis in New Mexico in 2008. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **26**:1025-1031.
33. **Solnik-Isaac, H., M. Weinberger, M. Tabak, A. Ben-David, D. Shachar, and S. Yaron.** 2007. Quinolone resistance of *Salmonella enterica* serovar virchow isolates from humans and poultry in Israel: Evidence for clonal expansion. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:2575-2579.
  34. **Stevens, A., Y. Kabore, J. D. Perrier-Gros-Claude, Y. Millemann, A. Brisabois, M. Catteau, J. F. Cavin, and B. Dufour.** 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology* **110**:178-186.
  35. **Tassios, P. T., C. Chadjichristodoulou, M. Lambiri, A. Kansouzidou-Kanakoudi, Z. Sarandopoulou, J. Kourea-Kremastinou, L. S. Tzouvelekis, and N. J. Legakis.** 2000. Molecular typing of multidrug-resistant *Salmonella* blockley outbreak isolates from Greece. *Emerging Infectious Diseases* **6**:60-64.
  36. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis - Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:2233-2239.
  37. **Thong, K. L., Y. L. Goh, S. Radu, S. Noorzaleha, R. Yasin, Y. T. Koh, V. K. Lim, G. Rusul, and S. D. Puthuchery.** 2002. Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:2498-503.
  38. **Threlfall, E. J., I. S. T. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schnieder, W. Wannet, J. Machado, and G. Edwards.** 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* **8**:41-5.
  39. **Threlfall, E. J., L. R. Ward, and B. Rowe.** 1997. Incidence croissante de la résistance au triméthoprime et à la ciprofloxacine de *Salmonella typhimurium* DT104 épidémique en Angleterre et au Pays de Galles, p. 81-84, vol. 2.

40. **Tsen, H. Y., J. S. Lin, and H. Y. Hsih.** 2002. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. *Veterinary Microbiology* **87**:73-80.
41. **Usera, M. A., A. Aladuena, R. Gonzalez, M. De\_la\_Fuente, J. Garcia\_Pena, N. Frias, and M. A. Echeita.** 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection* **65**  
<http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.22025871:768-73>.
42. **Valdezate, S., A. Echeita, R. Diez, and M. A. Usera.** 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterisation of the emerging gastroenteritis pathogen *Salmonella* hadar. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **19**:275-281.
43. **Vandeplass, S., R. D. Dauphin, Y. Beckers, P. Thonart, and A. Thewis.** 2010. *Salmonella* in Chicken: Current and Developing Strategies To Reduce Contamination at Farm Level. *Journal of Food Protection* **73**:774-785.
44. **Xia, X. D., S. H. Zhao, A. Smith, J. McEvoy, J. H. Meng, and A. A. Bhagwat.** 2009. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology* **129**:93-98.
45. **Yasin, R. M., M. Jegathesan, and C. C. Tiew.** 1997. *Salmonella* serotypes isolated in Malaysia over the ten-year period 1983-1992, p. 1, vol. 9. SAGE Publications.

### **3.2. Impact sur la santé publique**

En 2008, en France *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, and *S. 1,4, [5] ,12: i:-* étaient les serotypes les plus fréquemment isolés chez l'homme avec respectivement 46%,19% et 4% (communication personnelle – Institut Pasteur, France).

*S. Typhimurium* sous sa forme monophasique (*S. 1,4, [5] ,12: i:-*) émerge en Europe mais également à la Réunion avec des phénomènes de résistance aux antibiotiques. Suite à ce constat, il nous a semblé important de faire un point particulier sur *S. Typhimurium* et *S. 1,4, [5],12: i:-* dans la continuité de l'article précédent.

Les résultats de cette partie furent exposés lors de congrès internationaux en complément d'une publication soumise à « Foodborne Pathogens and Disease »

Un poster a été présenté lors de l'I3S (International Symposium Salmonella and Salmonellosis) organisé à St Malo du 28 au 30 juin 2010.

**Henry I., Chemaly M., Granier S., Courtilon C., Lalande F., Salvat G., Cardinale E.** 2010. Epidemiological diversity of *Salmonella enterica* serovars from different sources in Reunion Island (Indian Ocean): focus on *S. Typhimurium* and *S.1,4,[5],12:i:-* . In I3S Proceedings, St Malo, 28-30 juin 2010. p283-284.

Les travaux ont également été présentés à Bangkok lors de la 13<sup>ème</sup> conférence Internationale de l'AITVM sur « Globalization of Tropical Animal diseases and Public Health Concerns » organisé du 23 au 26 Aout 2010.

**Henry I., Reichardt J., Granier S., Salvat G., Cardinale E.** 2010. Epidemiological investigation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* all along the food chain poultry production in tropical area of the Reunion island. In: 13TH Association of Institutions For Tropical Veterinary Medicine Conference 2010. Bangkok, August 2010.

3.2.1. Résumé et conclusion de la publication 5: caractérisation génétique et phénotypique de *Salmonella enterica* serovars Typhimurium et 1,4, [5] ,12: i:- émergeant à la Réunion (Océan Indien): comparaison d'isolats de poulets, d'homme et d'environnement »

*Salmonella enterica* provoque de nombreuses toxi-infections alimentaires dans le monde et représente un problème économique non négligeable. A la Réunion la population est grande consommatrice de viande de volailles (plus de 35kg par habitant et par an) et de charcuterie, fabriquée à base de viande et de peaux qui sont incorporées dans la préparation. Le but de cette étude est d'investiguer l'épidémiologie de *S. Typhimurium* et de *S. 1,4,[5],12:i:-* isolés de poulets, d'hommes et de l'environnement par électrophorèse en champs pulsés (PFGE) et par des antibiogrammes afin d'évaluer si la viande de poulets est une source potentielle d'infection chez l'homme.

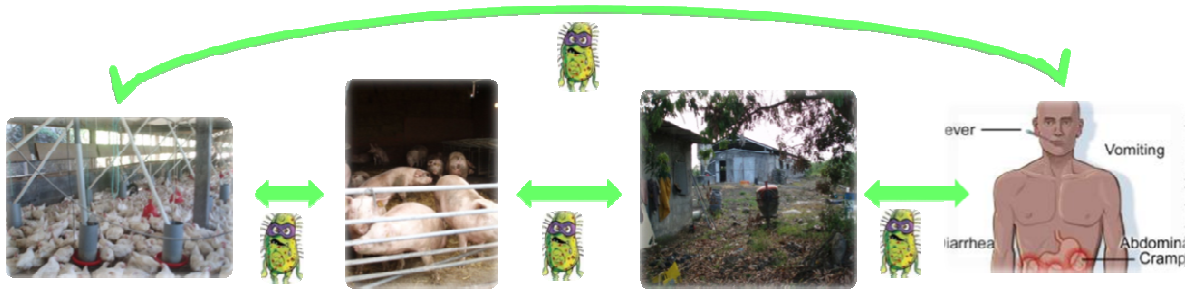
Un total de 157 souches de *S. Typhimurium* et 19 souches de *S. 1,4,[5],12:i:-* ont été isolées et collectées de sources différentes (poulets, hommes et environnement) d'octobre 2007 à Janvier 2009. Après digestion par l'enzyme de restriction *Xba1*, 30 profils distincts ont été obtenus. Un profil majeur, comprenant 32% des isolats (B54), a été caractérisé incluant des souches de différentes origines : poulets, environnement, autres espèces (canard, porcs, rats) ainsi que chez l'homme, soulignant ainsi une possible colonisation de *Salmonella* tout au long de la chaîne alimentaire.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré des résistances à l'ampicilline, la streptomycine, les sulfonamides et la tétracycline.

La similarité observée entre les profils PFGE d'isolats de différentes origines et notamment entre les poulets et l'homme soulignent une possible transmission de *Salmonella* via de la viande contaminée.

3.2.2. Publication 5 : Genetic and phenotypic characterization of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and 1,4,[5],12:i:-, emerging Salmonellas in Reunion island (Indian Ocean): comparison of isolates from broiler chickens, humans and the environment

**Genetic and phenotypic characterization of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and 1,4,[5],12:i:-, emerging Salmonellas in Reunion island (Indian Ocean): comparison of isolates from broiler chickens, humans and the environment**



## Title

Genetic and phenotypic characterization of *Salmonella* enterica serovars Typhimurium and 1,4,[5],12:i:-, emerging Salmonellas in Reunion island (Indian Ocean): comparison of isolates from broiler chickens, humans and the environment

\*Isabelle Henry, CIRAD- Crête d'Or Entreprise, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion.

Mail : [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

Marianne Chemaly, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [m.chemaly@afssa.fr](mailto:m.chemaly@afssa.fr)

François Xavier Weill, Institut Pasteur, Unité des bactéries Pathogènes entériques, Centre National de Référence des Salmonella, Paris, France

Mail : [fxweill@pasteur.fr](mailto:fxweill@pasteur.fr)

Sophie Granier, Afssa CEB, 23 ave Général de Gaulle, 94706 Maisons Alfort Cedex, France

Mail : [s.granier@afssa.fr](mailto:s.granier@afssa.fr)

Françoise Lalande, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [f.lalande@afssa.fr](mailto:f.lalande@afssa.fr)

Céline Courtillon, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [c.courtillon@afssa.fr](mailto:c.courtillon@afssa.fr)

Gilles Salvat, Afssa Unité HQPAP, Site des croix des fusillés, 22440 Ploufragan, France

Mail : [g.salvat@afssa.fr](mailto:g.salvat@afssa.fr)

Eric Cardinale, Cirad Bios, CRVOI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, Réunion. Mail : [eric.cardinale@cirad.fr](mailto:eric.cardinale@cirad.fr)

\*Corresponding author

Isabelle Henry

CIRAD-Crête d'Or Entreprise

2 rue maxime rivière

97 490 Sainte Clotilde

La Réunion

Tél: (+262) (0) 2 62 93 88 24

Gsm: (+262) (0) 6 92 60 56 57

Fax: (+262) (0) 2 62 93 88 01

Mail: [isabelle.henry@cirad.fr](mailto:isabelle.henry@cirad.fr)

## Short running head

Epidemiology of *Salmonella* Typhimurium and S.1,4,[5],12:i:- in Reunion Island

## Key words

*Salmonella*, Broiler chickens, humans, PFGE, Reunion Island, antibiotic susceptibility

## Abstract

*Salmonella enterica* ssp. *enterica* is a leading cause of bacterial food-borne disease outbreaks worldwide and is also an economic burden particularly in Reunion Island because its population consumes large amounts of chicken and cooks 100% chicken sausages (35 kg/cap/yr).

**Aims:** The aim of this study was to investigate the epidemiology of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- from broiler chickens, humans and the environment by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility and to assess the significance of broiler chicken meat as a source of human infection.

**Methods and results:** A total of 157 *Salmonella* Typhimurium and 19 S.1,4,[5],12:i:- were collected and isolated from broiler chickens, humans and the environment between October 2007 and January 2009. The PFGE of Xba1 digested chromosomal DNA gave 30 distinct profiles for *Salmonella* Typhimurium and S.1, 4, [5], 12: i: - . *Salmonella* Typhimurium was characterized by a main pulsotype (B54) and accounted for 32% of all isolates. This pulsotype included isolates from all investigated sources i.e. broiler chickens, environment, other animal species (ducks, pigs and rodents) as well as humans, suggesting that it had already colonized every step of the food chain. Antibiotic susceptibility tests showed that most isolates were resistant to ampicillin, streptomycin, sulfonamides and tetracyclin.

**Conclusions:** The similarity of PFGE profiles of isolates from various sources and particularly from poultry and humans underlined possible transmission of *Salmonella* from contaminated broiler meat, but most of the isolates remained drug-sensitive.

**Significance and impact of study:** Efforts are needed to eliminate *Salmonella* from poultry meat destined for human consumption. This study has also shown the importance of monitoring antimicrobial resistance in bacteria associated with animals and humans.

## Introduction

*Salmonella* is a leading cause of bacterial food-borne disease outbreaks in temperate countries (56) and is also a public health concern in tropical countries (27, 44).

The most commonly implicated foods in outbreaks of human salmonellosis are those of animal origin (13). Most of these infections have been attributed to the consumption of poultry meat and eggs (49).



*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium is one of the most common serovars isolated from humans, animals and food in Europe and the United States (15, 26). In France, *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, and *S. 1,4,[5],12:i:-* were the serovars most frequently isolated in 2008 at 46%, 19% and 4% of clinical isolates, respectively. Furthermore, during the last decade *Salmonella* 1, 4, [5], 12: i: - has emerged around the world (46), and this isolate could be a monophasic isolate of serotype Typhimurium.

*Salmonella* causes diverse disease syndromes ranging from asymptomatic colonization to severe intestinal illness (34). Antimicrobial therapy may be needed; fluoroquinolones and  $\beta$ -lactams are the antibiotic drugs of choice. Nevertheless, global outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* have been reported, particularly for *S. Typhimurium*. Resistance to fluoroquinolones and extended spectrum cephalosporins is still growing in the European Union, Africa (5) and Asia, for example in Japan where a high level of fluoroquinolone-resistant isolates was first identified in 2000 (30). Resistance is of utmost importance to worldwide public health, and controlling antimicrobial resistance is important to limit the transfer of resistant *Salmonella* from animals to humans.

*Salmonella* from poultry have been studied all over the world but no epidemiological study had previously been undertaken in Reunion Island. This island is located in the Indian Ocean, east of Madagascar and west of Mauritius. Reunion is an administrative region of France. Chicken meat production is locally consumed (providing 66% of chicken consumption, with 33% from frozen chicken imported from France). Contamination of chicken with *Salmonella* is both a public health and an economic concern especially since the population of Reunion Island consumes a large amount of chicken (35 kg per capita per year) and cooks 100% chicken sausages.

The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of *S. Typhimurium* and *S. 1,4,[5],12:i:-* from broiler chickens, humans and the environment using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility and to assess the significance of broiler chicken meat as a source of human infection in Reunion Island.

## **Materials and methods**

### **Sample collection**

Between October 2007 and January 2009, a total of 157 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and 19 *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- isolates were collected and isolated on Reunion Island from broiler chickens, poultry farms, slaughterhouses, other animals (pigs, ducks, turkeys and rodents) and humans (Table 1).

The poultry isolates (83 isolates) all came from live broiler chickens (faeces and litter) and from carcasses. The environment isolates (46 isolates) came from farm environment (changing room, wall and equipment, poultry house surroundings, litter beetles (*tenebrionidae*), trucks (wheels) and rodents), from abattoir environment (transport crates, scalding water, defeathering and evisceration

stages, trussing and cutting tables, utensils and from sausages) and from other animals (ducks, turkeys, geese...).

Isolates from pigs (46 isolates) were acquired from a previous study (7) and some isolates from ducks and turkeys were obtained from the local veterinary laboratory.

For humans, isolates (33 isolates) were received from the GHSR Reunion hospitals, private laboratories and from the Pasteur Institute in Paris, France.

#### Microbiological methods

*Salmonella* strains were isolated by the standard culture method in accordance with NF U47-100:2007 (French Standards Association) as previously described (45). All *Salmonella* isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme (36) and the slide agglutination test using *Salmonella* polyvalent O and H antisera in accordance with the Diagnostic Pasteur.

#### Molecular typing: RFLP/PFGE

##### DNA extraction

The following harmonized protocol was used for the study as described previously (21). After overnight growth on PCA or nutrient broth, cells were harvested by centrifugation and re-suspended in suspension buffer. The final cell density for plug preparation was 1.3-1.6 at 600nm. Proteinase K was added to the cell suspension followed by mixing lysis of cell suspension 1:1 with SeaKem Gold Agarose. The resultant plugs were washed at least twice in distilled water and four times in TE buffer.

##### Enzymatic digestion

The genetic typing was carried out using the RFLP-PFGE PulseNet protocol (40) and total DNA was digested with one restriction enzyme *Xba*I (Roche Applied Science). The obtained fragments were separated in 1% agarose (SeaKem Gold Agarose) gels using the CHEF-DR-III system (Bio-Rad Laboratories, USA).

##### Electrophoresis

Electrophoresis was carried out with 0.5X TBE buffer at 6 V/cm and 14°C. The running time was 20 hours and the pulse ramp time was 2.2–63.8 s. *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was used as a molecular weight marker.

Gels were visualized on a UV transilluminator and photographs were captured using a digital imaging system (Video gel doc system, Bio-Rad). Fragment restriction patterns were analysed by BioNumerics software (Applied Maths, Sint Marteen, Belgium), performed using UPGMA (unweighted pair-group method with an arithmetic mean) and a Dice similarity coefficient (31) with a tolerance index of 5%, a position tolerance setting of 1% and an optimization setting of 1% generating a dendrogram.

Fragments smaller than 30 kb were disregarded in accordance with the PulseNet guidelines for standardization (48).

#### Discrimination power

Discrimination power was calculated by determining the Simpson discrimination indices (D) as per Hunter (19). These values represent the probability that two distinct isolates will be ranged into different typing groups.

#### Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was tested by the disk diffusion method following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

The isolates were tested for their susceptibility to ampicilin (A; 10 µg), amoxicillin–clavulanic acid (AMC; 20/10 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), cephalothin (CF; 30 µg), ceftazidime (CAZ; 30 µg), cotrimoxazole (SXT; 1.25/23.75 µg µg), sulfonamides – NCCLS (Su; 300 µg), gentamicin (Gm; 10 µg), streptomycin (S; 10 µg), kanamycine (K; 30 µg), tetracycline (T; 30 µg), colistine (Cs; 10 µg), nalidixic acid (Na; 30 µg), ofloxacin (Ofx; 5 µg) and enrofloxacin (Enr; 5 µg). *Escherichia coli* (ATCC25922) was used as control strain.

## Results

#### PFGE and genetic diversity

The genotyping of 157 isolates of *Salmonella* Typhimurium and 19 isolates of *S.* 1,4,[5],12:i:- was carried out by PFGE using *Xba*1 as macrorestriction enzyme. Digestion of DNA revealed 30 profiles (B49 to B78) (Fig. 2). The discriminatory ability (D value) of the method was 0.86 for the entire panel. Analysis by BioNumerics software showed an overall similarity of 75% with stable patterns consisting of 14-18 fragments.

