



HAL
open science

Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles

Yves Millemann

► **To cite this version:**

Yves Millemann. Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles. *Veterinary Research*, 1998, 29 (1), pp.3-19. hal-00902507

HAL Id: hal-00902507

<https://hal.science/hal-00902507>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Article de synthèse

Les marqueurs épidémiologiques des salmonelles

Yves Millemann

Laboratoire d'écopathologie microbienne, Station de pathologie aviaire et parasitologie,
Centre de recherche Inra de Tours, 37380 Nouzilly, France

(Reçu le 23 juillet 1997 ; accepté le 25 septembre 1997)

Abstract – Epidemiological markers of *Salmonella*. Salmonellae are enterobacteria responsible for outbreaks of human and animal clinical diseases, with important hygienic and economic consequences. Accurate epidemiological studies require the use of efficient markers, which make it possible to trace the establishment and diffusion of different bacterial strains and also to evaluate the similarities between different isolates. Numerous phenotypic and genotypic markers applicable to *Salmonella* are available for these epidemiological studies. Nevertheless, the relative interest of those markers depends on the serotypes, and a different hierarchy can be achieved for the Typhimurium and Enteritidis serotypes. © Inra/Elsevier, Paris

***Salmonella* / epidemiology / phenotypic marker / genotypic marker**

Résumé – Les salmonelles sont des entérobactéries responsables d'épisodes cliniques chez l'homme et l'animal, avec d'importantes conséquences d'ordre hygiénique et économique. La réalisation d'études épidémiologiques minutieuses nécessite des marqueurs performants, permettant de suivre l'implantation et la diffusion d'une souche bactérienne, mais également de définir le degré de parenté entre différentes souches. Des marqueurs phénotypiques et génotypiques applicables aux salmonelles sont disponibles pour ces études épidémiologiques. L'intérêt relatif de ces marqueurs varie selon le sérotype considéré, et la hiérarchisation est ainsi différente pour les sérotypes Typhimurium et Enteritidis. © Inra/Elsevier, Paris

***Salmonella* / épidémiologie / marqueurs phénotypiques / marqueurs génotypiques**

Présente adresse : Pathologie du bétail, Legsa, DPASA, École nationale vétérinaire d'Alfort,
94704 Maisons-Alfort cedex, France
Tél. : (33) 1 43 96 71 24 ; fax : (33) 1 43 96 70 24 ; courriel : millemann@vet-alfort.fr

1. Introduction.....	4
2. Marqueurs phénotypiques.....	5
2.1. Sérotypes.....	5
2.2. Biotypes.....	5
2.3. Lysotypes.....	6
2.4. Bactériocinotypes.....	7
2.5. Antibiotypes.....	7
3. Marqueurs génotypiques.....	8
3.1. Plasmides.....	8
3.2. Profils de restriction de l'ADN génomique.....	9
3.2.1. Électrophorèse directe : <i>restriction endonuclease analysis</i> et pulsotypes.....	9
3.2.2. Utilisation de sondes.....	10
3.2.2.1. Ribotypes.....	10
3.2.2.2. « IStypes ».....	10
3.2.2.3. Autres sondes.....	11
3.3. Profils d'amplification de l'ADN génomique (PCR-types).....	12
3.3.1. Amplification au hasard de l'ADN : RAPD.....	12
3.3.2. Amplification spécifique à partir de séquences répétées (rep-PCR).....	13
3.3.3. PCR ribotypie.....	14
4. Conclusion.....	14

1. INTRODUCTION

Les salmonelles sont des bacilles aéro-anaérobies Gram-négatifs, hôtes facultatifs du tractus digestif et potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* [48]. Le genre *Salmonella* comprend deux espèces génomiques, définies d'après de récents travaux d'hybridation ADN/ADN : les noms proposés pour ces deux espèces sont *Salmonella enterica* [47] et *Salmonella bongori* [87]. L'espèce *S. enterica* peut être subdivisée en six sous-espèces, dont la plus couramment isolée chez l'homme et l'animal est *S. enterica* subsp. *enterica*, [14] seule sous-espèce au sein de laquelle des noms sont donnés aux sérotypes.

