

Résumé de thèse de doctorat

Mise au point et validation de méthodes de surveillance et de prévention de *Salmonella* dans une filière porcine intégrée

Setting up and validation of surveillance and prevention methods of Salmonella in an integrated pork production system

CANDIDAT : Nicolas Korsak Koulagenko

PROMOTEUR : Professeur G. Daube

CO-PROMOTEUR : Professeur A. Clinquart

Département et Service

Département des Sciences des Denrées alimentaires, service de Microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 20 avril 2005

Composition du Jury

• MEMBRES EXTÉRIEURS À LA FACULTÉ :

Professeur C. Debouche, FUSAGx, Belgique

Professeur P. Colin, AFSSA, France

Professeur L. de Zutter, Universiteit Gent, Belgique

• MEMBRES INTERNES À LA FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE :

Professeur A. Clinquart, Professeur G. Daube, Professeur J. Mainil, Professeur B. Nicks, Professeur F. Rollin, Professeur E. Thiry, Professeur H. Vindevogel

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Maîtriser les productions animales est un défi du XXI^e siècle. L'agriculture européenne doit répondre à l'autosuffisance et fournir des produits de qualité irréprochable. La prévention et la lutte contre les salmonelles en filière porcine peuvent s'inscrire dans ce contexte, le consommateur exigeant une viande de qualité et saine.

Les objectifs de ce travail sont :

1. **estimer les prévalences à différents stades de la filière étudiée et évaluer le niveau de contamination des eaux résiduaires d'une station d'épuration** traitant les effluents provenant de plusieurs entreprises agro-alimen-

taires ;

2. **amélioration des techniques de détection ;**
3. **étude de la problématique du portage sain chez les porcs ;**
4. **évaluation de l'intérêt de la sérologie dans la prévention.**

Onze exploitations d'engraissement, une ferme d'élevage, une ferme en circuit fermé et une unité de rassemblement des porcelets sevrés constituent la filière suivie.

La première étude décrit les prévalences observées à différents stades d'une filière de production porcine : aliments pour animaux, matières fécales collec-

tées en élevage et en engraissement, contenus du gros intestin prélevés à l'abattoir, écouvillonnages de carcasses et viandes de porc prélevées en atelier de découpe-hachage et prélevées dans des boucheries. Les échantillons ont été analysés simultanément au moyen de deux méthodes : SP-VG-M002 et une technique commerciale (en kit) dont le principe repose sur l'amplification génétique de séquences propres aux salmonelles

L'étude 2 rapporte 2 années de surveillance de *Salmonella*. Un plan d'échantillonnage a été mis au point pour couvrir l'entièreté des stades de production. Le sérotypage et l'évaluation de la résistance à 6 antibiotiques ont été réalisés sur les souches isolées.

L'étude 3 vise à déterminer l'efficacité d'une station d'épuration industrielle par la détermination rapide et semi-quantitative de la présence de *Salmonella*.

Dans **l'étude 4**, des échantillons ont été collectés en écouvillonnant des zones bien définies au niveau des carcasses de porcs et de bovins (160 à 420). Les écouvillons provenant de cinq demi-carcasses ont constitué un seul échantillon à soumettre à l'analyse.

Etude 5 quatre techniques analytiques ont été comparées entre elles quant à leur efficacité de détection de *Salmonella* spp. dans des échantillons fécaux (NMKL 71, SP-VG-M002, VIDAS SLM & VIDAS ICS).

Etude 6 vingt porcs ont été suivis en exploitation et à l'abattoir afin d'évaluer le taux de portage en *Salmonella*.

Etude 7 l'intérêt d'une technique sérologique a été investigué dans 91 lots issus de 9 exploitations porcines. Les prélèvements pour la bactériologie ont été effectués en engraissement. Le test sérologique a été appliqué sur des échantillons de jus de viande. Ses performances du test sérologique ont été évaluées en choisissant la méthode microbiologique comme référence.

Etude 8 L'aptitude d'une technique sérologique a été étudiée à partir de résultats provenant de 9 unités d'engraissement de porcs. Des matières fécales et des surchaussures ont été collectées en engraissement alors que les contenus cæcaux ont été prélevés en abattoir. Le but de cet essai était d'établir une corrélation entre les résultats sérologiques obtenus à l'abattoir et les résultats bactériologiques. Deux types de modèles de régression logistique ont été.