The genetic relatedness of the PFGE profiles for *Salmonella* Typhimurium and *S.* 1,4,[5],12:i:- showed 5 clusters (Fig. 1) but *S.* 1,4,[5],12:i:- was only found in clusters 4 and 5: the first cluster (17.3% of the isolates) consisted of 6 profiles (B49, B50, B51, B52, B53 and B59): 12 isolates from chicken, 4 from the slaughterhouse (2 from scalding water, 1 from the defeathering stage and 1 from transport crates), 8 from other animals (2 turkeys, 6 ducks), 5 from humans and 2 from sausages. The second cluster (35.7%) consisted of 5 profiles (B54, B55, B56, B57 and B58) from 24 chicken isolates, 11 from broiler farms and slaughterhouses (outdoor area, changing rooms, walls and equipment, transport crates, scalding water, evisceration and cutting table); 14 from other animals (rodent, turkey, wild bird and duck isolates) and 15 from humans; the third cluster (12.8% of the isolates) comprised 3 profiles (B62, B63 and B64): 11 from chickens, 5 from farm and abattoir environment (changing rooms, transport crates, defeathering and evisceration stages), 4 from other animals (pigs, turkeys and guinea fowl)

and 3 from humans; the fourth cluster (7.8% of the isolates) comprised 4 profiles (B69, B70, B71 and B72): 1 from chicken, 3 from farm and abattoir environment (outdoor area and cutting table), 3 from other animals (pigs and turkey) and 2 from humans for *S. Typhimurium*; for *S. 1,4,[5],12:i:-*, the fourth cluster comprised 1 isolate from chicken, 1 human and 3 isolates from the slaughterhouse environment (defeathering stage and trussing table). Finally, the fifth cluster (10.6% of the isolates) comprised 2 profiles (B73 and B74): 2 isolates from chickens, 4 from the slaughterhouse environment (defeathering and evisceration stages, trussing and cutting tables) and 1 from sausages for *S. Typhimurium*; 6 chicken isolates and 6 isolates from the abattoir environment (transport crates, defeathering stage, cutting and trussing tables) were found for *S. 1,4,[5],12:i:-*.

#### Antibiotic resistance patterns

*Salmonella Typhimurium*. Among a total of 157 *Salmonella Typhimurium* isolates, 9 (5.5%) were resistant to A, 28 (17.4%) to S, 32 (19.9%) to Su, 4 (2.5%) to SXT and 37 (22.3%) to T. The same results were observed for isolates from the environment or humans (Table 2). Only 1 isolate from other animals exhibited a resistance against Na.

*Salmonella 1,4,[5],12:i:-*. Out of 19 isolates, 19 (100%) were resistant to A, S, Su and T.

#### Antibiotic resistance associated with PFGE pattern

The main resistance pattern associated with most of the pulsotypes (B50, B69, B70, B71, B73, B74, B75 and B76) is A,S,Su,T. We also found two other resistance patterns: A,Su,SXT,T (B62 and B63) and S,Su,T (B54 and B55). Three isolates from pig and human origin yielded the typical DT104 multidrug resistant pattern A,C,S,Su,T (Table 3).

## Discussion

In Reunion Island, *S. Typhimurium* is the most prominent serovar in broiler chickens, just as in other parts of the world (2, 53, 58). It appeared that *S. Typhimurium* was able to infect many hosts, including monogastric species, poultry (chicken, duck, turkey, guinea fowl, geese) and pigs, but also small mammals such as rodents (9, 29). The atypical *Salmonella enterica* I 4,[5],12:i:- emerged a few years ago in Reunion Island and because of the close genetic relationship, it is certainly a monophasic isolate of *S. Typhimurium* (46). Many studies have already explained the relationships between serovars *S.1,4,[5],12:i:-* and *Typhimurium* through the presence of IS200 by DNA microarray (4, 16).

We opted for the method of choice for typing *Salmonella*; pulsed field gel electrophoresis (PFGE) remains the gold standard for *Salmonella* genotyping. Its discriminatory power is good and this method has proved to be highly useful in outbreak situations and has been widely used for *Salmonella* fingerprinting (41, 51, 59). Use of PFGE with endonuclease *Xba*1 has been recognized as a precise means for fingerprinting *Salmonella* serovars (24), particularly for *S. Typhimurium* (12).

The strong similarity found between isolates from broiler chickens, humans and the environment indicated a close genetic relationship between avian serovars Typhimurium and I 4, 12:i:- compared to that of isolates from other sources. Previous studies on clonal relationships of *S. Typhimurium* from humans and various other sources showed that isolates of this serovar were clustered into a group with similarity of more than 70%. This observation was in agreement with our findings (75.1% similarity). In spite of their close genetic relationship, it was possible to divide the majority of the isolates into five clusters. The first two and the last two clusters were closely related; this suggested, at least, the introduction of two or three different clones that could have been brought in via imports of foodstuffs, parent stocks, hatching eggs or one-day-old chicks from France or from south-east Asia (1, 57) in the 1980s.

The main pulsotype (B54) accounted for 29% of all the isolates; it comprised isolates from many sources such as poultry houses, the slaughterhouse, other animal species (ducks, turkeys, pigs or rodents) and humans, suggesting that this pulsotype had already colonized every step of the food chain (38). This pulsotype also showed a close genetic relationship between the isolates from broilers and those from rodents. As demonstrated by Meerburg and Kijlstra (29), rodents are often implicated in the infection of poultry. Indeed, rodents have been recognized as a vehicle for *Salmonella* (22, 28). In Reunion Island, rodents are a real problem because most of the territory is covered with sugarcane fields, which provide a natural habitat for rodents, and are usually very close to poultry farms (35, 47).

The same pulsotypes of *Salmonella* have been recovered from different animal species; in a tropical island like Reunion where all farms (pig and poultry) are concentrated in a small area, exchange of organic material and pathogens between these farms via trucks, employees and technical staff is always possible. Moreover, many farmers rear pigs and broilers at the same time on the same site (7). A cycle of transmission between these different species could have been instigated and this could explain the close genetic relationship between these *Salmonella* isolates (39).

Most of the chicken isolates (2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> clusters) had the same genotype pattern as the environmental isolates from the outdoor areas of poultry farms; this suggested *Salmonella* Typhimurium isolates could persist in the environment even after cleaning and disinfection (25). This persistence could be explained by failures in decontamination procedures (8); as an example, poultry manure is often kept outside, with or without protection, to be used as fertilizer for nearby market gardening. But these isolates could also be re-introduced into the poultry farm via different routes, such as rodents, or even rainwater; Chao et al. (10) had already demonstrated that *Salmonella* could be disseminated in the soil as a result of substantial rainfall, frequent in tropical climates such as that of Reunion Island.

The same pulsotypes were found in chickens, poultry houses and the slaughterhouse, confirming that the slaughterhouse had been contaminated by infected chickens (6, 37).

The same *S. Typhimurium* PFGE patterns (B54, B62, B64 and B69) observed for poultry and human isolates underlined a possible contamination of humans by chicken as previously described by

Nogrady et al. (32). The presence of *S. Typhimurium* in broiler chickens is of considerable importance from the standpoint of public health (42) and particularly in Reunion Island where it is the most frequent serovar incriminated in food poisoning (14). Most of these isolates exhibited the same genetic pattern but showed differences in susceptibility to antibiotic drugs. This variability could be explained by genetic changes; mutation or horizontal transfer, linked for example to the selective pressure of drugs at the farm (52).

Multidrug resistance was generally observed in *Salmonella Typhimurium* (3) but in this study, only three isolates - one from human and two from pigs - exhibited the specific profile ACSSuT. This profile matched the phage type DT104 but it was not the prominent profile in our study. *Salmonella Typhimurium* DT104 has spread in various countries (17, 33, 54) and it could also be present in Reunion Island. Nevertheless, this resistance profile was not found in chicken isolates; this could be explained by different practices in the poultry and pig industries.

Most *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- isolates were susceptible to all the tested antibiotic drugs in contrast to results observed in mainland France (14). But they also showed resistance to ampicillin, streptomycin, sulfonamides and tetracycline as previously identified (55, 60). These antibiotic drugs have been the most commonly used antibiotic drugs in animal production in Reunion Island and this explained the frequent occurrence of resistance to these antimicrobial agents (11, 50); only one *S. Typhimurium* isolate was resistant to nalidixic acid whereas this resistance has been observed frequently in the USA (43), in Japan (20) and in South-East Asia (18).

Analyses using serotyping and more specifically macrorestriction profiling by PFGE with Xba1 showed that no clonal relationship existed between PFGE and antibiotic resistance profiles. The antimicrobial resistance characteristics could have been acquired by selective pressure of drugs or by horizontal transfer (23). It is therefore necessary to investigate veterinary practices to understand the differences between the pig and poultry industries.

This study strongly indicates a close genetic relationship between *S. Typhimurium* and *S.1,4,[5],12:i:-* isolates from humans and broiler chickens. But poultry meat is not the only source of human *Salmonella* infections however, since the same profiles have been recovered from other animals. And even if the resistance of *Salmonella* to antibiotic drugs remains low, it also highlights the need for continuous surveillance to monitor antimicrobial resistance in bacteria associated with animals and humans.

### **Acknowledgments**

The Authors wish to thank the staff of Avi Pole Reunion for their collaboration in collecting samples from poultry farms: Jef Reichardt, Jacky Berby, Jimmy Hoarau, François Penverne and Yvon Euzen; thanks also to the farmers.

The Authors would also like to thank the staff of the slaughterhouse for their organization of sample collection: Benjamin Boulanger, Eric Pascal and his staff, Stephanie Yeung, Pierre Reype and

Guillaume Burel. Thanks to Dr. Michault, Sandrine Picot (GHSR Reunion) and Dr Rogier for human isolates. The Authors thank all the corresponding laboratories of the French National Reference Centre for Salmonella (FNRC-Salm) network for their collaboration and "The FNRC-Salm is partially funded by the *Institut de Veille Sanitaire*".

The Authors are grateful to the staff of the AFSSA HQPAP and AFSSA CEB laboratory for their help in molecular analyses.

Table 1: Type of samples and PFGE pattern of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* S.I 4,12:i:- collected from broiler chickens, farms and the slaughterhouse, from other animals, humans and from some foodstuffs (Reunion Island, 2007-2009, 176 isolates)

	Type of samples	Number of isolates strains (% of total isolate)	PFGE pattern (number of each isolates)	
Broiler chicken	Faeces and litter	33 (19)	B50(8);B52(4);B54(12);B59(1);B61(1);B63(1);B64(1);B70(1);B75(1);B77(3)	
	Neck skin	3 (2)	B54(3)	
	Caeca	5 (3)	B54(2);B62(1);B73(1)	
	Carcasses	19 (11)	B54(5);B62(4);B69(1);B73(6);B74(1);B77(2)	
Farm environment	Wall and equipment	2 (1)	B55(1);B67(1)	
	Changing room	3 (2)	B54(1);B62(2)	
	Surroundings	2 (1)	B58(1);B69(1)	
Environment	Transport crates	3 (2)	B50(2);B62(1);B73(1)	
	Scalding water	3 (2)	B50(2);B51(1)	
	Before defeathering	7 (4)	B60(1);B62(2);B69(1);B73(2);B77(1)	
	After defeathering	4 (2)	B50(1);B54(1);B69(1);B73(1)	
	Abattoir environment	Before trussing table	3 (2)	B73(1);B77(2)
		After trussing table	6 (3)	B54(2);B69(1);B73(2);B77(1)
	Evisceration	6 (3)	B54(4);B73(1);B77(1)	
	Cutting plan	5 (3)	B54(1);B72(2);B73(2)	
	Utensils	1 (1)	B77(1)	
	Sausages	1 (1)	B73(1)	
Other animals	pork	11 (6)	B54(4);B61(2);B64(2);B69(1);B72(1)	
	duck	10 (6)	B51(5);B52(1);B54(1);B56(3)	
	coq	4 (2)	B54(4)	
	turkey	5 (3)	B54(3);B62(1);B71(1)	
	guinea fowl	3 (2)	B49(1);B53(1);B62(1)	
	goose	1 (1)	B61(1)	
	Rodent	1 (1)	B54(1)	
Human	Human	33 (19)	B49(1);B50(1);B53(3);B54(13);B56(1);B57(1);B61(2);B62(2);B64(1);B65(1);B66(1);B68(2);B69(1);B71(2);B78(1)	

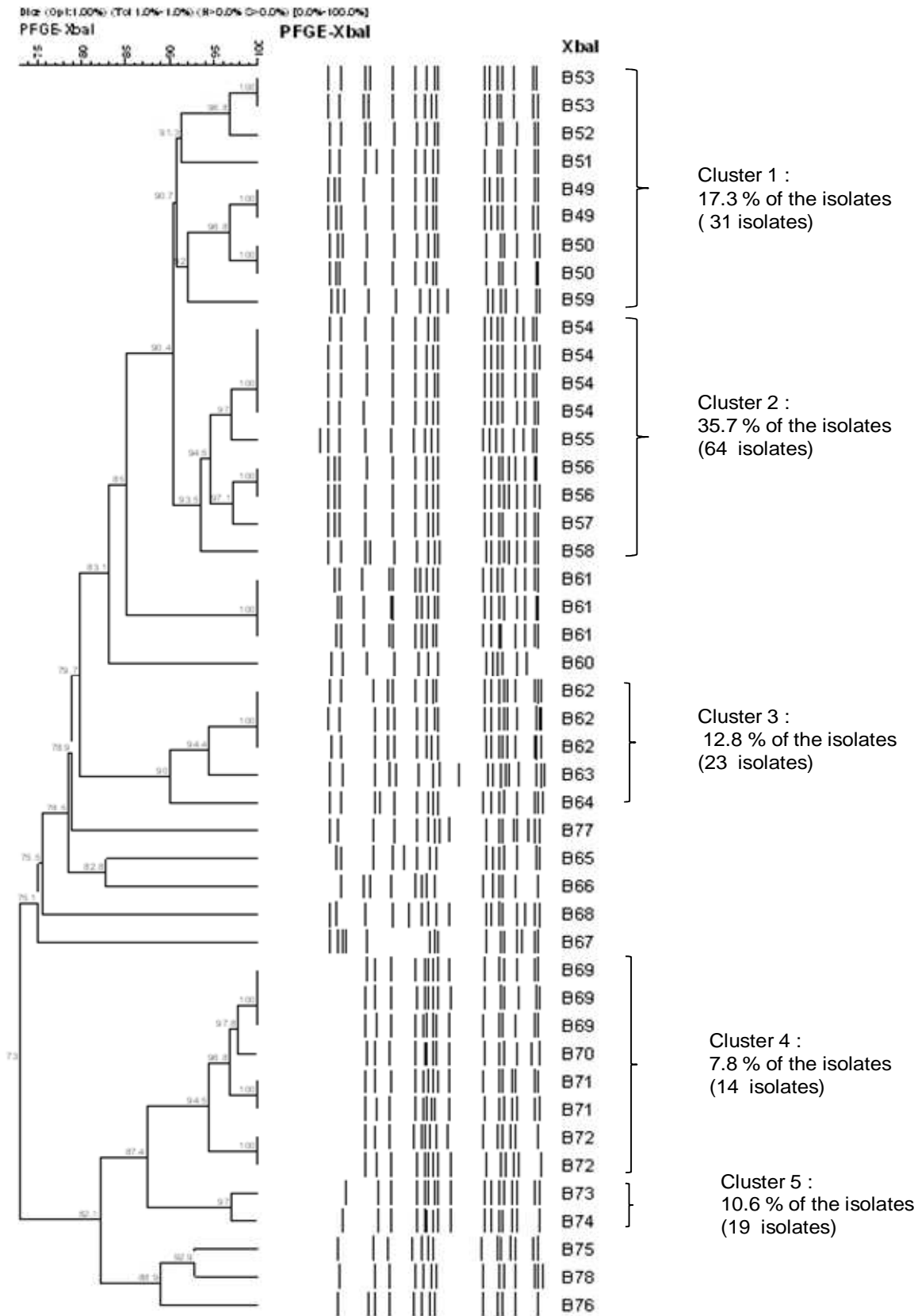
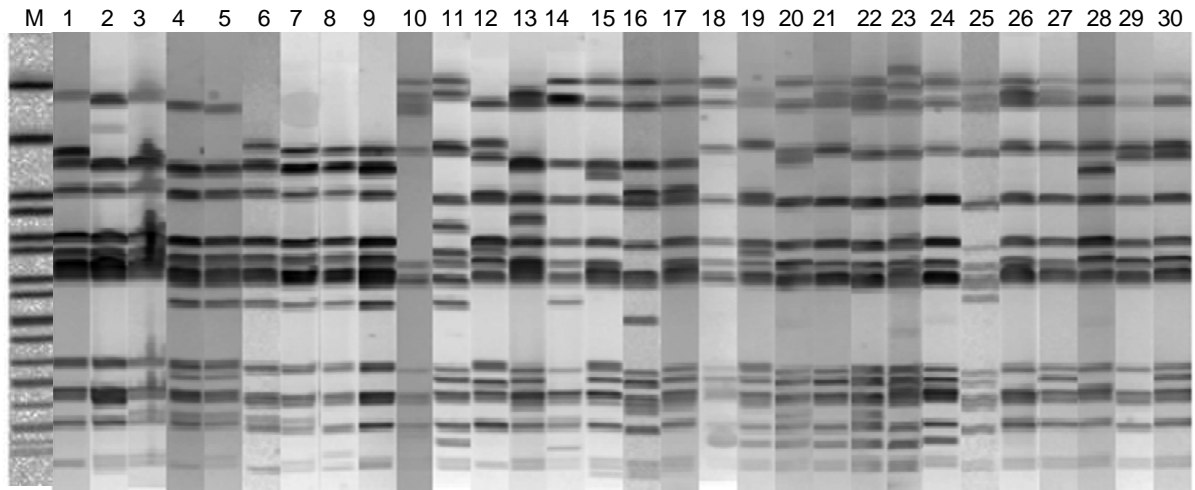


Figure1: Dendrogram showing the cluster analysis of PFGE Xba1 patterns from 157 isolates of *Salmonella* Typhimurium and 19 *Salmonella* S.I 4,12:i:- generated by BioNumerics software using the UPGMA method





**Figure2:** The PFGE Type for *XbaI* digested genome DNA of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* S.I 4,12:i:-. A total of 176 isolates were analysed; 30 *XbaI* PFGE-types were obtained: M:*Salmonella* Braenderup; lane1:B76; lane2:B78; lane3:B75; lane4:B74; lane5:B73; lane6:B72; lane7:B71; lane8:B70; lane9:B69; lane10:B67; lane11:B68; lane12:B66; lane13:B65; lane14:B77; lane15:B64; lane16:B63; lane17:B62; lane18:B60; lane19:B61; lane20:B58; lane21:B57; lane22:B56; lane23:B55; lane24:B54; lane25:B59; lane26:B50; lane27:B49; lane28:B51; lane29:B52; lane30:B53

Table 2 Antimicrobial resistance for 157 *Salmonella* Typhimurium and 19 S.1,4,[5],12:i:- isolates from chickens, the environment, other animals and humans (October 2007 – January 2009, Reunion Island).