La contamination par les salmonelles a d'importantes conséquences à la fois pathologiques, hygiéniques et économiques, d'une part en raison des pertes induites par la pathologie animale et/ou humaine et d'autre part en raison du coût lié aux mesures de contrôle des contaminations par *Salmonella*. Le coût annuel des infections à *Salmonella* est estimé à 1 à 2 milliards de dollars aux États-Unis, à 100 millions de marks en Allemagne et à 350 à 500 millions de livres sterling en Angleterre et au Pays de Galles [96, 89]. Aucune étude de ce type n'a été menée à ce jour en France.

La lutte contre ces bactéries, ubiquistes et souvent multirésistantes aux antibiotiques, est d'autant plus difficile que le portage sain de salmonelles est fréquent, chez les volailles comme chez d'autres

espèces animales, qui constituent ainsi le réservoir animal des infections humaines [55].

Des enquêtes épidémiologiques minucieuses et approfondies sont indispensables pour définir au mieux les grands axes de lutte et mettre en évidence les faiblesses des moyens de lutte utilisés [39]. Pour suivre l'implantation et la diffusion d'une souche bactérienne, l'épidémiologiste a besoin d'outils performants. Les marqueurs épidémiologiques sont des critères permettant de faire la preuve du rôle étiologique d'un microorganisme dans une épidémie, ou, par extension, de suivre la diffusion géographique d'une souche et de mettre en évidence la persistance de certaines souches dans l'environnement. Ces marqueurs doivent être discriminants, pour distinguer souches épidémiques et souches non épidémiques, et stables dans le temps. La méthode de mise en évidence du marqueur doit de plus être reproductible et aisément applicable.

L'ensemble des caractères phénotypiques et génotypiques utilisés permet de déterminer le degré de similarité des souches et de réaliser un dendrogramme. Les lignées clonales ainsi mises en évidence regroupent des bactéries ayant d'importantes similitudes phénotypiques et génotypiques, qui permettent de poser l'hypothèse d'un ancêtre commun proche [78].

Nous allons dans cette revue décrire les différentes approches de caractérisation utilisables dans des enquêtes épidémiologiques et nous efforcer de les hiérarchiser en fonction de leur intérêt, particulièrement pour *Salmonella* Typhimurium (STm) et *Salmonella* Enteritidis (SE). Nous décrirons d'abord les marqueurs phénotypiques, qui reposent sur des caractères exprimés par les bactéries, puis les marqueurs génotypiques reposant sur le matériel génétique des souches.

2. MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES

2.1. Sérotypes

La classification des salmonelles en sérotypes repose sur la diversité des antigènes O (lipopolysaccharide) et H (protéine flagellaire) selon le schéma de Kauffmann et White [48]. À ce jour, 2 422 sérotypes sont reconnus, dont 1 427 dans la sous-espèce *enterica* [83].

La sérotypie permet d'évaluer l'importance de certains sérotypes ou de suivre l'évolution de la fréquence d'isolement de sérotypes particuliers impliqués dans les toxi-infections alimentaires. C'est ainsi que, depuis 1987, l'augmentation de l'incidence des infections déterminées par *S. enteritidis* dans le monde a été soulignée [11, 90]. Les sérotypes retrouvés chez l'animal et chez l'homme peuvent être comparés [34].

Un grand nombre de sérotypes ne sont que rarement isolés chez l'homme et chez l'animal, et ne sont donc pas importants sur le plan épidémiologique. À l'inverse, les sérotypes Typhimurium et Enteritidis sont responsables chaque année à eux seuls de plus de 70 % des salmonelloses humaines en France (*tableau I*). La subdivision de ces sérotypes d'importance clinique est donc indispensable pour les enquêtes lors d'épidémies à *Salmonella*.

2.2. Biotypes

Leur détermination est basée sur des réactions biochimiques caractéristiques du genre *Salmonella*. La subdivision de *Salmonella* en espèces et sous-espèces est faite en fonction de la réponse à certains tests biochimiques tels que fermentation du dulcitol, du lactose, présence de gélatinase. Au sein de l'espèce *enterica*, six sous-espèces ont ainsi été définies.