RÉSULTATS

Etude 1 : des niveaux de contaminations compris entre 4,5 et 6,2 % ont été constatés pour les stades de l'élevage et de l'engraissement. Les aliments pour porcs étaient plus contaminés que ce qui était rapporté dans la littérature et un pic important de contamination a été observé à l'abattoir

(50,7 %). Dans les stades ultérieurs, les taux de contamination étaient en décroissance depuis 17,2 % pour les carcasses jusqu'à 13 % pour les viandes échantillonnées dans les boucheries.

Etude 2 : les aliments pour porcs ont présenté un niveau de contamination plus élevé que prévu (10,2 %). Le pourcentage d'échantillons positifs chez les truies gestantes (8,1 %) a été significativement supérieur à celui observé pour les cochettes et les truies en lactation (2,9 %). Le pourcentage d'échantillons positifs pour les contenus du côlon prélevés sur la chaîne d'abattage (47,3 %) a été significativement plus élevé que le pourcentage de positifs dans les matières fécales collectées en exploitation, durant l'engraissement (5,6 %). Pour les écouvillonnages de carcasses, la prévalence était de 11,2 %. Les surchaussures effectuées dans les exploitations ont permis la détection d'un plus grand nombre de salmonelles que les matières fécales. *Salmonella* Typhimurium a été le sérotype le plus fréquemment isolé tandis que *S. Brandenburg* était prédominant dans les contenus du côlon prélevés à l'abattoir. Les aliments pour porcs avaient une diversité importante de sérotypes d'une importance épidémiologique mineure. Sur 55 isolats de *Salmonella* Typhimurium, 11 étaient résistants à la tétracycline, à l'ampicilline, à la streptomycine, au triméthoprim et à l'acide nalidixique, 12 étaient résistants à tous ces antibiotiques, à l'exception de l'acide nalidixique. La majorité des souches qui présentaient ce profil de résistance appartenaient au lysotype DT104 ou apparenté.

Etude 3 : un abattoir porcin fut la principale source de contamination avec un niveau moyen de contamination de plus de 10^3 salmonelles/ml proche de celui du mélange des eaux en entrée d'épuration. La station, basée sur un procédé d'épuration biologique, a permis de réduire le niveau de contamination dans les eaux sortantes à moins de 1 salmonelle/ml, soit un taux de réduction de 4 logarithmes décimaux. C'est principalement dans le clarificateur que s'opère la réduction par adsorption des bactéries sur les matières en suspension. Le niveau moyen des salmonelles dans les boues

fraîches s'élève à 10^2 salmonelles/g. Lors du suivi microbiologique mensuel de deux tas de boues disposés en bordure de champs au début du mois de décembre 1999, sept mois ont été nécessaires avant de ne plus pouvoir isoler de salmonelles dans 25 g.

Etude 4 : *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. et *E. coli* producteurs de vérocytoxines ont été détectés dans 27, 2, 2 et 14 % des échantillons (porcs) et dans 0, 22, 10 et 5 % des échantillons (bovins). Pour *E. coli* O157, seulement un échantillon avait permis l'isolement d'une souche entérohémorragique. Les plans d'échantillonnage dans les abattoirs devraient inclure *Salmonella* spp. dans le cas du porc et *Listeria monocytogenes*, dans le cas du bovin.

Etude 5 : Sur 78 échantillons qui ont été testés simultanément, 34 échantillons ont été positifs avec au moins une technique analytique. La méthode VIDAS SLM a permis de détecter *Salmonella* spp. dans 31 échantillons (91,2 %) alors que le pourcentage cumulé pour les trois autres méthodes était de 37,3 %. Des comparaisons paires ont été effectuées avec la méthode VIDAS SLM. La proportion d'agrément était significativement plus faible pour la comparaison VIDAS ICS vs. VIDAS SLM (68,7 %) que dans le cas des deux autres comparaisons paires (pourcentage moyen de 81,5 %).