	Origin							
	Broiler chicken		Farm and abattoir environment		Other animals		Human	
	S. Typhimurium	S.1,4,[5],12:i:-	S.Typhimurium	S.1,4,[5],12:i:-	S.Typhimurium	S.1,4,[5],12:i:-	S.Typhimurium	S.1,4,[5],12:i:-
Ampicilin (Am)	9 (5.6)	6(33.3)	7(4.3)	9(50)	6(3.7)	1(5.5)	4(2.5)	1(5.5)
Amoxicilin-clavulanic acid (AMC)								
Chloramphenicol (C)					1(0.6)		3(1.9)	
Ceftazidime (CAZ)								
Cephalotin (Cf)								
Colistine (CS)								
Enrofloxacin (ENR)								
Gentamicin (GM)								
Kanamycin (K)								
Nalidixic acid (Na)	1(0.6)		1(0.6)		1(0.6)			
Ofloxacin (OFX)								
Streptomycin (S)	28(17.4)	6(33.3)	17(10.5)	9(50)	15(9.3)	1(5.5)	16(10)	1(5.5)
Sulfonamide (Su)	32(19.9)	6(33.3)	18(11.2)	9(50)	18(11.2)	1(5.5)	18(11.2)	1(5.5)
Cotrimoxazole (SXT)	4(2.5)		1(0.6)		2(1.2)		3(1.9)	
Tetracycline (T)	37(22.3)	6(33.3)	23(14.3)	9(50)	19(11.8)	1(5.5)	19(11.8)	1(5.5)

( ): numbers in parentheses represent percentage of resistant isolates for Typhimurium and 1,4,[5],12:i:- respectively

Table 3: PFGE and antibiotic susceptibility patterns of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* S.1,4,[5],12:i:- collected from broiler chickens, from farm and abattoir environment, from other animals, and humans (Reunion Island, 2007-2009, 176 isolates)

PFGE Pattern	Number of strains		Origin									
	associated (%)	R type	Broiler Chicken		Human		Farm environment		Abattoir environment		Other animals	
			S.	S.	S.	S.	S.	S.	S.	S.	S.	S.
			1,4,[5],12:i:-	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhimurium	1,4,[5],12:i:-	Typhimurium
B49	2(1.1)					1						1
B50	13(7.4)			6		1				6		
B50	1(0.6)	A,S,Su,T		1								
B51	5(2.8)											5
B52	5(2.8)			4								1
B53	4(2.3)					3						1
B54	4(2.3)					1		1		2		
B54	1(0.6)	Na,S,Su,T		1								
B54	52(29.5)	S,Su,T		20		12				7		13
B55	2(1.1)	S,Su,T						1				1
B56	1(0.6)					1						
B56	1(0.6)	A,Su,Sxt,T										1
B56	1(0.6)	Na, T										1
B57	1(0.6)					1						
B58	1(0.6)	S,Su,T						1				
B59	1(0.6)			1								
B60	1(0.6)									1		
B61	1(0.6)					1						
B61	4(2.3)	T				1						3
B62	13(7.4)			7		1		2		2		1
B62	6(3.4)	A,Su,Sxt,T		3		1				1		1
B63	1(0.6)	A,Su,Sxt,T		1								
B64	3(1.7)	A,C,S,Su,T				1						2
B65	1(0.6)					1						
B66	1(0.6)	C,Su,Sxt,T				1						

B67	1(0.6)						1		
B68	2(1.1)					2			
B69	7(4)	A,S,Su,T	1			1	3		1
B70	1(0.6)	A,S,Su,T	1						
B71	3(1.7)	A,S,Su,T			1	1			1
B72	2(1.1)	S,Su,T						1	1
B72	1(0.6)	A,S,Su						1	
B73	18(10.2)	A,S,Su,T	6	1			6	5	
B74	1(0.6)	A,S,Su,T		1					
B75	1(0.6)	A,S,Su,T		1					
B76	1(0.6)	A,S,Su,T							1
B77	11(6.3)	T		5				6	
B78	1(0.6)					1			

---

1. **Aarestrup, F. M.** 2004. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: Principles and limitations. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **51**:380-388.
2. **Akoachere, J., N. F. Tanih, L. M. Ndip, and R. N. Ndip.** 2009. Phenotypic Characterization of *Salmonella* Typhimurium Isolates from Food-animals and Abattoir Drains in Buea, Cameroon. *Journal of Health Population and Nutrition* **27**:612-618.
3. **Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. D. Grimont, and J. M. Collard.** 2006. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* **44**:2897-2903.
4. **Burnens, A. P., J. Stanley, I. Sechter, and J. Nicolet.** 1996. Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v:-, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:1641-1645.
5. **Butaye, P., G. B. Michael, S. Schwarz, T. J. Barrett, A. Brisabois, and D. G. White.** 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection* **8**:1891-1897.
6. **Cardinale, E., J. D. P. Gros-Claude, K. Rivoal, V. Rose, F. Tall, G. C. Mead, and G. Salvat.** 2005. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology* **99**:968-977.
7. **Cardinale, E., S. Maeder, V. Porphyre, and M. Debin.** 2010. *Salmonella* in fattening pigs in Reunion Island: Herd prevalence and risk factors for infection. Elsevier.
8. **Cardinale, E., F. Tall, E. F. Gueye, M. Cisse, and G. Salvat.** 2004. Risk Factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* **In Press**.
9. **Chadfield, M. S., D. J. Brown, S. Aabo, J. P. Christensen, and J. E. Olsen.** 2003. Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. *Veterinary Microbiology* **92**:49-64.
10. **Chao, W. L., R. J. Ding, and R. S. Chen.** 1987. Survival of pathogenic bacteria in environmental microcosms. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* **20**:339-48.
11. **Chuanchuen, R., and P. Padungtod.** 2009. Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Swine in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science* **71**:1349-1355.
12. **Corbett-Feeney, G., and U. N. Riain.** 1998. The use of pulsed-field gel electrophoresis for subdivision of *Salmonella typhimurium* in an outbreak situation. *Journal of Infection* **36**:175-177.
13. **D'Aoust, J. Y.** 1989. *Salmonella*, p. 327 - 446. *In* M. P. Doyle (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker Inc., New York.

14. **D'ortenzio, E., F. Weill, S. Ragonneau, J. A. Lebon, P. Renault, and V. Pierre.** 2008. First report of a *Salmonella enterica* serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. *Euro surveillance* **13**:393-395
15. **Doran, G., D. Morris, C. O'Hare, N. DeLappe, B. Bradshaw, G. Corbett-Feeney, and M. Cormican.** 2005. Cost-effective application of pulsed-field gel electrophoresis to typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:8236-8240.
16. **Garaizar, J., S. Porwollik, A. Echeita, A. Rementeria, S. Herrera, R. M. Y. Wong, J. Frye, M. A. Usera, and M. McClelland.** 2002. DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:2074-2078.
17. **Glynn, M., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. Angulo.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* **338**:1333-1338.
18. **Hakanen, A. J., M. Lindgren, P. Huovinen, J. Jalava, A. Siitonen, and P. Kotilainen.** 2005. New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:5775-5778.
19. **Hunter, P. R.** 1990. Reproducibility and Indexes of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1903-1905.
20. **Izumiya, H., K. Mori, T. Kurazono, M. Yamaguchi, M. Higashide, N. Konishi, A. Kai, K. Morita, J. Terajima, and H. Watanabe.** 2005. Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:5074-5079.
21. **Kerouanton, A., M. Marault, R. Lailier, F. X. Weill, C. Feurer, E. Espie, and A. Brisabois.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathogens and Disease* **4**:293-303.
22. **Kim, A., Y. J. Lee, M. S. Kang, S. I. Kwag, and J. K. Cho.** 2007. Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* **8**:155-161.
23. **LeClerc, J. E., B. G. Li, W. L. Payne, and T. A. Cebula.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**:1208-1211.
24. **Liebana, E., D. Guns, L. Garcia-Migura, M. J. Woodward, F. A. Clifton-Hadley, and R. H. Davies.** 2001. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:3609-3616.
25. **Marin, C., A. Hernandez, and M. Lainez.** 2009. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science* **88**:424-431.
26. **Martinez-Urtaza, J., E. Liebana, L. Garcia-Migura, P. Perez-Pineiro, and M. Saco.** 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Applied and Environmental Microbiology* **70**:4030-4034.

27. **Medeiros, M. I., S. N. Neme, P. da\_Silva, D. M. Capuano, M. C. Errera, S. A. Fernandes, G. R. do\_Valle, and F. A. de\_Avila.** 2001. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeiro Preto-SP, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **43**:21-4.
28. **Meerburg BG, J.-R. W., Wagenaar JA, Kijlstra A.** 2006. Presence of Salmonella and Campylobacter spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* **72**:960-2.
29. **Meerburg, B. G., and A. Kijlstra.** 2007. Role of rodents in transmission of Salmonella and Campylobacter. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**:2774-2781.
30. **Nakaya, H., A. Yasuhara, K. Yoshimura, Y. Oshihoi, H. Izumiya, and H. Watanabe.** 2003. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant Salmonella enterica typhimurium with mutations in both gyrA and parC. *Emerging Infectious Diseases* **9**:255-257.
31. **Nei, M., and W. H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, p. 5269-5273, vol. 76.
32. **Nogrady, N., A. Imre, A. Kostyak, J. Paszti, and B. Nagy.** 2008. Antibiotic resistance and clonal relationship of Salmonella Infantis strains isolated from broiler chickens and humans in Hungary. *Elelmiszervizsgalati Kozlemenyek* **54**:90-100.
33. **Olsen, J. E., M. N. Skov, E. J. Threlfall, and D. J. Brown.** 1994. Clonal lines of Salmonella enterica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *Journal of Medical Microbiology* **40**:15-22.
34. **Parry, C. M.** 2003. Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica. *Current Opinion in Infectious Diseases* **16**:467-472.
35. **Pascal, M., O. Lorvelec, G. Borel, and A. Rosine.** 2004. Structures spécifiques des peuplements de rongeurs d'agro Ecosystèmes et d'écosystèmes "naturels" de la Guadeloupe et de la Martinique. *Rev. Ecol (terre Vie)* **59**:283-292.
36. **Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, F. W. Brenner, and L. L. Gheesling.** 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **152**:907-909.
37. **Rasschaert, G., K. Houf, C. Godard, C. Wildemauwe, M. Pastuszczak-Frak, and L. De Zutter.** 2008. Contamination of carcasses with Salmonella during poultry slaughter. *Journal of Food Protection* **71**:146-152.
38. **Rasschaert, G., K. Houf, J. Van Hende, and L. De Zutter.** 2007. Investigation of the concurrent colonization with Campylobacter and Salmonella in poultry flocks and assessment of the sampling site for status determination at slaughter. *Veterinary Microbiology* **123**:104-109.
39. **Refsum, T., E. Heir, G. Kapperud, T. Vardund, and G. Holstad.** 2002. Molecular epidemiology of Salmonella enterica serovar typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: Comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5600-5606.



40. **Ribot, E. M., M. A. Fair, R. Gautom, D. N. Cameron, S. B. Hunter, B. Swaminathan, and T. J. Barrett.** 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157 : H7 *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* **3**:59-67.
41. **Rivoal, K., J. Protais, S. Queguiner, E. Boscher, B. Chidaine, V. Rose, M. Gautier, F. Baron, N. Grosset, G. Ermel, and G. Salvat.** 2009. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* **129**:180-186.
42. **Sarwari, A. R., L. S. Madger, P. Levine, A. M. Mc Namara, S. Knowler, G. L. Armstrong, R. Etzel, J. Hollingsworth, and J. G. Morris.** 2001. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *Journal of Infectious Diseases* **183**:1295-1299.
43. **Sjölund-Karlsson, M., J. Folster, G. Pecic, K. Joyce, F. Medalla, R. Rickert, and J. Whichard.** 2009. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates from Humans in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:2142-2144
44. **Sow, A. I., M. Seydi, M. Thiaw, C. T. Ndour, C. T. Soumare, M. F. Cisse, S. Badiane, and A. Samb.** 2000. Les salmonelloses au centre hospitalier universitaire de Fann à Dakar : aspects bactériologiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* **30**:657-60.
45. **Stevens, A., Y. Kabore, J. D. Perrier-Gros-Claude, Y. Millemann, A. Brisabois, M. Catteau, J. F. Cavin, and B. Dufour.** 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology* **110**:178-186.
46. **Switt, A. I. M., Y. Soyer, L. D. Warnick, and M. Wiedmann.** 2009. Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**:407-415.
47. **Taylor, K. D.** 1972. Rodent problems in Tropical agriculture. *PANS* **18**:81-88
48. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis - Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**:2233-2239.
49. **Thong, K. L., Y. L. Goh, S. Radu, S. Noorzaleha, R. Yasin, Y. T. Koh, V. K. E. Lim, G. Rusul, and S. D. Puthuchery.** 2002. Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmollella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:2498-2503.
50. **Threlfall, E. J., C. J. Teale, R. H. Davies, L. R. Ward, J. A. Skinner, A. Graham, C. Cassar, and K. Speed.** 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal salmonellas from

- humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* **9**:183-189.
51. **Tsen, H. Y., J. S. Lin, and H. Y. Hsih.** 2002. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. *Veterinary Microbiology* **87**:73-80.
  52. **Usera, M. A., A. Aladuena, R. Gonzalez, M. De la Fuente, J. Garcia-Pena, N. Frias, and M. A. Echeita.** 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection* **65**:768-773.
  53. **Van Asselt, E. D., J. Thissen, and H. J. van der Fels-Klerx.** 2009. *Salmonella* serotype distribution in the Dutch broiler supply chain. *Poultry Science* **88**:2695-2701.
  54. **Weill, F. X., F. Guesnier, V. Guibert, M. Timinouni, M. Demartin, L. Polomack, and P. A. D. Grimont.** 2006. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* **44**:700-708.
  55. **White, D. G., S. H. Zhao, S. Simjee, D. D. Wagner, and P. F. McDermott.** 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection* **4**:405-412.
  56. **White, P. L., A. R. Baker, and W. O. James.** 1997. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* **16**:525-41.
  57. **Wong, T. L., S. MacDiarmid, and R. Cook.** 2009. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* biotype 1 in a pilot survey of imported and New Zealand pig meats. *Food Microbiology* **26**:177-182.
  58. **Xia, S. L., R. S. Hendriksen, Z. Q. Xie, L. L. Huang, J. Zhang, W. S. Guo, B. L. Xu, L. Ran, and F. M. Aarestrup.** 2009. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* Isolates from Infections in Humans in Henan Province, China. *Journal of Clinical Microbiology* **47**:401-409.
  59. **Xia, X. D., S. H. Zhao, A. Smith, J. McEvoy, J. H. Meng, and A. A. Bhagwat.** 2009. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology* **129**:93-98.
  60. **Zansky, S., B. Wallace, D. Schoonmaker-Bopp, P. Smith, F. Ramsey, J. Painter, A. Gupta, P. Kalluri, and S. Noviello.** 2002. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Newport - United States, January-April 2002 (Reprinted from *MMWR*, vol 51, pg 545-548, 2002). *Jama-Journal of the American Medical Association* **288**:951-953.

3.2.2.1. *Poster : Epidemiological diversity of Salmonella enterica serovars from different sources in Reunion Island (Indian Ocean): focus on S. Typhimurium and S.1,4,[5],12:i:-*

**Epidemiological diversity of most prominent *Salmonella enterica* serovars from chicken broiler flocks and humans in la Reunion Island (Indian Ocean): focus on *S. Typhimurium* and *S. I 4, 12: i:-***

*Isabelle Henry<sup>a</sup>, Marianne Chemaly<sup>b</sup>, Sophie Granier<sup>c</sup>, Céline Courtillon<sup>b</sup>, Françoise Lalande<sup>b</sup>, Gilles Salvat<sup>b</sup>, Eric Cardinale<sup>d</sup>*

<sup>a</sup>Cirad - Crête d'Or Entreprise, Sainte Clotilde, Reunion

<sup>b</sup>AFSSA- HQPAP – Ploufragan, France

<sup>c</sup>AFSSA-CEB, Maisons Alfort, France

<sup>d</sup>Cirad-UMR15- CRVOI, Sainte Clotilde, Reunion

## **INTRODUCTION**

The first chicken industrial farm on Reunion Island has been created 60 years ago and the slaughter house in 1990's. The poultry houses are open sided with artificial or dynamic ventilation. Various kind of poultry houses exist. The basic foodstuffs are imported from Argentina, France, and Mauritius. Parents are imported from France and day-old-chicks are produced locally with a marketing of 8.5 million per year. Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and is an economic problem particularly because Reunion Island population eats a lot of chicken (more than 40 kg per person and per year) and cooks 100% chicken sausages. This study aims to investigate the diversity of *Salmonella enterica* Typhimurium and *S.1,4,[5],12:i:-* in 40 human strains, in 125 chicken strains and 162 strains isolated from farms and slaughterhouse's environment by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility phenotype in

order to determine potential infectious sources.

## **METHODS AND MATERIALS**

Between October 2007 and January 2009, a total of 161 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and 18 *Salmonella* I 4,12:i:- strains were isolated from broiler farms, environment, slaughterhouse, other animals (pigs, ducks, turkeys, and rodents) and humans. On broiler farms, samples were collected from 60 flocks at the end of the rearing period (faeces, litter, changing room, wall and equipment, outdoors). At slaughterhouse, samples were collected all along the «process» for 71 flocks, from the transport crates, before defeathering, after defeathering, before clamping plan, after clamping plan, at the evisceration steps, from scalding water, from caeca, neck skin and carcasses; at the cutting plan on utensils and working plan, and from sausages. Samples from pigs were collected from previous

course and samples from poultry other than chicken were collected from the local veterinary laboratory. For humans, isolates were collected from hospital (GHSR Reunion), private laboratories and from Pasteur Institute (Paris, France). The following harmonized protocol for PFGE was used for the study as described previously (1). Antimicrobial susceptibility was tested by the disk diffusion method following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008)

## **RESULTS**

The genotyping of 161 isolates of *Salmonella* Typhimurium and 18 isolates of *S.* 1,4,[5],12:i:- was carried out by PFGE using *Xba*1 as macrorestriction enzyme. Digestion of DNA demonstrated 30 profiles. The analysis by Bionumerics software showed an overall similarity of 75% with stable patterns consisting of 14-18 fragments. The observed similarities (Dice coefficient and UPGMA method) were considerable for 10 patterns with more than 90% similarity. In contrast, 10 *Xba*1 patterns showed less than 80% of similarity (75.1%). The genetic relatedness of the PFGE profiles for *Salmonella* Typhimurium and *S.* 1,4,[5],12:i:-, demonstrated by the dendrogram, showed 5 clusters but *S.* 1,4,[5],12:i:- was only found in clusters 4 and 5. Among a total of 161 isolates of *Salmonella* Typhimurium, 9 (5.5%) were resistant to ampicillin (A), 28

(17.4%) to streptomycin (S), 32(19.9%) to sulfonamides (Su), 4(2.5%) to cotrimoxazole (Sxt) and 37(22.3%) to tetracycline (Te). Out of 18 isolates of *S.* 1,4,[5],12:i:-, 1 (5%) was resistant to A, S, Su and T and 100% of isolates were susceptible to A, chloramphenicol, ceftazidime, colistine, cefotaxime, enrofloxacin, gentamicin, kanamycin, ofloxacin and SXT. The same pattern of resistance was observed for S, Su and Te, both for *Salmonella* Typhimurium and *S.* 1,4,[5],12:i:-. The main resistance pattern associated with most of the pulsotypes is A,S,Su,T. We also found two other resistance patterns: A,Su,SXT,T and S,Su,T. Three isolates from pig and human origin yielded the typical multidrug resistant pattern ACSSuT.