Tableau I. Répartition (%) des foyers déclarés de TIAC à salmonelle en France selon le sérotype (1989-1993).

Année	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Autres sérotypes	Références
1989	61	24	15	[35]
1990	51	31	18	[80]
1991	58	28	14	[54]
1992	57	15	28	[53]
1993	58	19	23	[49]
1994	65,5	14	20,5	[79]
1995	62	15	23	[29]

La détermination des caractères biochimiques est également utilisée dans des études épidémiologiques. Un système automatisé de lecture de 16 réactions biochimiques a ainsi permis de définir 51 biotypes parmi 100 souches de sérotype Typhimurium non reliées et appartenant à seulement 24 lysotypes [40], et 23 biotypes dans une collection de 86 souches de sérotype Enteritidis [41].

La technique est simple et les approches sont empiriques. La discrimination apportée par biotypie n'est cependant en général pas très importante. Ainsi, Jacob et al. [38] n'ont détecté que trois biotypes au sein de 597 STm isolées de bovins en Allemagne. McDonough et al. [61] ont mis en évidence sept biotypes parmi 78 STm sur la base de 17 tests biochimiques ; dans cette étude, la biotypie, associée à la lysotypie, a permis de souligner la fréquence et la diffusion de certains clones majeurs et de souligner la parenté de deux lysotypes.

Une étude portant sur 318 SE n'a permis de détecter que six biotypes à l'aide d'une batterie de 30 tests biochimiques, le biotype majoritaire étant de plus rencontré dans près de 99 % des souches [82]. Plus récemment, Stubbs et al. [101] ont détecté trois biotypes parmi 30 SE PT8, deux souches seulement étant discriminées.

Dans notre travail, nous avons mis en œuvre 23 tests biochimiques. Les 56 STm ont été discriminés en quatre biotypes mais ne différaient les uns des autres que par un seul caractère, et 29 souches présentaient le biotype majoritaire. Une seule souche de SE sur 14 étudiées présentait un biotype original [65].

2.3. Lysotypes

La lysotypie étudie la sensibilité des souches à une série de bactériophages sélectionnés. La plupart des bactériophages sont sauvages, isolés d'eaux d'égout, mais ils peuvent aussi provenir de bactéries lysogéniques. Plusieurs schémas internationaux de lysotypie ont été développés, comme les schémas de Colindale, ou de l'Institut Pasteur [1, 115], pour Typhimurium ou Enteritidis. Les souches de sérotype Enteritidis les plus fréquemment isolées en France sont de lysotype 33 dans le schéma de Vieu utilisé à l'Institut Pasteur, qui semble correspondre au phage type 4, ou PT4, dans le schéma de Ward. Cette méthode nécessite une main-d'œuvre experte et est généralement réservée aux centres de référence.

La lysotypie peut être une méthode de choix pour des études épidémiologiques de *Salmonella* Typhimurium ou Enteritidis, où elle peut être très discriminante, reproductible, rapide. Elle constitue une

étape incontournable lors de la survenue de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) humaines. En effet, la lysotypie a permis de mettre en évidence la répartition mondiale de certains lysotypes tels SE PT4 en Europe et SE PT8 en Amérique du Nord pour Enteritidis [8, 31, 90]. Plus récemment, l'émergence d'un lysotype DT104 de STm, multirésistant aux antibiotiques, a été relevée dans les TIAC aux États-Unis, en Allemagne et en Grande-Bretagne [113]. La majorité des souches isolées appartenant à un faible nombre de lysotypes, des méthodes permettant de discriminer des souches d'un même lysotype sont donc à rechercher.

La lysotypie a été également utilisée pour séparer des souches de Typhimurium isolées dans trois fermes avicoles, avec cinq lysotypes dont un seul représentait 88 % des souches étudiées [2]. En Allemagne, sur une période de 17 ans, 21 lysotypes ont été détectés parmi 597 STm isolées de bovins, un nombre limité d'entre eux dominant à certaines périodes [38]. Des lysotypes de SE peuvent en outre être associés à un hôte particulier, homme ou animal notamment, même lorsque la majorité des souches est regroupée dans deux lysotypes : PT8 et PT13a [91].