Etude 6 : aucun échantillon ne s'est révélé positif mais, à l'abattage, l'analyse des amygdales et de certaines parties du tube digestif a établi que 70 % des porcs étaient contaminés sur la chaîne d'abattage. Les souches isolées dans le contenu du côlon et dans les amygdales étaient souvent du même sérotype, ce qui pourrait indiquer une contamination orale *in vivo* à partir des matières fécales, des contaminations croisées à l'abattoir ou un portage des mêmes souches dans plusieurs organes. Les ganglions mésentériques positifs (40 %) sont contaminés par des souches différentes de celles des matières fécales et des amygdales. Une étude complémentaire a permis de mettre en évidence le rôle négatif de l'épileuse

Etude 7 : des corrélations ont été effectuées en classant les résultats de

densité optique des échantillons par rapport à différentes valeurs de cut-off correspondant à quatre niveaux de concentration en anticorps anti-salmonelles. Quarante-huit possibilités de catégoriser positivement un lot ont été établies en fonction du pourcentage d'échantillons dépassant les valeurs de cut-off et en fonction des moyennes arithmétique et géométrique. Les résultats ont montré que les valeurs prédictives du résultat négatif de la sérologie étaient comprises entre 52,8 et 100 %. Par contre, la sensibilité relative variait entre 4,5 et 100 %. Un type de classement sérologique des lots s'est révélé le meilleur car il permettait de maximiser les valeurs Kappa, prédictives du résultat négatif et de sensibilité relative : 50 % des échantillons avec une valeur de densité optique supérieure au cut-off 20 %.

Etude 8 : bien que les modèles montraient une faible corrélation, il a été possible de mettre en évidence que le fait de détecter des salmonelles dans des surchaussures échantillonnées aux stades de 2 et 3 mois d'engraissement était significativement corrélé avec le statut sérologique des lots (Odds-ratios de 4,96 et de 2,55). Les résultats positifs en sérologie avaient une influence positive sur la probabilité de détecter des *Salmonella* dans les contenus cœcaux (Odds-ratios compris entre 4,36 et de 5,81).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a montré les points de la chaîne de production où des mesures de contrôle doivent être mises en place (étude 1) et notre système de surveillance s'est révélé efficace pour identifier les endroits de contamination majeurs dans la chaîne de production et sera indispensable dans le cadre d'efforts continus pour développer une filière de production porcine indemne de salmonelles (étude 2).

Le risque direct pour la santé animale et humaine suite à l'épandage d'engrais organiques est faible. Cependant, les boues d'abattoir de mammifères représentent le danger le plus élevé pour les animaux d'élevage mais globalement le risque n'est pas supérieur à celui lié à l'épandage des effluents d'élevage. D'après des études épidémiologiques, il y a très peu de risques liés à *Salmonella* spp. lorsque

les recommandations d'épandage sont respectées. L'absence de problèmes notables depuis que la valorisation agronomique est pratiquée avec les règles actuelles est extrêmement rassurante. L'amélioration progressive des règles sanitaires, des conditions d'assainissement (augmentation du niveau global d'épuration, traitement des boues,...) et des épandages permettent de penser que la situation évolue sans cesse plus favorablement. Des études expérimentales complémentaires sur l'évolution de la charge en salmonelles des boues et lisiers sous différentes conditions de conservation ou de traitement devraient être menées pour établir des guides adaptés avec des critères à atteindre.

A partir de ces résultats, un programme national de surveillance bactériologique des stations d'épuration devrait être instauré afin d'évaluer la qualité des eaux en fin de processus d'épuration ainsi que des boues d'épuration après traitement stabilisant mais avant épandage (étude 3).

Etant donné que *Salmonella* spp. est le contaminant principal chez le porc (27 %) et que *Listeria monocytogenes* est le plus prévalent chez le bovin (22 %), les plans d'échantillonnage dans les abattoirs devraient inclure *Salmonella* spp. dans le cas du porc et *Listeria monocytogenes*, dans le cas du bovin. Dans les abattoirs de porcs et de bovins, il serait également utile de tester la présence de *Campylobacter* spp. et d'*E. coli* producteurs de vérocytoxines. La méthode présentée dans cet article est simple à mettre en œuvre et permet d'évaluer le taux de contamination des carcasses en fin de processus d'abattage (étude 4).