## **DISCUSSION**

*S.* Typhimurium is able to infect many hosts, including monogastric species, poultry (chicken, duck, turkey, guinea fowl, goose) and pigs, but also small mammals as rodents (2). We opted for the method of choice for typing *Salmonella*. Use of PFGE with endonuclease *Xba*1 has been recognized as a sensitive means for fingerprinting *Salmonella* serovars (3) and particularly for *S.* Typhimurium.

In our study, different PFGE patterns have been established for Typhimurium and 1,4,[5],12:i:- serovars from chicken and many other sources within a window of

75.1% of similarity. In spite of this close relationship, it was possible to divide the isolates into five clusters with 2 main ones. These clusters showed around 90% of similarity. This high level of similarity suggested, at least, the introduction of two different clones that could have come from importation of feedstuff, parents stocks, hatching eggs or one-day old chicks from France or from South East Asia. The main pulsotype counted for 33% of all isolates; it shared isolates from many sources as poultry house, slaughterhouse, other animal species (poultry, pigs, rodents), environment and humans suggesting that this pulsotype had already colonized all steps of the food chain. The same pulsotypes of *Salmonella* had been recovered from different animal species; we are in a tropical island where all the farms (pigs, poultry farms...) are concentrated on a small surface and exchanges of organic material and pathogens are always possible between all these farms. In Reunion Island this atypical S.1,4,[5],12:i:- emerged few years ago and it is certainly a monophasic isolate of *S. Typhimurium*. Multidrug resistance was generally observed in *Salmonella Typhimurium* (4) but in this study, only three isolates, one from human and two from pigs presented the specific profile ACSSuT. This profile matched with phage type DT104 one but, it was not the dominant profile in our study. Most of the isolates from Reunion Island showed

resistance to A, S, Su and Te as shown previously demonstrated. Analyses using serotyping and more specifically macrorestriction profiling by PFGE with Xba1 showed that no clonal relationship existed between PFGE and antibiotic resistance profiles. Furthermore, diversity but proximity of *S. Typhimurium* and S.I. 4, 5, 12: i - was observed suggesting importation of this serovar into Reunion Island. So *Salmonella Typhimurium* and S.I. 4, 5, 12: i - colonized Reunion Island and widespread in many hosts and vehicles. Thus, many sources of infection of *S. Typhimurium* exist and it is not always possible to determine specific ways of transmission.

## **REFERENCES**

- (1) Kerouanton, A., Marault, M., Lailier, R., Weill, F.X., Feurer, C., Espie, E. and Brisabois, A. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 293-303.
- (2) Meerburg BG, J.-R.W., Wagenaar JA, Kijlstra A. (2006a) Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* 72, 960-962
- (3) Liebana, E., Guns, D., Garcia-Migura, L., Woodward, M.J., Clifton-Hadley, F.A. and Davies, R.H. (2001) Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in

England: Assessment of methodology. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3609-3616.

(4) Bertrand, S., Weill, F.X., Cloeckert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Dierick, K., Wildemaue, C., Godard, C., Butaye, P., Imberechts, H., Grimont, P.A.D. and Collard, J.M. (2006) Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 2897-2903.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

Thanks to AFSSA of Ploufragan and Maison- Alfort, thanks to Avi pole Réunion, Crête D'Or Entreprise, Pasteur Institute and private laboratories and hospital.

3.2.2.2. *Conference: Epidemiological investigation of Salmonella enterica subsp. enterica all along the food chain poultry production in tropical area: example of Reunion Island*



# **Epidemiological investigation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* all along the food chain poultry production in tropical area: example of Reunion Island**

**Isabelle Henry**\*<sup>1,5</sup> Jef Reichardt<sup>2</sup> Sophie Granier<sup>3</sup> Gilles Salvat<sup>4</sup> Eric Cardinale\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cirad-Bios, CRVOI, Saint Denis, Reunion Island

<sup>2</sup>Avi-pôle Réunion, Saint Louis, Reunion Island

<sup>3</sup>AFSSA, Maisons-Alfort, France

<sup>4</sup>AFSSA, Ploufragan, France

<sup>5</sup>Crête d'Or Entreprise, Etang Salé, Reunion Island

\*Corresponding author

**Keywords:** *Salmonella*, Poultry, Food Chain

## **Introduction**

Reunion Island is a French island in the south-west Indian Ocean, between Madagascar (700 km) and Mauritius (300 km). Reunion Island has a tropical climate, and possesses immense biological diversity. It is also a European territory with modern infrastructures and services for professional activities.

Pig and poultry production is one of the main activities in Reunion Island as in European countries where the main animal product is pork (48.7%) followed by poultry (23.6%). So, meat and poultry products have to be shielded from contamination to avoid public health risks to consumers and financial problems for Reunion's poultry companies. The first industrial chicken farm on Reunion Island

was constructed 60 years ago and the main slaughter house was built in the 1990s.

Reunion's poultry meat industry produced around 10 tons in 2009, which represented an average of 5 800 000 birds with a typical weight per chicken of 1.762kg. Broilers were slaughtered at around 45 days old. The industry aims to increase production by 3% per year. To attain this objective, the whole poultry production industry has improved its efficiency in procedures and costs. At the present time, chicken meat production is locally consumed (66% local production and 33% imported frozen from France). Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and an economic problem particularly because the Reunion island population consumes a lot of chicken (more than 35 kg per person per year) and also eats 100% chicken sausages.

In Reunion Island, except some bacteriological controls carried out in farms, no epidemiological study has yet been undertaken. Nevertheless, poultry producers consider *Salmonella* to be a major problem for broiler production. This study aims (i) to define *Salmonella* prevalence on broiler flocks at the farm and at the slaughterhouse, (ii) to identify risk factors of broiler infection, (iii) to identify any cross contamination from the farm to the slaughterhouse.

## **Materials and Methods**

### *Sample collection*

The study was carried out from May 2007 to February 2009 and involved 60 broiler farms randomly selected among those affiliated with Production Company in Reunion Island. The location and the day of placing chicks were given by the poultry company.

### *Data collection*

A total of around 1,800 samples were collected. Each chicken farm was visited three times. The first visit was made before slaughtering at 43 days old to define the previous flock's *Salmonella* status. The second visit was made just 48 hours before the settle of chicks to assess the efficiency of cleaning and disinfection procedures. The third visit occurred at the end of the

rearing period of the study flock between day 43 and day 45 before slaughtering. On broiler farms, samples were collected from 60 flocks at the end of the rearing period (faeces, litter, changing room, wall and equipment, outdoors). Data were collected from a questionnaire administered to each farmer concerning poultry house characteristics, practices and treatment on day-old chicks, management of dead birds, control of rodents and other domestic animals, watering practices, farm staff, cleaning and disinfection. This questionnaire was always submitted by the same person and it was pre-tested in a preliminary study. The final questionnaire was closed-ended questions. At slaughterhouse, samples were collected all along the «process», from the transport crates, before defeathering, after defeathering, before clamping plan, after clamping plan, at the evisceration steps, from scalding water, from caeca, neck skin and carcasses; at the cutting plan on utensils and working plan, and from sausages. Samples from pigs, from poultry and other chicken were also collected from previous course. For humans, isolates were collected from hospital (GHSR Reunion), private laboratories and from Pasteur Institute (Paris, France).

### *Statistical analysis*

The flock was the unit of observation. A flock was infected by *S. enterica* subsp. *enterica* if at least one pooled sample taken from the poultry house collected at the end of the rearing period tested positive. Thus, the outcome variable was dichotomous (infected versus non-infected). All variables were categorical with a number of categories per variable limited. All frequencies of categories were > 10%. To assess the relationship between explanatory variables and *Salmonella* status of the flock, two stage procedures were used. Factors associated (Pearson  $\chi^2$  test,  $P < 0.25$ ) with *Salmonella* infection of the flock were input a full model on R software for multivariable analysis. The second step included a logistic multiple regression model (1). Contribution of each factor to the model was tested with a likelihood-ratio  $\chi^2$  through a stepwise procedure.

*Pulsed field gel electrophoresis (PFGE), Multiple loci variable number tandem repeats and antimicrobial susceptibility*

The following harmonized protocol for PFGE was used for the study as described by Kerouanton (2). The method of MLVA was according to Lindstedt (3). Antimicrobial susceptibility was tested by the disk diffusion method following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008)

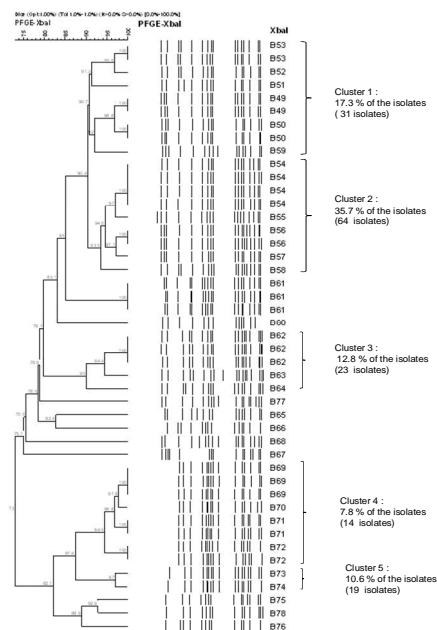
## **Results**

In our study, 22% of chicken broiler flocks were infected by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* at the end of the rearing period. The main serovar identified was *S. Virchow* (38%), then *S. Blockley* and *S. Livingstone* (15%) and *S. Typhimurium*, *S. Hadar* and *S. Senftenberg* (8%). At the slaughterhouse, 68% of batches were positive to *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. The main risk factors identified at the end of the rearing period are described in table 1.

The genotyping of isolates showed a similarity with stable patterns. For example, for *S. Typhimurium*, the observed similarities were considerable for 10 patterns with more than 90% similarity between isolates from chicken, poultry, environment and humans (figure 1). The main resistances were observed for ampicillin, streptomycin, sulfonamides and tetracycline. The main resistance pattern was A, S, Su, T, A,Su,SXT, T and S,Su, T.

Table 1 Risk factors identified at the end of the rearing period

Variables	Logistic regression model	
	OR	90% CI
Proximity of production to sugar cane	7.92	1.1, 90.05
<i>Salmonella</i> status of previous flock	6.89	1.3, 36.45
Age of poultry house (more than 15 Years)	5.36	1.2, 29.52
Use of antibiotics at Day1	4.9	1.1, 30.95
Thorough Cleaning and disinfection of poultry house and surroundings	0,05	0.001, 0.79



**Figure 1** Dendrogram showing the cluster analysis of PFGE XbaI patterns of *Salmonella* Typhimurium generated by bionumerics software using the UPGMA method

## Discussion

In our study, 22% of the broiler flocks were infected with *Salmonella*. This result is in conforms to 23.7% prevalence generally observed in European Union. Most of risk factors identified in this study have been reported in the literature (4) but some are specific and related to conditions in Reunion Island.

The original risk factor identified was the presence of sugar cane and plant fields next to poultry houses. Rodents are a legitimate problem because most of the territory is covered with sugarcane fields, natural

habitats of rodents that can be very close to poultry farms. Rodents have been recognized as a vehicle of *Salmonella* and are often implicated in the infection of poultry (5). The age of the poultry house (> 15 years old, often built with tobaccoist drier) was often correlated with presence of porous walls that could contribute to the persistence of *Salmonella* because these walls are difficult to clean and because crevices could constitute recesses full of faeces contributing to development of bacteria. The administration of antibiotic drugs to one day-old chicks often used as prophylactic drugs against stress and mortality during the first day of life might reduce the number of colonized and shed bacteria (6).

The common PFGE pattern (B54, B62, B64 and B69) observed with *S. Typhimurium* for poultry and human isolates underlines a possible contamination of humans with chicken as previously described by Nogrady et al. (7). The MLVA retained the high co-clustering with PFGE typing.

Furthermore, strong similarity was observed between isolates among clusters from chicken, environment, pig and human isolates. Homology found from humans, chicken and pigs' isolates highlighted a possible human contamination by infected chicken or pork. Cross contamination was also underlined at the slaughterhouse and

positive flocks detected at the farms have been recovered at the slaughterhouse. Analyses using serotyping and more specifically macrorestriction profiling by PFGE with Xba1 showed that no clonal relationship existed between PFGE and antibiotic resistance profiles. The antimicrobial resistance characteristics could have been acquired by selective pressure of drugs or by horizontal transfer. So it is necessary to investigate pig production to understand differences of veterinary practices with poultry industry. Furthermore, diversity but proximity of *S. Typhimurium* and S.I. 4,5,12:i:- was observed suggesting importation of this serovar into Reunion Island. So *Salmonella* Typhimurium and S.I. 4,5,12:i:- colonized Reunion Island and widespread in many hosts and vectors. Thus, many sources of infection of *S. Typhimurium* exist and it is not always possible to determine specific ways of transmission.

Most of *Salmonella* isolates were susceptible to all the tested antibiotic drugs by contrast with results observed in continental France. Most of the isolates from Reunion Island showed resistance to ampicillin, streptomycin, sulfonamides and tetracycline as shown previously demonstrated (8). These antibiotics have been the most commonly used antibiotics for animal production which explained the

frequent occurrence of resistance for these antimicrobial agents (9).

The results of this study indicate that poultry is a potential vector for *Salmonella* in Reunion Island.

### **Acknowledgment**

We acknowledge the staff of Avi-pole Reunion for collaboration; thanks to farmers.

We acknowledge the staff of slaughterhouse for organization of samples collection. Thanks to François Xavier Weill (Pasteur Institute), Dr. Michault, Sandrine Picot (GHSR Reunion) for collect of human isolates.

We are grateful to the staff of the AFSSA HQPAP and AFSSA CEB laboratory to let me use their technical material and to Cirad, thanks to Frederic Chiroleu.

### **References**

- (1) Hosmer and Lemeshow .2000. Applied logistic regression 373p.
- (2) Kerouanton et al., 2007. Foodborne pathogens and disease. 4: 293-303.
- (3) Lindstedt et al., 2004. J. Microbiol. Met. 59:163-172.
- (4) Rose et al., 1999. Prev. Vet. Med. 39:265.
- (5) Meerburg et al., 2006. Appl Environ Microbiol. 72: 960-962.
- (6) Chriel et al., 1999. Prev. Vet. Med. 40:1
- (7) Nogrady et al., 2008. Elelmiszervizsgalati kozlemenyek. 54: 90-100.
- (8) White et al., 2002. Microb. and infect. 4: 405:412.
- (9) Chuanchuen and Padungtod., 2009. J. Vet. Med. Sci. 71: 1349

### 3.2.3. Discussion de la troisième partie

La plupart des études souligne que la viande de volailles est la cause de nombreuses TIA avec pour agents identifiés principaux : *Salmonella* et *Campylobacter* (Mataragas et al., 2008; Suzuki and Yamamoto, 2009; Thorns, 2000; Toyofuku, 2008). Deux types de dangers peuvent avoir un impact sur l'homme : les dangers directs c'est-à-dire les symptômes occasionnés directement par l'ingestion de *Salmonella* et indirects c'est-à-dire l'effet à plus long terme de l'échange de matériels génétiques entre les souches « animales » et « humaines » et l'accroissement des phénomènes de résistance aux antibiotiques.

Malgré une forte présomption de sous déclarations des cas de TIA à la Réunion et notamment en milieu familial, l'impact, chez les consommateurs, n'est pas négligeable, preuve en est les échos médiatiques récurrents dans les quotidiens de l'île. Il serait donc intéressant de vérifier l'impact réel et la part véritable de *Salmonella* dans l'ensemble des TIA, notamment en prenant en compte la structuration de la population réunionnaise ; en effet, il est reconnu que les « zoreils » (métropolitains) se rendent plus facilement au laboratoire pour y effectuer des analyses que les créoles, les mahorais ou les malgaches, n'y allant que dans les cas graves.

Dans cette partie de l'étude nous avons gardé la PFGE comme méthode de différenciation de *Salmonella*, bien qu'il soit intéressant de comparer par la suite, nos résultats avec d'autres techniques comme la MLVA, ou un couplage des VNTR avec de l'HRM. Mais la PFGE est toujours considérée comme la technique de référence pour discriminer les souches au sein d'un même sérovar. Dans un premier temps nous avons trouvé utile de faire l'analyse sur les sérotypes majeurs puis dans un second temps de faire un focus particulier sur *S. Typhimurium* et S.I, 4, [5] ,12 : i :-.

La PFGE, avec l'utilisation de *XbaI* comme enzyme de restriction, est reconnue comme technique discriminante pour de nombreux serovars (Fedorka-Cray et al., 1999; Hakanen et al., 2005; Liebana et al., 2002; Sow et al., 2000; Valdezate et al., 2000). Cependant la PFGE, bien qu'étant la méthode « Gold Standard » pour *Salmonella*, est une méthode coûteuse, dont les résultats ne peuvent pas être comparés entre les différents laboratoires d'où l'intérêt d'avoir recours à d'autres techniques.