Le problème de la stabilité se pose parfois, le lysotype pouvant être modifié après acquisition d'un plasmide [22, 106, 88] ou d'un phage [86], ou par modification du lipopolysaccharide (LPS) [3, 13].

Dans notre étude, la lysotypie de SE nous a permis de confirmer des résultats obtenus avec d'autres marqueurs, séparant en particulier les souches isolées chez les canetons de celles isolées plus tard des adultes [66].

2.4. Bactériocinotypes

La bactériocinotypie, qui repose sur la recherche de la production de bactériocines ou de la sensibilité aux bactériocines,

est d'application aussi réservée que la lysotypie.

Elle a été utilisée notamment dans une étude avec 172 souches de sérotype Typhimurium [59] mais ne s'est montrée que peu discriminante : cinq souches seulement produisaient une colicine.

2.5. Antibiotypes

La résistance aux antibiotiques peut être à support chromosomique, mais, chez les salmonelles, elle est généralement codée par des plasmides maintenus par la pression de sélection liée à l'usage d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire. En raison du caractère instable de certains plasmides et des transposons, l'antibiogramme ne peut pas toujours être considéré comme une méthode satisfaisante de discrimination au sein des sérovars, sauf dans le cas de l'émergence d'une résistance à un nouvel antibiotique ou d'un nouveau mécanisme de résistance à un antibiotique déjà largement utilisé. Ils présentent alors un intérêt médical et permettent un suivi plus précis des souches.

La résistance aux antibiotiques apparaît moins fréquente chez SE que STm. Les souches SE isolées chez l'homme comme chez l'animal sont généralement sensibles aux antibiotiques, y compris les souches PT4 ou PT8 et la résistance aux antibiotiques n'apparaît pas alors comme un marqueur intéressant [91, 101]. Cependant, les phénotypes d'antibiorésistance peuvent se révéler intéressants, et faciliter l'étude de la diffusion de souches épidémiques de lysotype 24, dérivant de SE PT4 après acquisition d'un plasmide de résistance [104].

La fréquence d'antibiorésistance chez des souches STm isolées chez des bovins apparaît élevée [7, 56, 57], de même que parmi les souches isolées chez l'homme, notamment les DT104 multirésistantes [113]. Les profils d'antibiorésistance ont

ainsi été utilisés lors d'études de souches de salmonelles de sérotype Typhimurium : parmi 172 souches humaines, 87 se sont révélées sensibles à tous les antibiotiques testés, mais 59 étaient résistantes à 3 (ou plus) antibiotiques, surtout tétracycline et streptomycine [59]. Dans une étude portant sur 278 souches bovines, McDonough et al. [61] n'en ont trouvé que 23 sensibles à tous les antibiotiques testés, alors que 243 souches étaient résistantes à trois antibiotiques ou plus : les antibiogrammes venaient alors compléter lysotypie et profil plasmidique pour améliorer le suivi de ces souches.

Des études récentes ont montré l'émergence de souches de salmonelles résistantes aux quinolones, aussi bien Enteritidis [9, 23] que Typhimurium [7, 56, 57] avec notamment une part grandissante des souches DT104 isolées en Grande-Bretagne [114].

Dans notre étude, sept STm seulement sur 56 se sont révélées résistantes à l'un au moins des antibiotiques testés, généralement chloramphénicol et tétracycline. Une seule souche était résistante aux fluoroquinolones. Parmi les SE, cinq se sont révélées résistantes aux quinolones ; l'antibiogramme a permis de distinguer quatre souches retrouvées chez les canetons des deux souches isolées ultérieurement chez les adultes dans ce même bâtiment. L'acquisition de la résistance aux quinolones a été observée dans une souche SE isolée de lapin après un traitement antibiotique [65].

3. MARQUEURS GÉNOTYPIQUES

La subdivision génotypique de *Salmonella* repose sur l'analyse de l'ADN plasmidique et de l'ADN chromosomique.