La conclusion de l'étude 5 est que la méthode VIDAS SLM améliore la détection des salmonelles présentes dans des échantillons naturellement contaminés par des matières fécales de porcs.

L'étude 6 a démontré la difficulté de prédire le risque de contamination à l'abattoir à partir des analyses de matières fécales lors de l'engraissement.

L'étude 7 a montré la pertinence d'une classification sérologique des lots à l'abattoir en vue d'établir une surveillance complémentaire en exploitation.

Une conclusion importante de l'étude 8 est que la sérologie peut être

utilisée pour suivre l'évolution d'une filière porcine intégrée, mais elle n'est pas une solution unique pour évaluer le risque d'excrétion de salmonelles dans des troupeaux porcins.

La problématique des *Salmonella* spp. en filière animale, quelle que soit la spéculation envisagée, apparaît simple. De nombreux guides et ouvrages y ont été consacrés et, en théorie, il semble aisé de s'en débarrasser ou d'empêcher son introduction dans un élevage ou dans un atelier d'engraissement. En pratique, toutefois, la situation est différente et il est constaté que le micro-organisme peut contaminer la chaîne alimentaire en de multiples endroits, que ce soit au stade de la production primaire, dans le secteur abattage et transformation ou bien chez le consommateur. Si les méthodes de prévention sont si simples, la question peut alors être posée de savoir pourquoi ces mesures ne sont pas mises en œuvre par le monde agricole ou les intervenants intéressés dans le secteur de l'abattage ou de la transformation. Nous pensons qu'il existe une méconnaissance de l'écologie des salmonelles et des facteurs de contamination les plus pertinents à envisager dans le cadre de la lutte envers cet agent zoonotique. Un autre point important à considérer est le manque d'intérêt des agriculteurs pour l'établissement d'une filière indemne de *Salmonella*. En effet, les mesures qui leur sont proposées sont souvent perçues comme contraignantes et ne menant *in fine* à aucun bénéfice réel et substantiel au niveau de leur pratique quotidienne, que ce soit sur le plan financier ou bien dans le sens d'un allègement de leur travail.

Pour arriver à développer une filière porcine « *Salmonella*-free », il faut une collaboration complète de tous les acteurs d'une filière, ce qui signifie qu'elle doit être intense et soutenue dans le temps. Il s'agit en effet d'un combat de tous les instants, le germe étant réputé opportuniste, profitant de toutes les voies d'entrée possibles pour contaminer la chaîne alimentaire. En plus d'être appuyée et continue, la lutte doit être organisée et planifiée, à l'instar de ce qui s'est fait au Danemark, pays de référence en matière de surveillance des salmonelles en filières de productions animales, et où une seule fédération porcine (*Danish Bacon and Meat Council*) qui regroupe environ 95 % des producteurs danois, a pris cette lutte en main

et en a fait son fer de lance. Cette fédération a été quelque peu aidée par le Gouvernement au début de la réalisation du programme mais fonctionne, à l'heure actuelle, quasiment de façon autonome (Wegener *et al.*, 2003). Le plan de surveillance doit intéresser également tous les intervenants de la chaîne agro-alimentaire, depuis « la fourche jusqu'à la fourchette », de « l'étable à l'étal » : les fabricants d'aliments pour animaux, les éleveurs, les engraisseurs, le personnel s'occupant des animaux, les transporteurs, les abatteurs, les distributeurs... Le plan de lutte et de surveillance doit prévoir un système financier, destiné soit à pénaliser les intervenants qui ne réalisent pas l'objectif énoncé dans le plan (ex : pénalité pour les éleveurs ayant une prévalence trop élevée) ou bien, ce qui peut être beaucoup plus valorisant pour le secteur agricole, à récompenser, via un système de primes, les personnes ayant effectué un bon travail, ce qui a permis au plan de réaliser ses objectifs. Nous pensons que cette dernière possibilité est de loin profitable à l'entièreté du sys-

tème, notre conviction étant que, dans une société organisée, il faut toujours mieux renforcer les comportements positifs en les mettant en évidence plutôt que de rappeler sans cesse les fautes et autres manquements.