*S. Blockley*, un de nos sérovars majeurs identifiés, appartient essentiellement à un cluster qui, à lui seul, comprend 94% des souches et dont le fort pourcentage de similarité souligne le fait que les souches proviennent d'un seul clone. Cependant, il aurait été intéressant, pour ce sérotype, de faire les analyses de PFGE avec une deuxième enzyme de restriction afin de voir si l'on avait une meilleure discrimination. Cette constatation nous fait penser qu'il est possible que ce soit un sérotype nouvellement installé à la Réunion et qu'il a pu être importé de pays asiatiques comme la Thaïlande, où ce sérovar a été fréquemment isolé chez la volaille mais également dans l'environnement (Sasipreeyajan et al., 1996). En revanche, la proximité génétique entre les souches ne nous permet pas de dire dans quel sens se produit la contamination entre les différentes sources. Son installation récente sur l'île peut être également confirmée par le fait que la totalité des souches soit sensibles aux 16 antibiotiques que nous avons testés. En effet, l'utilisation des antibiotiques est sous contrôle depuis 2006 ce qui fait qu'il n'y a plus ou « presque plus » de pression de sélection dans les élevages. Ce sérotype a été retrouvé à partir d'isolats de poulets, d'isolats d'environnement de fermes et d'abattoir mais également chez l'homme, cependant la majorité des souches proviennent d'environnement d'abattoirs dans lequel ce sérotype semble s'être installé et persister. Le fait qu'il ait été également retrouvé chez l'homme souligne une éventuelle infection par l'ingestion de poulets contaminés.

*S. Virchow* a également été retrouvé tout au long de la chaîne de la production avicole, et la similarité génétique intra sérovar est également importante (87%). Sa dissémination peut s'expliquer par une multiplicité de sources différentes dont une contamination via le couvoir, mais également via les oiseaux sauvages. Il n'est pas rare de voir survoler à proximité des exploitations des oiseaux migrateurs mais également de nombreuses espèces d'oiseaux marins pour la plupart endémiques de la Réunion, dont les puffins de Baillons dans lesquels nous avons identifié *S. Virchow*. Peu de prélèvements ont pu être collectés sur ces espèces mais il serait intéressant de voir si d'autres espèces d'oiseaux tels que les Pailles en Queue, les Martins Tristes, les Cardinals ou les Zosterops ne seraient pas également des porteurs de *Salmonella*. En effet, certaines espèces d'oiseaux présentes ont également pu être introduites portant avec elles de nouveaux sérovirs de *Salmonella*. La piste d'investigation sur la « faune sauvage » serait donc intéressante à approfondir.



Les antibiotiques sont largement utilisés dans le monde. Du fait de leur utilisation intempestive, la pression de sélection qui en résulte est la principale cause de l'augmentation des résistances bactériennes. En médecine vétérinaire, les antibiotiques sont administrés à des fins prophylactiques ou thérapeutiques. Les données sur les quantités d'antibiotiques administrés à la Réunion ne sont pas disponibles mais en France, en 2008 le tonnage d'antibiotiques vendu s'élevait à 1191 tonnes avec une diminution de 12 % par rapport à 2007.

En France, comme pour les années précédentes, quatre familles d'antibiotiques (Tétracyclines, Sulfamides, Pénicilines, Macrolides) représentent plus de 80% du tonnage d'antibiotiques vendus. Les tétracyclines représentant, à elles seules la moitié du total des ventes. Les céphalosporines et les fluoroquinolones représentent des tonnages relativement faibles.

En exprimant les données en poids vif traité, une comparaison peut être faite entre les principales filières de production (bovins, porcs et volaille). Par exemple, lorsque les ventes d'antibiotiques sont exprimées en masse de matière active (Wacti), les élevages de bovins et de volailles apparaissent comme les plus gros consommateurs de fluoroquinolones ; mais la répartition précise d'antibiotiques, par espèce est difficile à estimer car un même médicament peut être destiné à plusieurs espèces.

L'augmentation des résistances a longtemps été ignorée. Entre 1950 et 1990, de nouveaux antibiotiques ont été développés mais, aujourd'hui, l'homme se fait rattraper par les microbes. Plus la résistance est élevée et plus on prescrit de nouveaux antibiotiques favorisant l'émergence de nouvelles résistances. C'est ainsi que l'on s'inscrit dans une sorte de spirale infernale de la résistance, d'où l'extrême importance de limiter la propagation de cette résistance notamment en limitant la consommation d'antibiotiques chez les professionnels médicaux et vétérinaires, les éleveurs, les agriculteurs...D'autant que de nouveaux antibiotiques ne sont pas prêts d'apparaître sur le marché !

La surconsommation d'antibiotiques en Europe et dans le Monde, utilisés à but thérapeutique mais également utilisés parfois comme facteurs de croissance dans les élevages sont responsables de cette résistance actuellement constatée.

Dans les élevages, les antibiotiques ont tout d'abord un rôle de médicament vétérinaire. Par ailleurs, certains antibiotiques ont été également utilisés comme additifs alimentaires zootechniques.

Mais l'utilisation d'antibiotiques dans l'élevage n'est pas une garantie de qualité. Au contraire, ils sont souvent utilisés pour pallier à une hygiène et des pratiques d'élevage déficientes. Les bactéries résistantes ainsi présentes dans les organes des animaux, sont directement transmissibles aux hommes. Avec la perte d'efficacité des solutions thérapeutiques, les fabricants de médicaments et les vétérinaires, ont insisté pour que l'on utilise de nouveaux antibiotiques à usage humain (comme les fluoroquinolones dans les élevages de poulets aux Etats-Unis et au Canada) pour traiter les maladies des animaux. L'efficacité des antibiotiques servant à traiter les maladies humaines s'en est trouvée amoindrie, et des résistances sont apparues chez l'homme. Le débat sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages a été lancé notamment lorsque des entérocoques sont devenus résistants à un glycopeptide, la vancomycine. En effet, à titre d'exemple, au Danemark en 1994, 24 kg de vancomycine ont été prescrits en médecine humaine, alors que 24 000 kg de son homologue pour l'animal, l'avoparcine, furent utilisés dans la même année. Cet usage favorisait la résistance à un médicament pourtant développé pour faire face aux bactéries résistantes, et souvent utilisé comme arme de la dernière chance dans les hôpitaux. Depuis janvier 2006, l'UE a donc décidé d'interdire l'utilisation de la plupart des antibiotiques dans l'alimentation animale.

Les dangers pour la santé, liés à l'augmentation des résistances dans les élevages intensifs, ont été mis en évidence dès la fin des années 60 (rapport du Comité Swan-UK), et dénoncés par l'OMS, dès 1977. La Commission Européenne a déjà interdit l'utilisation d'un certain nombre d'antibiotiques comme facteurs de croissance chez les animaux. Certaines substances cependant sont toujours autorisées, et doivent faire l'objet d'une action communautaire, dans le cadre de la stratégie globale de lutte contre la résistance antimicrobienne.

*Salmonella* et *Campylobacter* font partie des causes les plus courantes de maladies d'origine alimentaire et on signale actuellement une résistance accrue de ces deux bactéries aux antibactériens.

Des flambées de *Salmonella* non typhoïdiques multirésistantes sont apparues en Europe comme aux Etats-Unis. La plupart des cas de *Salmonella* s'accompagnant d'une diarrhée ne nécessitent pas de traitements antibiotiques, car un tel traitement peut prolonger l'excrétion de cet organisme. Néanmoins, on rencontre aussi un grand nombre d'épisodes de pathologies invasives impliquant cette bactérie : infections disséminées dans la circulation sanguine et/ou

signes de réactions systémiques avec fièvre, rigidité, etc.). Dans un tel cas, un traitement antibiotique s'impose et les antibiotiques actuellement les plus efficaces sont les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération. La résistance des souches pose donc des problèmes lorsque celles-ci sont impliquées dans ces infections. C'est tout particulièrement le cas pour les enfants chez lesquels les fluoroquinolones sont contre-indiquées en raison du risque de lésions des articulations et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération constituent souvent le seul traitement efficace disponible.

Les faits récents concernant la résistance aux antimicrobiens des agents pathogènes transmis par les aliments sont sources de préoccupations. Il s'agit d'une résistance transférable de faible niveau aux fluoroquinolones chez les *Enterobacteriaceae*, et de l'émergence dans le monde entier, d'isolements de *Salmonella* émanant d'êtres humains et d'animaux, des bêtalactamases à spectre élargi.

L'endigement de la résistance aux antimicrobiens résultant des usages non humains de ces médicaments est une activité multisectorielle, impliquant toutes les parties concernées par l'utilisation des antimicrobiens en dehors de la médecine humaine. La collaboration entre les organisations internationales et entre toutes les parties prenantes pertinentes, est essentielle.

## Conclusions et perspectives

Ces travaux de recherche ont permis d'établir, dans un premier temps, un état des lieux sur la prévalence de *Salmonella* à la Réunion, travaux initiés suite à une volonté de la filière locale cherchant à diminuer leur taux de prévalence en élevages avicoles.

Les méthodes d'enquêtes de type longitudinal que nous avons utilisées, ont permis de mieux comprendre l'épidémiologie de cette bactérie, en prenant en considération l'ensemble des facteurs de risque dans leur globalité, comparativement aux études cas-témoins.

Nous avons tenté d'aborder cette étude par une investigation sur toute la chaîne visant à embrasser la filière dans sa globalité, fidèle à la vision de l'Union Européenne dans ce domaine et contrairement à l'approche des Etats-Unis qui se concentre uniquement sur l'extrémité de la chaîne en insistant sur la « décontamination » des carcasses avec des produits chlorés.

Les prémices des travaux portant sur *Campylobacter* ont été réalisés en parallèle de la recherche sur *Salmonella* afin d'avoir un aperçu de la prévalence de cette bactérie responsable également de TIAC. La recherche sur *Campylobacter* nécessiterait par ailleurs de plus larges investigations tant sur la discrimination des sous espèces présentes que sur les caractères de résistance aux antibiotiques. Les analyses de PFGE portant sur *Campylobacter* ont été réalisées mais ont été volontairement non publiées dans ce manuscrit car il nous a semblé peu informatif de les inclure sans avoir pu approfondir les recherches notamment en comparant les souches animales avec les isolats cliniques humains, *Campylobacter* n'étant pas recherché systématiquement à la Réunion dans le cas de diarrhées chez l'homme. La poursuite de l'étude sur *Campylobacter* est d'autant plus importante que ce germe reste au cœur des discussions de l'Union Européenne, de nombreux experts suggérant de l'inclure dans la réglementation.

De même, il va de soit qu'il faille compléter l'étude sur *Salmonella* tant sur l'investigation de terrain pour la détermination des autres sources potentielles de *Salmonella* que sur l'apport de procédés techniques plus récents tels que la MLVA, VNTR ou le HRM (high resolution melting) (Omiccioli et al., 2009) ; le but étant de rechercher la méthode la plus discriminante intra-sérovar pour pouvoir identifier avec davantage de précisions, les sources infectieuses principales.

*Salmonella* ne s'arrêtant pas à la volaille, une autre étude similaire est actuellement réalisée dans la filière porcine pour faire face à la réglementation qui va être mise en place dans les années prochaines d'ici 2012-2013. Il serait également intéressant de poursuivre ce type d'études dans les autres filières, que ce soit chez les petits ruminants ou chez les bovins car aucune information n'est également disponible sur le sujet.

Ce type d'études est intéressant à mener dans un contexte comme celui de l'Ile de la Réunion où le climat tropical et l'insularité sont deux paramètres importants à prendre en compte. Les températures élevées, le taux d'hygrométrie ainsi que la concentration d'élevages sur des surfaces agricoles disponibles relativement étroites sont autant de paramètres qui favorisent la dissémination de ces bactéries pathogènes dans l'environnement.

Même si comme tout autre travail, il reste toujours des questions en suspens, notre étude a pu apporter des réponses concrètes à des problèmes concrets ; et dans le contexte économique difficile qui est le notre, l'amélioration de la qualité sanitaire des denrées alimentaires reste une des voies pour assurer la pérennité des filières locales et consolider le tissu social et culturel.

## References

- Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broiler flocks of Gallus gallus, Part A. The EFSA Journal (2007) 98, 1-85. 98, 1-85.
- Achen, M., Morishita, T.Y., Ley, E.C., 1998, Shedding and colonization of Campylobacter jejuni in broilers from day-of-hatch to slaughter age. Avian Diseases 42, 732-737.
- Akaike, H., 1974. A new look at statistical model identification. In: IEEE Trans, pp. 716-722.
- Anderson, E.S., 1968, Drug Resistance in Salmonella Typhimurium and Its Implications. British Medical Journal 3, 333-&.
- Anderson, E.S., Ward, L.R., Desaxe, M.J., Desa, J.D.H., 1977, Bacteriophage-Typing Designations of Salmonella-Typhimurium. Journal of Hygiene 78, 297-300.
- Angen, O., Skov, M.N., Chriel, M., Agger, J.F., Bisgaard, M., 1996, A retrospective study on salmonella infection in Danish broiler flocks. Preventive Veterinary Medicine 26, 223-237.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., 2007, Prevalence and risk factors for Salmonella and Campylobacter spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. Journal of Food Protection 70, 1820-1828.
- Baggesen, D.L., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 1992, Plasmid Profiles and Phage Types of Salmonella-Typhimurium Isolated from Successive Flocks of Chickens on 3 Parent Stock Farms. Avian Pathology 21, 569-579.
- Baggesen, D.L., Wegener, H.C., Christensen, J.P., 1996, Typing of Salmonella enterica serovar Saintpaul: An outbreak investigation. Apmis 104, 411-418.
- Baird-parker, A.C., 1990, Foodborne Salmonellosis. Lancet 336, 1231-1235.
- Barker, J., Bloomfield, S.F., 2000, Survival of Salmonella in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. Journal of Applied Microbiology 89, 137-144.
- Barrow, P.A., 1994, Serological Diagnosis of Salmonella Serotype Enteritidis Infections in Poultry by Elisa and Other Tests. International Journal of Food Microbiology 21, 55-68.
- Bates, C., Hiett, K.L., Stern, N.J., 2004, Relationship of Campylobacter isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. Avian Diseases 48, 138-147.

- Besser, T.E., Gay, C.C., Gay, J.M., Hancock, D.D., Rice, D., Pritchett, L.C., Erickson, E.D., 1997, Salmonellosis associated with S-typhimurium DT104 in the USA. *Veterinary Record* 140, 75-75.
- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R.J. 2003. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers (*Soc Leukocyte Biology*), p. 479.
- Blivet, D., Salvat, G., Humbert, F., Colin, P., 1997, Evaluation of a new enrichment broth for the isolation of *Salmonella* spp. from poultry products. *International Journal of Food Microbiology* 38, 211-216.
- Böhm, R. 1993. Behavior of selected *Salmonellae* in the environment, p. 275.
- Bollaerts, K., Aerts, M., Faes, C., Grijspeerdt, K., Dewulf, J., Mintiens, K., 2008, Human salmonellosis: Estimation of dose-illness from outbreak data. *Risk Analysis* 28, 427-440.
- Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunangwong, S., Marnrim, N., Kaneko, K., Ogawa, M., 1998, *Salmonella* in broiler chickens in Thailand with special reference to contamination of retail meat with *Salmonella enteritidis*. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 1233-1236.
- Borch, E., Nesbakken, T., Christensen, H., 1996, Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 30, 9-25.
- Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D., 2001, Données de surveillance 1999 du Centre National de référence des *Salmonella* et des *Shigella*. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 32-96, 139-141.
- Boyer, C.I., Brown, J.A., Bruner, D.W., Narotsky, S., 1962, Salmonellosis in Turkeys and Chickens Associated with Contaminated Feed. *Avian Diseases* 6, 43-&.
- Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefevre, L., Fremy, S., Collatz, E., 2000, Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 965-971.
- Brisabois, A., Goullet, P., 1993, Isolation and Characterization of Carboxylesterase-E(3) from *Salmonella-Enterica*. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 176-183.
- Brumell, J.H., Perrin, A.J., Goosney, D.L., Finlay, B.B., 2002, Microbial pathogenesis: New niches for *Salmonella*. *Current Biology* 12, R15-R17.

- Burkholder, K.M., Thompson, K.L., Einstein, M.E., Applegate, T.J., Patterson, J.A., 2008, Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella Enteritidis* colonization in broilers. *Poultry Science* 87, 1734-1741.
- Butaye, P., Michael, G.B., Schwarz, S., Barrett, T.J., Brisabois, A., White, D.G., 2006, The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes and Infection* 8, 1891-1897.
- Callow, B.R., 1959, A new phage-typing scheme for *Salmonella typhi-murium*. *The Journal of hygiene* 57, 346-359.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M., 2007, Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1366-1375.
- Cardinale, E., Tall, F., Cisse, M., Gueye, E.F., Salvat, G., Mead, G., 2005, Risk factors associated with *Salmonella enterica* subsp *enterica* contamination of chicken carcasses in Senegal. *British Poultry Science* 46, 293-299.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E.F., Cisse, M., Salvat, G., 2004a, Risk Factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* In Press.
- Cardinale, E., Tall, F., Guèye, E.F., Cisse, M., Salvat, G., 2004b, Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in senegalese broiler-chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 63, 151-161.
- Carraminana, J.J., Yanguela, J., Blanco, D., Rota, C., Agustin, A.I., Arino, A., Herrera, A., 1997, *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection* 60, 1312-1317.
- Cason, J.A., Buhr, R.J., Dickens, J.A., Musgrove, M.T., Stern, N.J., 1999, Carcass microbiological quality following intermittent scalding and defeathering. *Journal of Applied Poultry Research* 8, 368-373.
- Cason, J.A., Buhr, R.J., Hinton, A., 2001, Unheated water in the first tank of a three-tank broiler scalding. *Poultry Science* 80, 1643-1646.



Chen, W., Martinez, G., Mulchandani, A., 2000, Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting Salmonella. *Analytical Biochemistry* 280, 166-172.

CLSI, 2008, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement Vol 28, 188 p.

Cobbold, R.N., Rice, D.H., Davis, M.A., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2006, Long-term persistence of multi-drug-resistant Salmonella enterica serovar Newport in two dairy herds. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* 228, 585-591.

Cordano, A.M., Richard, C., Vieu, J.F., 1971, Study of 513 Strains of Salmonella-Typhi-Murium Isolated in France between 1969 and 1970. *Annales De L Institut Pasteur* 121, 473-&.

Corry, J.E.L., Allen, V.M., Hudson, W.R., Breslin, M.F., Davies, R.H., 2002, Sources of salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology* 92, 424-432.

Cortez, A.L.L., Carvalho, A., Ikuno, A.A., Burger, K.P., Vidal-Martins, A.M.C., 2006, Identification of Salmonella spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. *Research in Veterinary Science* 81, 340-344.

Crilly, J., Power, E.P., Cowman, H.J., Cryan, B., Buckley, J.F., 2001, Epidemiology of Salmonella infection in the south of Ireland. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 40, 215-226.

Crump, J.A., Griffin, P.M., Angulo, F.J., 2002, Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clinical Infectious Diseases* 35, 859-865.