3.1. Plasmides

Les salmonelles peuvent héberger des plasmides de tailles très différentes, entre 1 et 200 kb. La caractérisation du profil plasmidique d'une souche comprend la détermination du nombre de plasmides et de leur taille.

La comparaison des profils de restriction des plasmides accroît la discrimination entre les souches et permet de mesurer le degré de parenté de plasmides de tailles similaires.

Les profils plasmidiques ont été employés dans de nombreuses enquêtes afin d'aider à caractériser des souches de *Salmonella* de divers sérotypes et généralement d'origines diverses [6, 58]. L'étude du contenu plasmidique, renforcé par l'analyse des profils de restriction des plasmides, a permis de caractériser une souche de SE épidémique retrouvée chez des patients et des employés d'un hôpital lors d'une infection nosocomiale [97]. Les profils plasmidiques ont permis de discriminer des souches de sérotype Typhimurium de même lysotype ou bien de sérotype Enteritidis PT8, isolées de parquets étroitement reliés et même à l'intérieur d'un parquet [2, 16].

Toutefois, dans de nombreuses études, un nombre limité de plasmides était présent, avec souvent un plasmide d'environ 55 kilobases (kb) (38 MDa) chez des souches SE isolées chez l'homme ou l'animal [16, 106] et d'environ 90 kb (60 MDa) chez STm [2, 61, 105]. Dans ces conditions les profils plasmidiques n'apparaissent pas aussi intéressants que les autres méthodes de typage, comme la lysotypie [82]. La présence de plasmides additionnels a toutefois permis de relier des souches isolées de parquets de volailles à une infection humaine [16]. Enfin, l'étude des plasmides contenus par des souches SE PT4 [18, 107] ou par des souches STm [59, 105] a parfois permis une caractérisation plus fine.

La corrélation des profils plasmidiques avec les lysotypes a pu être soulignée dans plusieurs études [88, 106].

L'analyse du contenu plasmidique seul apparaît utile dans quelques études, mais généralement plus d'information est obtenue lors de son association avec d'autres méthodes de caractérisation.

Dans notre travail, 55 des 56 STm étudiées hébergeaient un plasmide de 90 kb et huit profils plasmidiques ont été mis en évidence ; toutefois, pour les souches isolées au sein d'un même bâtiment, une faible diversité de profils a été observée. Toutes les souches SE, de différentes origines animales, hébergeaient un plasmide de 54 kb, avec deux plasmides additionnels de 50 et 3,8 kb pour quatre d'entre elles [65]. Les profils de restriction des plasmides de 90 kb et de 54 kb ont suggéré qu'ils étaient étroitement reliés [64].

3.2. Profils de restriction de l'ADN génomique

3.2.1. *Électrophorèse directe : restriction endonuclease analysis et pulsotypes*

L'ADN chromosomique peut être digéré par des enzymes de restriction. Lorsque celles-ci reconnaissent de fréquents sites de restriction, plus d'une centaine de fragments sont générés et séparés par électrophorèse. La comparaison des profils de restriction obtenus (REA ou *restriction endonuclease analysis*) est difficile en raison du grand nombre de fragments obtenus.

L'utilisation d'une enzyme reconnaissant seulement de rares sites de restriction permet d'obtenir un nombre plus limité de fragments (20–30), de grande taille, qui peuvent être séparés par électrophorèse en champs pulsés ou PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*). De nombreuses techniques ont été développées, parmi les-

quelles la méthode CHEF (*contour-clamped homogenous electrophoretic field*) est la plus utilisée [10, 31, 84, 94, 103].

Les pulsotypes, ou profils électrophorétiques de l'ADN génomique après coupure par enzymes de restriction et PFGE, ont ainsi permis d'identifier une souche vaccinale de STm, présentant un pulsotype différent de tous ceux rencontrés chez 43 autres souches isolées chez des volailles [94]. La PFGE a été utilisée également afin d'étudier les relations génétiques entre différents lysotypes de STm, soulignant l'hétérogénéité des souches de DT49 et l'homogénéité des souches appartenant respectivement aux DT110, 120 et 135 [76].