Malgré les connaissances déjà amassées depuis plus d'un siècle sur ce micro-organisme, beaucoup d'inconnues subsistent au niveau fondamental. Parmi les questions ou problèmes à résoudre, il peut être fait mention des suivant(e)s :

- Pourquoi, dans un élevage ou bien dans une entreprise agro-alimentaire, une souche de salmonelles s'implante-t-elle plus facilement qu'une autre ?
- Comment expliquer de façon claire et définitive le pic de contamination observé à l'abattoir ?
- Quel est le rôle de l'abattoir en termes de contamination finale des carcasses ?
- La sérologie est-elle un bon outil d'investigation du statut « Salmonella » d'un lot de porcs ou d'une exploitation ? Ne doit-

on pas améliorer les techniques microbiologiques classiques de détection des salmonelles (surtout pour les échantillons collectés au niveau de la production primaire) ?

- Quelle est la liaison entre les niveaux de contamination des viandes de porc et le nombre de cas humains de salmonelloses ?

Remerciements

Je tiens à remercier le Ministère de la Région wallonne (Direction générale de l'Agriculture) et le Ministère Fédéral de l'Agriculture et des Petites Entreprises pour leur soutien financier au projet intitulé « Recherche d'un méthodologie pour la mise en place d'une filière intégrée de production de viande porcine *Salmonella*-free », qui a débuté en février 1999. Je suis redevable également à E. Flament et J.P. Detry, qui a autorisé la collecte des échantillons dans les fermes suivies et à la société Sanofi-diagnostic Pasteur nouvellement intégrée dans la société Bio-Rad.

RÉFÉRENCES

- WEGENER H., HALD T., LO FO WONG D., MADSEN M., KORSGAARD H., BAGER F., GERNER-SMIDT P., MOLBAK K. *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9**, 774-780.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- KORSAK N., DAUBE G., GHAFIR Y., CHAHED A., JOLLY S., VINDEVOGEL H. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine belgian abattoirs. *J. Food Prot.*, 1998, **61**, 535-541.
- KORSAK N., GROVEN B., JACOB B., FLAMENT E., DAUBE G. Prevalence of *Salmonella* along a meat pork production system. In : Smulders F.J.M., Collins J.D. (eds.) Food safety assurance and veterinary public health – volume 1 – Food safety assurance in the pre-harvest phase. Wageningen, The Netherlands, 2002, 260-262.
- JACOB B., KORSAK N., GROOVEN B., FLAMENT E., DAUBE G. Incidence d'une station d'épuration biologique sur le niveau de contamination en salmonelles des eaux et des boues résiduaires. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 303-310.
- BOUDRY C., KORSAK N., JACOB B., ETIENNE G., THÉWIS A., DAUBE G. Ecologie de *Salmonella* dans le tube digestif du porc à l'abattage et étude de la contamination des carcasses. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 353-360.
- KORSAK N., JACOB B., GROVEN B., ETIENNE G., CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G. *Salmonella* contamination of pigs and pork in an integrated pig production system. *J. Food Prot.*, 2003, **66**, 1126-1133.
- KORSAK N., LEROY B., ETIENNE G., DEGEYE J.-N., CLINQUART A., DAUBE G. Comparaison des analyses sérologiques et bactériologiques de détection des salmonelles dans le suivi sanitaire d'exploitations porcines. *Journées de la Recherche Porcine*, 2004, **36**, 315-322.
- KORSAK N., DEGEYE J.-N., ETIENNE G., CHINA B., DAUBE G. Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in faecal samples of porcine origin. *J. Food Prot.*, 2004, **67**, 2158-2164.
- KORSAK N., DEGEYE J.-N., ETIENNE G., BEDUIN J.-M., CHINA B., GHAFIR Y., DAUBE G. Use of a serological approach for prediction of *Salmonella* status in an integrated pig production system. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, **108**, 246-254.
- KORSAK N., CLINQUART A., DAUBE G. *Salmonella* spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ? *Ann. Méd. Vét.*, 2004, **148**, 174-193.