D'ortenzio, E., Weill, F., Ragonneau, S., Lebon, J.A., Renault, P., Pierre, V., 2008, First report of a Salmonella enterica serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. *Euro surveillance* 13, 393-395

Danguy des Déserts, J., Davies, R.H., Vaughan, K., McLaren, I., Canning, P., Wintrip, A., Mueller Doblies, D., Carrique Mas, J.J. A Longitudinal Study of Salmonella Infection in Different Types of Turkey Flocks in Great Britain (Wiley Online Library).

Danguy des Déserts, J., Davies, R.H., Vaughan, K., McLaren, I., Canning, P., Wintrip, A., Mueller Doblies, D., Carrique Mas, J.J. 2010. A Longitudinal Study of Salmonella Infection in Different Types of Turkey Flocks in Great Britain (Wiley Online Library).

- Danyluk, M.D., Nozawa-Inoue, M., Hristova, K.R., Scow, K.M., Lampinen, B., Harris, L.J., 2008, Survival and growth of *Salmonella* Enteritidis PT 30 in almond orchard soils. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1391-1399.
- Davies, M.A., Hancock, D.D., Rice, D.H., Call, D.R., DiGiacomo, R., Samadpour, M., Besser, T.E. 2003. Feedstuffs as a vehicle of cattle exposure to *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* (Elsevier), pp. 199-210.
- Davies, R., Breslin, M., Corry, J.E., Hudson, W., Allen, V.M., 2001a, Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. *The Veterinary Record* 149, 227-232.
- Davies, R., Breslin, M., Corry, J.E.L., Hudson, W., Allen, V.M., 2001b, Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. *Veterinary Record* 149, 227-+.
- Davies, R.H., Hinton, M.H. 2000. *Salmonella* in animal feed, pp. 285–300.
- Davies, R.H., Wray, C., 1996, Persistence of *Salmonella enteritidis* in poultry units and poultry food. *British Poultry Science* 37, 589-596.
- De Cesare, A., Manfreda, G., 2002, Use of the automated ribotyping for epidemiological investigations. *Annals of Microbiology* 52, 181-190.
- De las Casas, E., Pomeroy, B.S., Harein, P.K. 1968. Infection and quantitative recovery of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (panzer), p. 1871.
- Denagamage, T.N., O'Connor, A.M., Sargeant, J.M., Rajic, A., McKean, J.D., 2007, Efficacy of vaccination to reduce *Salmonella* prevalence in live and slaughtered swine: A systematic review of literature from 1979 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 539-549.
- Doran, J.L., Collinson, S.K., Burian, J., Sarlos, G., Todd, E.C.D., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, P.I., Kay, W.W., 1993, DNA-Based Diagnostic-Tests for *Salmonella* Species Targeting *Agfa*, the Structural Gene for Thin, Aggregative Fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2263-2273.
- DuPont, H.L., 2007, The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clinical Infectious Diseases* 45, 1353-1361.

Edel, W., 1994, Salmonella enteritidis eradication programme in poultry breeder flocks in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* 21, 171-178.

EFSA 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008

Ekperigin, H.E., Jang, S., McCapes, R.H., 1983, Effective Control of a Gentamicin-Resistant Salmonella Arizonae Infection in Turkey Poults. *Avian Diseases* 27, 822-829.

Ezquerria, E., Burnens, A., Jones, C., Stanley, J., 1993, Genotypic Typing and Phylogenetic Analysis of Salmonella-Paratyphi B and S-Java with Is200. *Journal of General Microbiology* 139, 2409-2414.

Fedoraka\_Cray, P.J., Bailey, J.S., Stern, N.J., Cox, N.A., Ladely, S.R., Musgrove, M., 1999, Mucosal competitive exclusion to reduce Salmonella in swine. *Journal of Food Protection* 62, 1376-1380.

Findlay, C.R., 1972, Persistence of Salmonella Dublin in Slurry in Tanks and on Pasture. *Veterinary Record* 91, 233-&.

Fisher, I.S.T., Rowe, B., Barlett, C.L.R., Halbach-Zankl, H., Thiel, W., Andr, P., van Loock, F., Gerner-Smidt, P., Ward, L.R., Wall, P.G. 1997. Salmonella enteritidis and S. typhimurium in Western Europe for 1993-1995: a surveillance report from Salm-Net (Centre européen pour la surveillance épidémiologique du SIDA).

Flint, J.A., Van Duynhoven, Y.T., Angulo, F.J., DeLong, S.M., Braun, P., Kirk, M., Scallan, E., Fitzgerald, M., Adak, G.K., Sockett, P., Ellis, A., Hall, G., Gargouri, N., Walke, H., Braam, P., 2005, Estimating the burden of acute gastroenteritis, foodborne disease, and pathogens commonly transmitted by food: An international review. *Clinical Infectious Diseases* 41, 698-704.

Francart, S., Protais, J., L'Hospitalier, R., Salvat, G., Colin, P., 1993. Quelques facteurs influencant la prévalence de Salmonella dans l'environnement de la filière ponte : une enquête épidémiologique dans 841 bâtiments. In: 8ème Colloque de la section Microbiologie Alimentaire de la société française de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, 28-29 avril 1993, pp. 107-121.

Gast, R.K., Stephens, J.F., Foster, D.N., 1988, Effects of Kanamycin Administration to Poultry on the Interspecies Transmission of Drug-Resistant Salmonella. *Poultry Science* 67, 699-706.

Gatto, A.J., Peters, T.M., Green, J., Fisher, I.S.T., Gill, O.N., O'Brien, S.J., Maguire, C., Berghold, C., Lederer, I., Gerner-Smidt, P., Torpdahl, M., Siitonen, A., Lukinmaa, S., Tschape, H., Prager, R., Luzzi, I., Dionisi, A.M., Van der Zwaluw, W.K., Heck, M., Coia, J., Brown, D., Usera, M., Echeita, A., Threlfall, E.J., 2006, Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiology and Infection* 134, 729-736.

Gaukler, S.M., Linz, G.M., Sherwood, J.S., Dyer, N.W., Bleier, W.J., Wannemuehler, Y.M., Nolan, L.K., Logue, C.M., 2009, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in Wild European Starlings at a Kansas Cattle Feedlot. *Avian Diseases* 53, 544-551.

Gillespie, I., Elson, R. 2005. Successful reduction of human *Salmonella* Enteritidis infection in England and Wales.

Glynn, M.K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., Angulo, F.J. 1998. Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States (Mass Med Soc), p. 1333.

Goodwin, M.A., Waltman, W.D. 1996. Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens, p. 51.

Gould, G.E., Moses, H.E., 1951, Lesser Mealworm Infestation in a Brooder House. *Journal of Economic Entomology* 44, 265-265.

Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007, Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*.

Gruenheid, S., Finlay, B.B., 2003, Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422, 775-781.

Guy, R.A., Kapoor, A., Holicka, J., Shepherd, D., Horgen, P.A., 2006, A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughterhouses. *Journal of Food Protection* 69, 1265-1272.

Hakanen, A.J., Lindgren, M., Huovinen, P., Jalava, J., Siitonen, A., Kotilainen, P., 2005, New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: Nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5775-5778.

- Hall, W.J., Legenhausen, D.H., Macdonald, A.D., 1949, Studies on Fowl Typhoid .1. Nature and Dissemination. *Poultry Science* 28, 344-362.
- Harein, P.K., Delascas.E, Pomeroy, B.S., York, M.D., 1970, Salmonella Spp and Serotypes of Escherichia-Coli Isolated from Lesser Mealworm Collected in Poultry Brooder Houses. *Journal of Economic Entomology* 63, 80-&.
- Helms, M., Simonsen, J., Molbak, K., 2006, Foodborne bacterial infection and hospitalization: A registry-based study. *Clinical Infectious Diseases* 42, 498-506.
- Herikstad, H., Hayes, P., Mokhtar, M., Fracaro, M.L., Threlfall, E.J., Angulo, F.J., 1997, Emerging quinolone-resistant Salmonella in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 3, 371-372.
- Hilton, A.C., Banks, J.G., Penn, C.W., 1996, Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of Salmonella: Strain differentiation and characterization of amplified sequences. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 575-584.
- Hofstad, M.S., John, B.H., Calnek, B.W., Reid, W.N., Yoder, H.W., 1992, Diseases of poultry, 8th ed.; Panima Education Book agency : New Delhi, India, 65-123.
- Holmberg, S.D., Cohen, M.L., Osterholm, M.T., Senger, K.A., 1984, Drug-Resistant Salmonella from Animals Fed Antimicrobials - Reply. *New England Journal of Medicine* 311, 1699-1700.
- Hong, Y., Berrang, M.E., Liu, T.R., Hofacre, C.L., Sanchez, S., Wang, L.H., Maurer, J.J., 2003, Rapid detection of Campylobacter coli, C-jejuni, and Salmonella enterica on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3492-3499.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000, Applied Logistic Regression. Wiley, New York, 373 p.
- Huber, K., Gouilloud, L., Zenner, L., 2007, A preliminary study of natural and experimental infection of the lesser mealworm Alphitobius diaperinus (Coleoptera : Tenebrionidae) with Histomonas meleagridis (Protozoa : Sarcomastigophora). *Avian Pathology* 36, 279-U279.
- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria (John Wiley & Sons), pp. 825-834.

- Humphrey, T., 2001, *Salmonella typhimurium* definitive type 104 a multi-resistant *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* 67, 173-186.
- Humphrey, T.J., Lanning, D.G. 2009. *The vertical transmission of salmonellas and formic acid treatment of chicken feed: A possible strategy for control* (Cambridge Univ Press), pp. 43-49.
- Humphrey, T.J., Wilde, S.J., Rowbury, R.J., 1997, Heat tolerance of *Salmonella typhimurium* DT104 isolates attached to muscle tissue. *Letters in Applied Microbiology* 25, 265-268.
- Huneau-Salaün, A., Marianne, C., Sophie, L.B., Françoise, L., Isabelle, P., Sandra, R., Virginie, M., Philippe, F., Nicolas, R. 2009. Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* contamination in 519 French laying hen flocks at the end of the laying period (Elsevier), pp. 51-58.
- Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., Gros, P. 2000. *Natural Resistance to Intracellular Infections* (Rockefeller Univ Press), p. 1237.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Bolder, N. 1998. The role of transport crates in *Campylobacter* contamination of broilers, pp. 379-380.
- Jenkins, M.B., Endale, D.M., Fisher, D.S., 2008, Most probable number methodology for quantifying dilute concentrations and fluxes of *Salmonella* in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1562-1568.
- Jones, F.T., Axtell, R.C., Rives, D.V., Scheideler, S.E., Tarver, F.R., Walker, R.L., Wineland, M.J., 1991, A Survey of *Salmonella* Contamination in Modern Broiler Production. *Journal of Food Protection* 54, 502-507.
- Jones, T.F., Angulo, F.J., 2006, Eating in restaurants: A risk factor for foodborne disease? *Clinical Infectious Diseases* 43, 1324-1328.
- Jones, T.F., Ingram, L.A., Cieslak, P.R., Vugia, D.J., Tobin-D'Angelo, M., Hurd, S., Medus, C., Cronquist, A., Angulo, F.J., 2008, Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *Journal of Infectious Diseases* 198, 109-114.
- Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., Humphrey, T.J., 2002, Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology* 76, 151-164.

- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2001, Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* 64, 367-372.
- Jothikumar, N., Wang, X.W., Griffiths, M.W., 2003, Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 66, 2141-2145.
- Kabir, S.M.L., 2010, Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 89-114.
- Khoodoo, M.H.R., Issack, M.I., Jaufeerally-Fakim, Y., 2002, Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enterica* isolates from Mauritius. *Letters in Applied Microbiology* 35, 146-152.
- Kim, A., Lee, Y.J., Kang, M.S., Kwag, S.I., Cho, J.K., 2007, Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. *Journal of Veterinary Science* 8, 155-161.
- Kinde, H., Read, D.H., Ardans, A., Breitmeyer, R.E., Willoughby, D., Little, H.E., Kerr, D., Gireesh, R., Nagaraja, K.V., 1996, Sewage effluent: likely source of *Salmonella* Enteritidis, phage type 4 infection in a commercial chicken layer flock in southern California. *Avian Diseases* 40, 665-671.
- Kingsley, R.A., Baumler, A.J., 2000, Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular Microbiology* 36, 1006-1014.
- Kuhn, H., Wonde, B., Rabsch, W., Reissbrodt, R., 1994, Evaluation of Rambach Agar for Detection of *Salmonella* Subspecies-I to Vi. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 749-751.
- Lahellec, C., Colin, P., Bennejean, G., Paquin, J., Guillerm, A., Debois, J.C., 1986, Influence of resident *Salmonella* on contamination of broiler flocks. *Poultry Science* 65, 2034-2039.
- Lahellec, C., Meurier, C., 1973, Influence de l'utilisation d'un système d'échouage sur la pollution superficielle des carcasses de volailles. *Bulletin d'information de la Station Avicole de Ploufragan* 13, 47-59.
- Le Torc'h, J.M., Phytoma 1979, The new pest of rearing buildings (*Alphitobius diaperinus* in pig sties, Brittany). 308, 31-33.

- Leffer, A.M., Kuttel, J., Martins, L.M., Pedroso, A.C., Astolfi-Ferreira, C.S., Ferreira, F., Ferreira, A.J.P., 2010, Vectorial Competence of Larvae and Adults of *Alphitobius diaperinus* in the Transmission of *Salmonella* Enteritidis in Poultry. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10, 481-487.
- Liebana, E., Crowley, C.J., Garcia\_Migura, L., Breslin, M.F., Corry, J.E., Allen, V.M., Davies, R.H., 2002, Use of molecular fingerprinting to assist the understanding of the epidemiology of *Salmonella* contamination within broiler production. *British Poultry Science* 43, 38-46.
- Lillard, H.S., 1988, Comparison of sampling methods and implication for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. *Journal of Food Protection* 51, 405-408.
- Limawongpranee, S., Hayashidani, H., Okatani, A.T., Hirota, C., Kaneko, K., Ogawa, M., 1999, Contamination of *Salmonella* blockley in the environment of a poultry farm. *Avian Diseases* 43, 302-309.
- Liming, S.H., Bhagwat, A.A., 2004, Application of a molecular beacon - real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 95, 177-187.
- Lin, C.K., Hung, C.L., Hsu, S.C., Tsai, C.C., Tsen, H.Y., 2004, An improved PCR primer pair based on 16S rDNA for the specific detection of *Salmonella* serovars in food samples. *Journal of Food Protection* 67, 1335-1343.
- Lister, S.A., 1990, *Salmonella* Enteritidis in pheasants. *Veterinary Record* 10, 148-150.
- Lublin, A., Sela, S., 2008, The Impact of Temperature During the Storage of Table Eggs on the Viability of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Virchow in the Eggs. *Poultry Science* 87, 2208-2214.
- Malorny, B., Lofstrom, C., Wagner, M., Kramer, N., Hoorfar, J., 2008, Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1299-1304.
- Mare, L., Van der Walt, M.L., Dicks, L.M.T., 2000, Phage types of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in South Africa from 1991-1995. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 67, 129-133.



- Marin, C., Hernandez, A., Lainez, M., 2009, Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science* 88, 424-431.
- Marin, C., Lainez, M., 2009, Salmonella detection in feces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse. *Poultry Science* 88, 1999-2005.
- Mataragas, M., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., 2008, Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal of Food Microbiology* 126, 1-12.
- McAllister, J.C., Steelman, C.D., Skeeles, J.K., 1994, Reservoir Competence of the Lesser Mealworm (Coleoptera, Tenebrionidae) for Salmonella-Typhimurium (Eubacteriales, Enterobacteriaceae). *Journal of Medical Entomology* 31, 369-372.
- McCrea, B.A., Tonooka, K.H., VanWorth, C., Boggs, C.L., Atwill, R., Schrader, J.S., 2006, Prevalence of Campylobacter and Salmonella species on farm, after transport, and at processing in specialty market poultry. *Poultry Science* 85, 136-143.
- Mead, G.C., Hudson, W.R., Hinton, M.H., 1994, Use of a Marker Organism in Poultry-Processing to Identify Sites of Cross-Contamination and Evaluate Possible Control Measures. *British Poultry Science* 35, 345-354.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999, Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- Meerburg BG, J.-R.W., Wagenaar JA, Kijlstra A., 2006, Presence of Salmonella and Campylobacter spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol.* 72, 960-962.
- Meerburg, B.G., Kijlstra, A., 2007, Role of rodents in transmission of Salmonella and Campylobacter. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2774-2781.
- Mikolajczyk, A., Radkowski, M., 2001, Contamination of Salmonella spp. in slaughter chickens. *Med. Weter.* 57, 745-747.
- Mitchell, M.A., Kettlewell, P.J., 1994, Road Transportation of Broiler-Chickens - Induction of Physiological Stress. *Worlds Poultry Science Journal* 50, 57-59.

- Mogamedi, K.L.M., Goyvaerts, E.M.A., Venter, S.N., Sibara, M.M., 2007, Optimisation of the PCR-invA primers for the detection of Salmonella in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water Sa* 33, 195-202.
- Moury F., Frémy S., Brisabois A., 2006, Epidémiologie des Salmonelles d'origine non humaine, données du réseau Salmonella- année 2005. *Bulletin épidémiologique* 20.
- Muhammad, M., Muhammad, L.U., Ambali, A.G., Mani, A.U., Azard, S., Barco, L., Prevalence of Salmonella associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology* 140, 131-135.
- Muhammad, M., Muhammad, L.U., Ambali, A.G., Mani, A.U., Azard, S., Barco, L., 2010, Prevalence of Salmonella associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. *Veterinary Microbiology* 140, 131-135.
- Mulder, R., 1995, Impact of Transport and Related Stresses on the Incidence and Extent of Human Pathogens in Pigeon and Poultry. *Journal of Food Safety* 15, 239-246.
- Mulder, R., Dorresteyn, L.W.J., Vanderbroek, J., 1978, Cross-Contamination During Scalding and Plucking of Broilers. *British Poultry Science* 19, 61-70.
- Murakami, K., Horikawa, K., Ito, T., Otsuki, K., 2001, Environmental survey of salmonella and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiology and Infection* 126, 159-171.
- Murase, T., Okitsu, T., Suzuki, R., Morozumi, H., Matsushima, A., Nakamura, A., Yamai, S., 1995, Evaluation of DNA-Fingerprinting by Pfgc as an Epidemiologic Tool for Salmonella Infections. *Microbiology and Immunology* 39, 673-676.
- Namata, H., Welby, S., Aerts, M., Faes, C., Abrahantes, J.C., Imberechts, H., Vermeersch, K., Hooyberghs, J., Meroc, E., Mintiens, K., 2009, Identification of risk factors for the prevalence and persistence of Salmonella in Belgian broiler chicken flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 90, 211-222.
- Nayak, R., Kenney, P.B., Keswani, J., Ritz, C. 2003. Isolation and characterisation of Salmonella in a turkey production facility (Taylor & Francis), pp. 192-202.
- Nayak, R., Stewart, T., Wang, R.F., Lin, J., Cerniglia, C.E., Kenney, P.B., 2004, Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant Salmonella isolated from preharvest turkey production sources. *International Journal of Food Microbiology* 91, 51-62.