Avec des souches SE, les pulsotypes se sont révélés parfois un peu moins intéressants que les ribotypes, malgré une bonne concordance entre les deux méthodes [103]. Un pouvoir discriminant équivalent entre les deux approches a été relevé dans une étude visant à évaluer les relations génétiques entre des SE de lysotypes différents isolés pendant le décours de la maladie chez un même patient [85]. Récemment, la séparation par électrophorèse en champs pulsés s'est montrée plus discriminante que la ribotypie sur une collection de 31 SE de différentes origines, apparaissant comme un marqueur particulièrement approprié [51]. La PFGE a permis également de subdiviser 39 souches de lysotype 4, parmi lesquelles 9 pulsotypes distincts ont été identifiés, et est apparue adaptée pour de telles études épidémiologiques [84]. Des souches de lysotypes 4 et 8 ont pu également être discriminées par PFGE, et l'analyse de ces résultats a également permis de souligner la parenté génétique entre l'ensemble de ces souches, en accord avec l'hypothèse de la diffusion pandémique d'un seul clone, ou de clones très proches, de *S. Enteritidis* [10].

Le choix des enzymes appropriées pour les études épidémiologiques apparaît par-

ticulièrement important. Certains auteurs ont testé jusqu'à 20 enzymes de restriction et les plus souvent retenues ont été *XbaI*, *SpeI*, *NotI*.

3.2.2. Utilisation de sondes

Les profils de restriction chromosomiques peuvent être rendus plus lisibles par la révélation d'un nombre limité de bandes. Des sondes nucléiques spécifiques marquées, qui hybrident avec certains fragments d'ADN, peuvent être utilisées. Ceci permet alors de définir le polymorphisme des fragments de restriction ou RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

3.2.2.1. Ribotypes

La nature très conservée des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) permet à une seule sonde constituée d'ARN 16+23S d'*Escherichia coli* d'hybrider avec les gènes correspondants de n'importe quelle bactérie même phylogéniquement éloignée. Le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN codant pour les ARNr permet une identification des souches bactériennes, le degré de différenciation dépendant de l'endonucléase utilisée. L'empreinte de chaque souche peut être obtenue en choisissant une enzyme appropriée ou en combinant les profils obtenus avec deux enzymes (ou plus) [25–26].

Dans des conditions standardisées, la méthode de ribotypie est extrêmement reproductible, autorisant des études taxinomiques et phylogénétiques, par exemple la caractérisation de souches de salmonelles de nombreux sérotypes [19]. Pour certains sérotypes, un profil spécifique est observé. Pour d'autres sérotypes, tel que Typhi, une grande hétérogénéité de ribotypes existe, la ribotypie s'avérant dans ce cas plus sensible que la lysotypie [71]. Les ribotypes de souches de STm ont permis de préciser l'origine animale d'infections humaines [72]. Ils ont également

contribué à rechercher les relations génétiques entre différents lysotypes de STm [76]. Les ribotypes contribuent aussi à déterminer les relations phylogéniques entre souches de STm [100]. La ribotypie s'est également révélée utilisable pour le suivi épidémiologique de souches SE [58, 75, 81, 103]. Cette méthode permet également d'identifier des relations clonales entre des souches de divers lysotypes [85]. Le choix essentiel des enzymes les plus adaptées peut être effectué après des études préliminaires, en vue d'obtenir des profils clairs et distincts. Les plus souvent retenues sont *SmaI*, *SphI* et *AccI* pour SE [46, 32, 58, 75, 109], *SmaI* et *HincII* pour STm [69, 72, 76].

De nombreux auteurs utilisent le marquage non radioactif, avec de la digoxigénine [109], ou de la biotine [52, 81] comme alternative au marquage radioactif. Aucune différence entre marquage radioactif et non radioactif n'a été rapportée.

Nous avons appliqué la ribotypie à une étude épidémiologique sur des STm et SE isolées d'élevages avicoles, qui présentaient entre elles de probables liens de clonalité. Des enzymes ont été testées lors d'essais préliminaires, et quatre d'entre elles, *HindIII*, *BglII*, *PvuII* et *SmaI* ont été choisies. Neuf ribotypes distincts ont été détectés parmi les STm, permettant la définition de liens de clonalité. En revanche, nous n'avons détecté aucune différence parmi les souches SE [65] ; une discrimination a toutefois été obtenue entre d'autres souches SE d'origines diverses [64].

3.2.2.2. « IStypes »

Les séquences d'insertion (IS : *insertion sequence*) font partie, avec les transposons et les épisomes autorépliquables, des « éléments transposables » du génome des Procaryotes. À ce titre, ce sont des régions du génome moins conservées que les ARNr. Leur utilisation a été suggérée

comme marqueur épidémiologique pour discriminer des souches reliées d'espèces bactériennes variées telles que *Staphylococcus aureus* (IS256) [67], et *Mycobacterium tuberculosis* (IS986 ou IS6110) [12, 111].

D'autres séquences d'insertion, IS1 et IS3, découvertes dans des souches d'*Escherichia coli*, et IS630 décrite chez *Shigella sonnei*, ont été également détectées dans des sérotypes de *Salmonella* [5, 60] et pourraient constituer des marqueurs supplémentaires des souches de salmonelles.

L'IS200 identifiée à l'origine chez des mutants du genre *Salmonella* [45, 77] a une taille de 700 bp environ. Cette IS est à localisation chromosomique, même si des copies additionnelles peuvent être trouvées sur un plasmide, notamment chez *S. Enteritidis* [98] ou bien chez *S. Abortusovis* [92].

Cependant aucune copie d'IS200 n'a pu être détectée chez des souches de sérotypes Agona, Hadar, Typhisuis ou de la sous-espèce Arizona [45, 116]. L'IS200 a été en revanche détectée chez des souches de *Shigella flexneri* et *Shigella sonnei* [24] et d'*Escherichia coli* [5].

Le nombre de copies de l'IS200 sur le chromosome varie en fonction du sérotype. Pour des souches STm, il est compris généralement entre 6 et 10 [5, 24, 45, 100], alors qu'il apparaît limité à deux ou trois copies dans les souches SE [65, 98, 99]. Les enzymes de restriction utilisées ne doivent pas couper dans l'IS200. L'enzyme la plus souvent retenue est *PstI*, qui donne des profils clairs et lisibles. Néanmoins, *BglII* ou *PvuII* peuvent être également utiles.

Le profil de restriction pour l'IS200, ou IS200 type, est un bon indicateur de l'évolution, à l'interface de la phylogénie et de l'épidémiologie pour des souches de salmonelles médicalement importantes comme *S. Enteritidis*, séparant des souches

de lysotype 4 [99] ou de lysotype 8 [109]. En général, les souches peuvent être regroupées dans l'une des trois lignées clonales définies par Stanley et al. [98]. L'IS200 a aussi permis de séparer des souches de STm d'un même lysotype [4] et d'analyser les relations génétiques entre souches de divers lysotypes [76], de démontrer la persistance d'un clone de STm chez un malade du sida [21] et a été utilisée pour caractériser une souche vaccinale [95].

Dans notre étude sur 56STm, sept IS200 types avec six à neuf copies de l'IS200 sur le chromosome ont été détectés parmi les *PstI*, avec une seule enzyme, et confirmés avec *BglII* et *PvuII*. L'IS200 s'est avérée la mieux adaptée avec la ribotypie au suivi épidémiologique des souches de ce sérotype. En revanche, nous n'avons détecté aucune différence par IS200 entre les souches SE d'origine animale proche. Nous avons mis en évidence trois bandes dans les profils de ces souches conduisant à la proposition d'une lignée clonale originale (Secliv), ne différant que par une bande additionnelle de 1 kb, de la lignée clonale majoritaire Secli définie par Stanley et al. [98] [65]. Cette dernière regroupe la majorité des souches pandémiques européennes de PT4. Nous avons pu distinguer, avec *PstI*, des souches SE de différentes origines [64].