- Neto, O.C.D., Penha, R.A.C., Barrow, P., Berchieri, A., 2010, Sources of Human Non-Typhoid Salmonellosis: A Review. *Brazilian Journal of Poultry Science* 12, 1-11.
- Nogrady, N., Imre, A., Rychlik, I., Barrow, P.A., Nagy, B., 2003, Growth and colonization suppression of *Salmonella enterica* serovar Hadar in vitro and in vivo. *Fems Microbiology Letters* 218, 127-133.
- O'Connor, J.P. 1987. *Alphitobius diaperinus* (Panzer)(Col.: Tenebrionidae) damaging polystyrene insulation in Irish piggery, pp. 1472-1475.
- Okolo, M.I.O., 1986, Bacterial Drug-Resistance in Meat Animals - a Review. *International Journal of Zoonoses* 13, 143-152.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani, M., 2009, A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology* 26, 615-622.
- Österberg, J., Vågsholm, I., Boqvist, S., Lewerin, S.S. 2006. Feed-borne outbreak of *Salmonella* Cubana in Swedish pig farms: risk factors and factors affecting the restriction period in infected farms, pp. 13-21.
- Otokunfor, T.V., Kindzeka, B.I., Ibiteye, I.O., Osuji, G.U., Obi, F.O., Jack, A.W.K., 2003, *Salmonella* in gut and droppings of three pest lizards in Nigeria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, 545-548.
- Pacer, R.E., Spika, J.S., Thurmond, M.C., Hargrettbean, N., Potter, M.E., 1989, Prevalence of *Salmonella* and Multiple Antimicrobial-Resistant *Salmonella* in California Dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195, 59-63.
- Padungtod, P., Kaneene, J.B., 2006, *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 108, 346-354.
- Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J.G., Oscar, T.P., Harter-Dennis, J., White, D.G., 2007, Prevalence and antimicrobial resistance of salmonella recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection* 70, 2466-2472.
- Pedersen, T.B., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 2008, Persistence of *Salmonella* Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. *Avian Pathology* 37, 421-427.

- Pieskus, J., Milius, J., Michalskiene, I., Zagrebneviene, G., 2006, The distribution of Salmonella serovars in chicken and humans in Lithuania. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 53, 12-16.
- Poirier, E., Watier, L., Espie, E., Weill, F.X., De Valk, H., Desenclos, J.C., 2008, Evaluation of the impact on human salmonellosis of control measures targeted to Salmonella Enteritidis and Typhimurium in poultry breeding using time-series analysis and intervention models in France. *Epidemiology and Infection* 136, 1217-1224.
- Popoff, M.Y., Le Minor, L. 1992. Antigenic formulas of Salmonella serovars, 6th revision. In WHO collaborating Centre for reference and research (Paris).
- Poppe, C. 2000. Salmonella infections in the domestic fowl, pp. 107-132.
- Poppe, C., Kolar, J.J., Demczuk, W.H.B., Harris, J.E., 1995, Drug-Resistance and Biochemical Characteristics of Salmonella from Turkeys. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 59, 241-248.
- Pottier, G.L. 2010. La volaille française à la croisée des marchés, France, B.A.V., ed., pp. 195-198.
- Rahman, M.A., Samad, M.A., Rahman, M.B., Kabir, S.M.L. 2009. In vitro antibiotic sensitivity and therapeutic efficacy of experimental salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in broiler chickens, p. 99.
- Reiter, M.G.R., Fiorese, M.L., Morett, G., Lopez, M.C., Jordano, R., 2007, Prevalence of Salmonella in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection* 70, 1723-1725.
- Ribeiro, S.A.M., de Paiva, J.B., Zotesso, F., Lemos, M.V.F., Berchieri, A., 2009, Molecular Differentiation between Salmonella Enterica Subsp Enterica Serovar Pullorum and Salmonella Enterica Subsp Enterica Serovar Gallinarum. *Brazilian Journal of Microbiology* 40, 184-188.
- Rigby, C.E., Pettit, J.R., 1979, Effect of Transport Stress on Salmonella-Typhimurium Carriage by Broiler-Chickens. *Canadian Journal of Public Health-Revue Canadienne De Sante Publique* 70, 61-61.
- Roche, A.J., Cox, N.A., Richardson, L.J., Buhr, R.J., Cason, J.A., Fairchild, B.D., Hinkle, N.C., 2009, Transmission of Salmonella to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poultry Science* 88, 44-48.

- Rodrigue, D.C., Tauxe, R.V., Rowe, B., 1990, International Increase in Salmonella-Enteritidis - a New Pandemic. *Epidemiology and Infection* 105, 21-27.
- Rose, N., Beaudeau, F., Drouin, P., Toux, J.Y., Rose, V., Colin, P., 1999, Risk factors for Salmonella enterica subsp enterica contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine* 39, 265-277.
- Rostagno, M.H., Hurd, H.S., McKean, J.D., 2005, Resting pigs on transport trailers as an intervention strategy to reduce Salmonella enterica prevalence at slaughter. *Journal of Food Protection* 68, 1720-1723.
- Roy, P., Dhillon, A.S., Shivaprasad, H.L., Schaberg, D.M., Bandli, D., Johnson, S., 2001, Pathogenicity of different serogroups of avian Salmonellae in specific-pathogen-free chickens. *Avian Diseases* 45, 922-937.
- Rusul, G., Khair, J., Radu, S., Cheah, C.T., Yassin, R.M., 1996, Prevalence of Salmonella in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 33, 183-194.
- S. Le Bouquin, V.A., S. Rouxel, I. Petetin, Mélanie Picherot, V. Michel, M. Chemaly, 2010, Prevalence and risk factors for Salmonella spp. contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*.
- Saad, A.M., Almujaali, D.M., Babiker, S.H., Shuaib, M.A.M., Abdelgadir, K.A., Alfadul, Y.A., 2007, Prevalence of Salmonellae in broiler chicken carcasses and poultry farms in the central region, KSA. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, 164-167.
- Salez, L., Malo, D. 2004. Protagonistes de l'immunité innée dans les infections à salmonelles, pp. 1119-1124.
- Salvat, G., 1997a. Développement de quelques outils nécessaires à l'application de la méthode HACCP dans les abattoirs de volailles. Université de Bretagne Occidentale, Ploufragan.
- Salvat, G., 1997b, Prévention des problèmes de santé publique liés aux produits issus de la filière avicole. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 70, 43-68.
- Salvat, G., Allo, J.C., Colin, P., 1993. Evolution of microbiological contamination of poultry carcasses during slaughtering: a survey on 12 french abattoirs. In: *Qualité des produits avicoles. 11ème symposium européen sur la qualité de la viande de volaille*, Tours, France, 4-8 Octobre, pp. 562-568.

- Salvat, G., Fravallo, P., 2004, Risk assessment strategies for Europe: Integrated safety strategy or final product control: Example of *Listeria monocytogenes* in processed products from pork meat industry. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 111, 331-334.
- Sasipreeyajan, J., Jerngklinchan, J., Koowatananukul, C., Saitanu, K., 1996, Prevalence of salmonellae in broiler, layer and breeder flocks in Thailand. *Tropical Animal Health and Production* 28, 174-180.
- Scherer, K., Szabo, I., Rosler, U., Appel, B., Hensel, A., Nockler, K., 2008, Time course of infection with *Salmonella* Typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *Journal of Food Protection* 71, 699-705.
- Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Barker, R.M., Crichton, P.B., Old, D.C., Musser, J.M., Whittam, T.S., 1990, Genetic Population-Structure, Clonal Phylogeny, and Pathogenicity of *Salmonella*-Paratyphi B. *Infection and Immunity* 58, 1891-1901.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986, Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population-Genetics and Systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 873-884.
- Seo, K.H., Valentin-Bon, I.E., Brackett, R.E., 2006, Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in homemade ice cream associated with an outbreak: Comparison of conventional and real-time PCR methods. *Journal of Food Protection* 69, 639-643.
- Shackelford, A.D.S., 1988, Modification of processing methods to control *Salmonella* in poultry. *Poultry Science* 67, 933-935.
- Sharma, M., Katoch, R.C., Batta, M.K., Sharma, A.K. 1996. Deadly outbreak in chicks owing to *Salmonella* typhimurium (New Delhi: Indian Poultry Science Association, 1966-), pp. 60-62.
- Shimoni, Z., Pitlik, S., Leibovici, L., Samra, Z., Konigsberger, H., Drucker, M., Agmon, V., Ashkenazi, S., Weinberger, M., 1999, Nontyphoid salmonella bacteremia: Age-related differences in clinical presentation, bacteriology, and outcome. *Clinical Infectious Diseases* 28, 822-827.
- Shivaprasad, H.L., 2000, Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 19, 405-424.

- Shivaprashad, H.L., 1997, Pullorum disease and fowl typhoid. In *Diseases of Poultry*, 10th ed, 82-96.
- Skov, M.N., Spencer, A.G., Hald, B., Petersen, L., Nauerby, B., Carstensen, B., Madsen, M., 2004, The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. *Avian Diseases* 48, 9-18.
- Slader, J., Domingue, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J., Humphrey, T.J., 2002, Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 713-719.
- Snow, L.C., Davies, R.H., Christiansen, K.H., Carrique-Mas, J.J., Cook, A.J.C., Teale, C.J., Evans, S.J., 2008, Survey of the prevalence of *Salmonella* on commercial broiler farms in the United Kingdom, 2005/06. *Veterinary Record* 163, 649-654.
- Sofos, J.N., 2008, Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science* 78, 3-13.
- Sousa, E., Werther, K., Berchieri, A., 2010, Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens, and *Salmonella* spp. in wild birds captured near poultry facilities. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia* 62, 219-223.
- Sow, A.I., Seydi, M., Thiaw, M., Ndour, C.T., Soumare, C.T., Cisse, M.F., Badiane, S., Samb, A., 2000, Les salmonelloses au centre hospitalier universitaire de Fann à Dakar : aspects bactériologiques. *Médecine et Maladies Infectieuses* 30, 657-660.
- Stanley, J., Baquar, N., Threlfall, E.J., 1993, Genotypes and Phylogenetic-Relationships of *Salmonella*-Typhimurium Are Defined by Molecular Fingerprinting of Is200 and 16s Rrn Loci. *Journal of General Microbiology* 139, 1133-1140.
- Stanley, J., Jones, C.S., Threlfall, E.J., 1991, Evolutionary Lines among *Salmonella*-Enteritidis Phage Types Are Identified by Insertion-Sequence Is200 Distribution. *Fems Microbiology Letters* 82, 83-89.
- Suzuki, H., Yamamoto, S., 2009, *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in Japan: A literature survey. *Food Control* 20, 531-537.
- Szych, J., Cieslik, A., Paciorek, J., Kaluzewski, S., 2001, Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* subsp *enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 37-42.

- Taylor, K.D., 1972, Rodent problems in Tropical agriculture. PANS 18, 81-88
- Thomas, C.J., Mc Meekin, T.A., 1980, Contamination of broiler carcasses skin during commercial processing procedures: an electron microscopy study. Applied and Environmental Microbiology 40, 133-144.
- Thong, K.L., Goh, Y.L., Radu, S., Noorzaleha, S., Yasin, R., Koh, Y.T., Lim, V.K., Rusul, G., Puthuchery, S.D., 2002, Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. Journal of Clinical Microbiology 40, 2498-2503.
- Thorns, C.J., 2000, Bacterial food-borne zoonoses. Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties 19, 226-239.
- Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R., Rowe, B. 2009a. Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 49 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations (Cambridge Univ Press), pp. 243-251.
- Threlfall, E.J., Rowe, B., Ward, L.R. 2009b. Subdivision of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid profile typing (Cambridge Univ Press), pp. 459-465.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Rowe, B. 1997. Incidence croissante de la résistance au triméthoprim et à la ciprofloxacine de *Salmonella typhimurium* DT104 épidémique en Angleterre et au Pays de Galles, pp. 81-84.
- Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005, Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol 55, 521-524.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J.J., Ellis, P., Moutou, F., Louza, A., 1996, Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures Maisons-Alfort, France, 551 p.
- Toyofuku, H., 2008, Epidemiological data on food poisonings in Japan focused on *Salmonella*, 1998-2004. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 25, 1058-1066.
- Trevejo, R.T., Courtney, J.G., Starr, M., Vugia, D.J., 2003, Epidemiology of salmonellosis in California, 1990-1999: Morbidity, mortality, and hospitalization costs. American Journal of Epidemiology 157, 48-57.



Tribute, A.F.A. 1981. Theabald Smith, 18594934: A Fiftieth Anniversury Tribute, pp. 231-235.

Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., Akira, S. 2002. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E2 production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E2 synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway (Am Assoc Immunol), p. 5811.

Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D., 1998, Prevalence of Salmonella in poultry carcasses and their products in Belgium. International Journal of Food Microbiology 40, 1-8.

Valdezate, S., Echeita, A., Diez, R., Usera, M.A., 2000, Evaluation of phenotypic and genotypic markers for characterisation of the emerging gastroenteritis pathogen Salmonella hadar. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 19, 275-281.

Van Asselt, E.D., Thissen, J., van der Fels-Klerx, H.J., 2009, Salmonella serotype distribution in the Dutch broiler supply chain. Poultry Science 88, 2695-2701.

Van Nierop, W., Duse, A.G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S., Bloomfield, S.F., 2005, Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by Salmonella, Listeria monocytogenes and Campylobacter. International Journal of Food Microbiology 99, 1-6.

Van Schothorst, M., Notermans, S., 1980, Food-borne diseases associated with poultry, In: Mead, G.C., Freeman, B.M. (Eds.) Meat Quality in Poultry and Game Birds. British Poultry Science Ltd., Edinburgh, pp. 79-90.

Vidon, D.J.M., Jacob, S., Ganzenmuller, M., 1978, Incidences of Simple and Transferable Drug-Resistance in Escherichia-Coli and Salmonella Isolated from Various Foods - Identification of a R Plasmid in S-Saint-Paul. Annales De Microbiologie A129, 155-159.

Vo, A.T.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Heck, M., Verbruggen, A., Maas, H.M.E., Gaastra, W., 2006, Distribution of Salmonella enterica Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the Dominance of Salmonella Typhimurium Phage Type 90. Veterinary Microbiology 113, 153-158.

Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C., Tauxe, R.V., 2004, FoodNet estimate of the burden of illness caused by

nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 38, S127-S134.

Voogt, N., Raes, M., Wannet, W.J., Henken, A.M., van\_de\_Giessen, A.W., 2001, Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology* 32, 89-92.

Wagner, J., Hahn, H. 1999. Increase of bacterial resistance in human medicine by resistance genes of bacteria from meat supplying animals, p. 380.

Wall, P.G., Morgan, D., Lamden, K., Griffin, M., Threlfall, E.J., Ward, L.R., Rowe, B., 1995, Transmission of Multiresistant Strains of *Salmonella*-Typhimurium from Cattle to Man. *Veterinary Record* 136, 591-592.

Ward, L.R., de Sa, J.D., Rowe, B., 1987, A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* 99, 291-294.

Watson, D.W., Guy, J.S., Stringham, S.H., 2000, Limited transmission of turkey coronavirus in young turkeys by adult *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Medical Entomology* 37, 480-483.

Wegener, H.C., Hald, T., Wong, D.L., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P., Molbak, K., 2003, *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 9, 774-780.

Weinberger, M., Andorn, N., Agmon, V., Cohen, D., Shohat, T., Pitlik, S.D., 2004, Blood invasiveness of *Salmonella enterica* as a function of age and serotype. *Epidemiology and Infection* 132, 1023-1028.

Wilson, I.G., Whitehead, E., 2006, Emergence of *Salmonella* Blockley, possible association with long-term reactive arthritis, and antimicrobial resistance. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 46, 3-7.

Wong, D., Hald, T., van der Wolf, P.J., Swanenburg, M., 2002, Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science* 76, 215-222.

Worcmanbarninka, D., Destro, M.T., Fernandes, S.A., Landgraf, M., 2001, Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 64, 387-393.

Wray, C., Davies, R.H. 1997. Reflections on the epidemiology of Salmonella: a challenge for disease control, p. 22.

Wybo, I., Wildemauwe, C., Godard, C., Bertrand, S., Collard, J.M. 2004. Antimicrobial drug resistance in nontyphoid human Salmonella in Belgium: trends for the period 2000-2002, pp. 152-160.

Yadav, A.S., Singh, R.P., Kirupasankar, M., 2008, Occurrence of Salmonella in chicken eggs collected from selected poultry farms and marketing channels. Indian Journal of Animal Sciences 78, 887-890.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling (Am Assoc Immunol), p. 6668.

## Annexes



## Questionnaires :

CIRAD

*Pôle Kappa (Qualité des produits agricoles et alimentaires)**MRST 100 Rte Rivière des Pluies 97490 Ste Clotilde**Tél: 02 62 92 24 47**Fax: 02 62 92 24 31*

## FICHE D'ENQUÊTE 1/ Décontamination

**Numéro de bande :**

Code Eleveur : ..... Zone sanitaire : ..... Date : / / 07

Effectif de la bande :

**Nettoyage Désinfection :**• *Nettoyage du bâtiment et des abords* : Oui Non

- Surfaces Nettoyées : Sol Plafond Murs

- Méthode de nettoyage : Brossage Kartcher Autre : ..... Eau Utilisée :

Détergent : Oui Non Lequel :

- Abords : Propres Sales

• *Nettoyage du Matériel* : Oui Non Méthode : Brossage Rinçage Trempage Autre :• *Première Désinfection* :

Désinfection Bâtiment : Oui Non Produits Utilisés : ..... Méthode : .....

Dates : Quantité d'eau : Quantité de désinfectant : Durée : ...

Désinfection Sol : Oui Non Produits utilisés : ..... Méthode : .....

Dates : Quantité d'eau : Quantité de désinfectant : Durée : .....

Désinfection Matériel : Oui Non Produits Utilisés :..... Méthode :.....

Dates :                      Quantité d'eau :              Quantité de désinfectant :              Durée : ....

Désinfection des silos : oui non Méthode :

Désinfection des circuits d'eau : oui non Méthode :

• **Vide Sanitaire** : Oui Non Durée : ..... Dates :

• **Deuxième Désinfection** : Oui Non Produits Utilisés :..... Surfaces : .....  
 Dates :                                      Quantité :                                      durée :

• **Utilisation de Virkon en début de bande** : oui non

• **Utilisation de Virkon en cours de bande** : oui non à quel âge :

## CIRAD

***Pôle Kappa (Qualité des produits agricoles et alimentaires)****MRST 100 Rte Rivière des Pluies 97490 Ste Clotilde**Tél: 02 62 92 24 47**Fax: 02 62 92 24 31*

## FICHE D'ENQUÊTE 2/ Fin de Bande

**Numéro de bande :**

Code Eleveur : ..... Zone sanitaire : ..... Date : / / 07

Effectif de la bande :

**- Exploitation :** fermée (Présence d'une délimitation physique) ouverte  
 Accès bétonné : oui non  
 Nombre de poulaillers dans l'exploitation : 1 2  $\geq 2$   
 Type de bâtiment : poulailler industriel poulailler « pei » Age :  
 Proximité d'autres poulaillers (autres fermes) : <500 m > 500 m  
 Existence d'une rampe bétonnée pour le chargement : oui non  
 Prêt de matériel entre exploitations : oui non Nature (tracteurs..) :  
 Production végétale concomittente : oui non Nature  
 (tomates,...) :

**- Poulailler :** nature du sol : ciment terre autre  
 Axes principaux du bâtiment/vents : perpendiculaire parallèle autre  
 Présence d'une aire de déchargement pour les intrants: oui non  
 Aire de déchargement proche de l'entrée du poulailler: oui non  
 (*sinon, préciser autre cas*)

Nature de l'aire de déchargement : bétonnée          autre (préciser)

Fumier face à l'entrée du poulailler : oui    non

**- Animaux :**

- Poussins : Tenue spécifique pour le livreur (sur-chaussures et combinaison)

Contrôle de laboratoire des poussins :          oui                  non

Situation sanitaire : *Salmonella* +                  *Salmonella* -

Densité à J1:

Traitement antibiotique à 1 jour :    oui    non    Quel Antibiotique :

- Pratique de la bande unique :

- Dans le bâtiment :                  oui                  non

- Dans l'exploitation :                  oui                  non

- Pratique de la bande multiple : oui          non    de l'élevage mixte : oui          non

- Situation sanitaire de la bande précédente : *Salmonella* +          *Salmonella* -

- Programme de prophylaxie médicale                  oui                  non

(Appliqué sous la responsabilité d'un vétérinaire)

Utilisation d'antibiotiques :    oui    non    raison :                  âge des volailles :

- Gestion des cadavres : Elevage    Evacuation    Incinération    Consommation    Autre .....

Utilisation d'un container avant élimination : oui    non

Container : >20m du poulailler          ≤ 20m du poulailler

Stockage des morts : congelé                  non congelé

**- Lutte contre les vecteurs contaminants :**

- Présence de rongeurs :                  Oui                  non    contrôle :
- Disposition des appâts ou pièges : intérieur/extérieur                  intérieur uniquement
- Présence d'autres volailles dans la ferme : oui    non    (si oui, type :.....)
- Présence d'animaux domestiques :    oui    non    lesquels :
- Etanchéité du bâtiment face aux oiseaux sauvages :    oui                  non
- Présence de ténébrions :    oui    non                  de mouches : oui    non



**- Litière :**

- Type de Litière : Copeaux de bois      Origine :      autre (préciser)
- Quantité de copeaux/ m2 :
- Litière humide par endroits :      oui      non
- Fréquence d'ajout ou de renouvellement :

**- Eau de boisson :**

- Eau utilisée : Réseau public      Eau de puits/forage      Eau de captage
- Vérification de la potabilité (si eau de puits/forage) :      oui      non
- Traitement de l'eau : oui   non   produit utilisé :      dose :      fréquence :
- Abreuvoirs utilisés : type :      Surélevés : Oui   Non
- matière :      métallique      plastique
- Souillés      propres      Fréquence du nettoyage :

Nombre de lignes de pipettes :

Nombre de plaçons :

**- Aliment :**

- Aliment utilisé : Proval      Urcoopa
- Matériel utilisé : mangeoires      trémies      Autre :
- Souillés      propres      Fréquence du nettoyage :
- Quantité :

- Nombre de silos :

**- Fumier :**

- Devenir du fumier : Elevage      Evacuation      Fosse      Autre :
- (hors poulailler)
- Contrat avec le maraîchage :      oui      non (*sinon*)

**- Personnel :**

- Type de personnel : Propriétaire      Propr. et conjoint      Propr. et employés
- Propriétaire de cannes à sucre : oui      non
- Changement de tenue du personnel : oui   non   de chaussures :      oui   non

- Fréquence d'entrée dans le poulailler / j :  $\leq 3$      $>3$  et  $\leq 4$      $>4$
- Visite fréquente d'autres éleveurs :    oui    non
- Affectation unique à un poulailler :    oui    non
- Port de vêtements spécifiques / bâtiment :    oui    non
- Port de chaussures spécifiques / bâtiment :    oui    non
- Etat des vêtements et de chaussures :    Sale    Propre
- Sas
- Existence d'un sas : oui    non    spécifique au poulailler    commun    à    plusieurs  
poulaillers
- Séparation du sas en deux parties propre et sale :    oui    non
- Présence d'un lavabo fonctionnel (eau, savon, serviette) : oui    non
- Présence de vêtements supplémentaires pour « ouvriers » éventuels : oui    non
- Interventions particulières pendant la bande :    Qui ? :    Quand ? :    Pourquoi ? :



# Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from chicken broiler flocks in Reunion Island (Indian Ocean)

Isabelle Henry<sup>a</sup>, Jef Reichardt<sup>b</sup>, Françoise Lalande<sup>c</sup>, Marianne Chemaly<sup>c</sup>, Eric Cardinale<sup>d</sup>

<sup>a</sup>CIRAD- Crête d'Or Entreprise, Sainte Clotilde, Réunion  
<sup>b</sup>Avi-pôle Réunion, Saint Louis, Réunion  
<sup>c</sup>AFSSA - HQPAP, Ploufragan, France  
<sup>d</sup>CIRAD- Crvci, Sainte Clotilde, Réunion

## Introduction

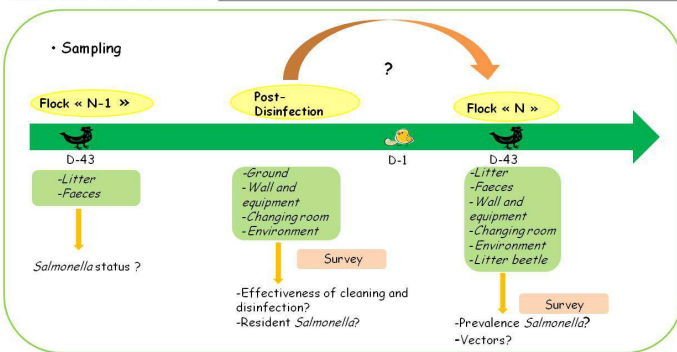
All over the world *Salmonella* causes human diseases and animal salmonellosis. Salmonellosis is one of the major causes of diarrhea in the western world. *Salmonella* in poultry have been studied many times but no epidemiological study has been undertaken in Reunion Island. Reservoirs of non-typhoid *Salmonella* in this island remain unknown as well. Reunion Island is located in the Indian Ocean, east of Madagascar and west of Mauritius. Poultry production is one of the main activity with a production of 10 tons in 2009. So meat and poultry products have to be shielded from contamination to avoid public health risks to consumers and financial problems for the poultry company. Chicken meat production is locally consumed (66% of locally production and 33% of imported frozen from France). Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and economic problem particularly because Reunion island populations eat a lot of chicken (~ 40 kg by people and by year) and cook 100% chicken sausages.

The original study aim is to determine the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in 60 chicken broiler flocks and to identify specific practices associated with presence of *Salmonella*. For that purpose, more than 1800 samples have been analyzed from the rearing period to the slaughterhouse including the time of decontamination.

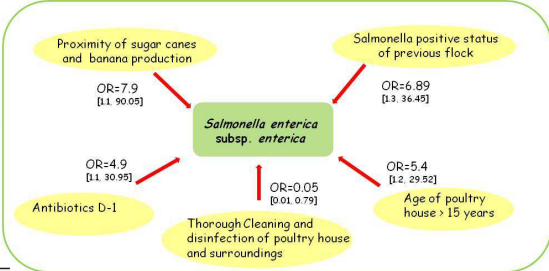
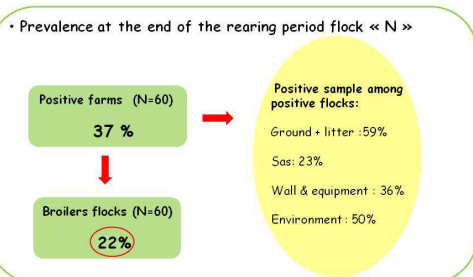
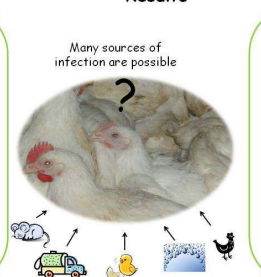
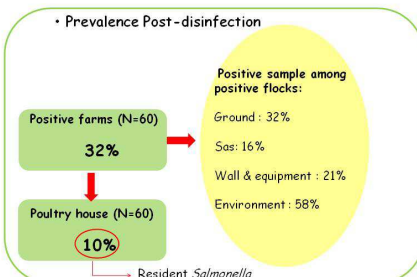


Together against *Salmonella*!

## Materials and Methods



## Results



## Discussion

• 22% of the broiler flocks were infected with *Salmonella*. Result is in conform with 23.7% prevalence generally observed in European Union. Prevalence of *Salmonella* spp. in broiler flocks is higher than in continental France.  
 • Most of risk factors identified in this study have been reported in the literature (1) but some are specific and related to conditions in Reunion Island. The original risk factor identified was the presence of sugar cane and plant fields next to poultry houses. Rodents are a legitimate problem because most of the territory is covered with sugarcane fields, natural habitats of rodents, recognized as a vehicle of *Salmonella* (2), that can be very close to poultry farms (3).  
 The age of the poultry house (> 15 years old, often built with tobaccoist drier) was often correlated with presence of porous walls that could contribute to the persistence of *Salmonella*. The administration of antibiotic drugs to one day-old chicks often used as prophylactic drugs against stress and mortality during the first day of life might reduce the number of colonized and shed bacteria (6).  
 • The results of this study indicate that poultry is a potential vector for *Salmonella* in Reunion Island so this work is necessary to provide measures to struggle against *Salmonella*.

## References

- (1) Rose et al., 1999. *Preventive Veterinary Medicine* 39 : 265
- (2) Meerschburg et al., 2006. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:960
- (3) Heccol et al., 2004. *Revue Elev. (Teres. Vie)* 59 : 283

**Acknowledgments :** We acknowledge the technicians of Avi-pôle Réunion, the farmers, Crête d'Or Entreprise for contribution to this study and thanks to Afssa Ploufragan



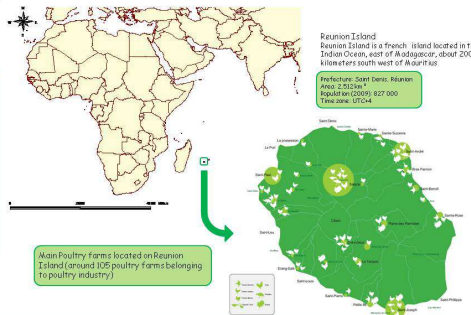
# Epidemiological diversity of *Salmonella enterica* serovars from broiler chicken flocks and human in Reunion Island (Indian Ocean) : focus on *S. Typhimurium* and *S.1,4,[5],12:i:-*

Isabelle Henry<sup>a</sup>, Marianne Chemaly<sup>b</sup>, Sophie Granier<sup>c</sup>, Céline Courtillon<sup>b</sup>, Françoise Lalande<sup>b</sup>, Gilles Salvat<sup>b</sup>, Eric Cardinale<sup>d</sup>

<sup>a</sup>CIRAD - Crête d'Or Entreprise, Sainte Clotilde, Réunion  
<sup>b</sup>AFSSA - HQPAP, Ploufragan, France  
<sup>c</sup>AFSSA - CEB, Maisons-Alfort, France  
<sup>d</sup>CIRAD - Crvoi, Sainte Clotilde, Réunion

## Introduction

*Salmonella* causes human diseases and salmonellosis in animals worldwide. Salmonellosis is one of the major causes of diarrhea in the northern world. *Salmonella* in poultry have been studied many times but no epidemiological study has been undertaken in Reunion Island. Reservoirs of non-typhoid *Salmonella* in this island remain unknown as well. Reunion Island is located in the Indian Ocean, east of Madagascar and west of Mauritius. Reunion Island is a region of France. Chicken meat production is locally consumed (66% of locally production and 33% of imported frozen from France). Contamination of chicken with *Salmonella* is a public health and economic problem particularly because Reunion island populations eat a lot of chicken (40 kg by person and by year) and chicken sausages. This study aims to investigate the diversity of *S. enterica* Typhimurium and *S.1,4,[5],12:i:-* in human strains, in chicken strains and strains isolated from farms and slaughterhouse's environment by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and antibiotic susceptibility in order to determine potential infectious sources.



## Materials and Methods

**Strains : 161 *S. Typhimurium* and 18 *S.1,4,[5],12:i:-* strains were considered :**  
 - 139 strains from farm's environment (surrounding wall and equipment, floor, changing room) from slaughterhouse's environment (transport crates, before and after defeathering, before and after clamping plan, evisceration steps, scalding water, intestines, neck skin, rinse carcasses, at the cutting plan, on utensils and from sausages), from broilers and other poultry, pigs and rodents were isolated and analyzed.  
 - 40 isolates collected from human salmonellosis cases. Human strains were provided by the French National Reference Center for *Salmonella*.  
**PFGE typing**  
 The genetic typing was carried out by RFLP-PFGE after *Xba*I restriction (1). The *Salmonella*/BroenderupH9812 strain was used as molecular size marker.  
**Analyzes of the genetic profiles**  
 Patterns analyses were performed by using the BioNumerics software (V 5.1, Applied Maths, Belgium). The similarities between profiles, based on the position of the restricted fragments, were calculated using the coefficient of Dice with a maximum tolerance of 1%. Dendrograms were built according to the UPGMA Method using an arithmetic mean. The Simpson's index was calculated to estimate the diversity of the sample.  
**Antimicrobial susceptibility tests**  
 Antibiotic susceptibility was determined by disc diffusion method with 16 antimicrobial drugs (Bio-Rad) following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). Automatic readings have been performed by OSIRIS system (BioRad).

## Results

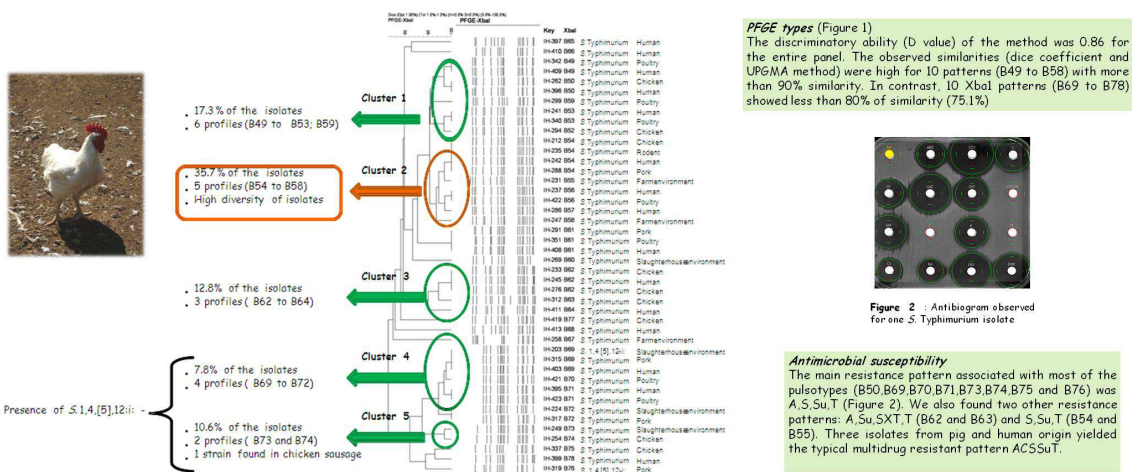


Figure 1 : Dendrogram showing the 30 PFGE-XbaI patterns and the origin with these patterns

## Discussion

*S. Typhimurium* is able to infect many hosts, including monogastric species, poultry (chicken, duck, turkey, guinea fowl, goose) and pigs, but also small mammals as rodents (2). *Salmonella* were typed with a method still considered as a gold standard. Use of PFGE with endonuclease *Xba*I has been recognized as a sensitive means for fingerprinting *Salmonella* serovars (3) and particularly for *S. Typhimurium*. In our study, different PFGE patterns have been established for *S. Typhimurium* and *S.1,4,[5],12:i:-* serovars from chicken and many other sources within a window of 75.1% of similarity. In spite of this close relationship, it was possible to divide the isolates into five clusters with 2 main ones. These clusters showed around 90% of similarity. This high level of similarity suggested, at least, the introduction of two different clones that could have come from importation of feedstuff, parents stocks, hatching eggs or one-day old chicks from France or from South East Asia. The main pulsotype counted for 33% of all isolates; it shared isolates from many sources as poultry house, slaughterhouse, other animal species (poultry, pigs, rodents), environment and humans suggesting that this pulsotype had already colonized all steps of the food chain. The same pulsotypes of *Salmonella* had been recovered from different animal species; we are in a tropical island where all the farms (pigs, poultry farms...) are concentrated on a small area and exchanges of organic material and pathogens are always possible between all these farms. In Reunion Island an atypical *S.1,4,[5],12:i:-* emerged few years ago and it is certainly a monophasic isolate of *S. Typhimurium*. Multidrug resistance was generally observed in *Salmonella* Typhimurium (4) but in this study, only three isolates, one from human and two from pigs presented the specific profile ACSSuT. Thus, many sources of infection of *S. Typhimurium* exist and it is not always possible to determine specific ways of transmission.

## References

(1) Kerevantou et al, 2007. *Foodborne pathogens and disease* 4: 293-303  
 (2) Meerburg et al, 2006. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 960-962  
 (3) Liebana et al, 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3609-3616  
 (4) Bertrand et al, 2006. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2897-2903

**Acknowledgments :** We acknowledge Avi-pôle Réunion, the farmers, Crête d'Or Entreprise , AFSSA and François Xavier Weill from Pasteur Institute for their contribution to this study