3.2.2.3. Autres sondes

Des sondes d'ADN plasmidique peuvent être utilisées pour démontrer, sur des plasmides, la distribution de gènes d'antibiorésistance ou l'existence d'une région génétique conservée impliquée dans la virulence [27, 119]. La présence ou l'absence de gènes de virulence *spv* peut être utilisée comme marqueur sur les plasmides spécifiques de sérotype (*serotype-specific plasmids* ou SSPs), et être employée pour affiner les enquêtes épidémiologiques : elle permet de mettre en évidence des variants du SSP pour un séro-

type, et dans certains cas de distinguer des plasmides de taille voisine ne présentant pas de séquence homologue avec les gènes *spv* [95, 99]. Dans notre étude, les sondes testées, *spvR* et *spvA*, ont hybridé avec le plasmide de 90 kb, contenu dans 22 des 23 STm analysées ; cela confirme qu'il s'agit vraisemblablement du plasmide sérotype-spécifique (SSP) de STm [64].

Diverses sondes d'ADN génomique peuvent être aussi utilisées pour le typage de souches de salmonelles, comme par exemple les gènes codant pour le LPS ou la sous-unité majoritaire des fimbriae de type 1 [99]. La recherche d'autres gènes de virulence : *invA*, *pagC* [74] peut être menée pour caractériser les souches et rechercher les types associés à une aptitude pathogène particulière. Dans notre étude, l'hybridation avec la sonde *fimA* de l'ADN génomique de 22 souches STm étudiées coupé avec *HindIII* n'a révélé aucun polymorphisme de restriction [64], en accord avec les résultats de Stanley et al. [99] qui n'avaient détecté des profils de restriction différents que dans trois sous-espèces de *Salmonella enterica*.

D'autres sondes peuvent être utilisées, telles que des sondes clonées au hasard [30, 75]. Cette approche s'est ainsi révélée plus intéressante que l'analyse du contenu plasmidique pour caractériser des souches STm isolées lors d'un épisode de salmonellose bovine et équine dans une école vétérinaire américaine [30].

3.3. Profils d'amplification de l'ADN génomique (PCR-types)

Diverses approches ont été développées soit avec des amorces choisies au hasard, soit avec des amorces spécifiques.

3.3.1. Amplification au hasard de l'ADN : RAPD

Le polymorphisme de l'ADN amplifié par polymérisation en chaîne peut être uti-

lisé comme marqueur épidémiologique. L'analyse du polymorphisme de l'ADN amplifié au hasard ou *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) [118], ou AP-PCR (*arbitrarily primed-PCR*) [117], fait appel à des amorces oligonucléotidiques aléatoires. La RAPD ne requiert donc pas la connaissance préalable des séquences nucléotidiques. L'amplification est conduite avec une seule amorce, dans des conditions de faible stringence. Les fragments obtenus par PCR sont séparés et visualisés par électrophorèse en gel d'agarose. La RAPD est ainsi une méthode simple et rapide à mettre en œuvre [50, 102].

La principale limite de la RAPD est son manque de reproductibilité. En effet des profils RAPD différents peuvent résulter de faibles variations portant sur la concentration des amorces, la concentration du mélange réactionnel en $MgCl_2$, le nombre et les conditions des cycles d'amplification [17], la qualité et la concentration de la *Taq* polymérase [62, 93], la qualité et la concentration de l'échantillon d'ADN [15, 63], ou encore le thermocycleur [62]. Ceci implique donc des études préliminaires afin d'optimiser les conditions [33, 108]. Toutefois, dans des conditions uniformes et optimisées, les profils obtenus sont parfaitement reproductibles [102], ce qui fait de la RAPD un outil moléculaire taxinomique et épidémiologique intéressant, permettant la mise en évidence de la diversité dans les espèces microbiennes et l'identification individuelle de souches au sein de ces espèces.

Les profils d'amplification de l'ADN génomique obtenus par RAPD ont été appliqués à l'analyse de 33 SE différentes d'origine aviaire et humaine, avec différents lysotypes, et ont permis de discriminer les souches au sein même d'un lysotype [20]. Récemment, une collection de 29 SE déjà caractérisées avec d'autres méthodes a été étudiée par RAPD, qui a permis la discrimination des souches d'un

même lysotype et la définition de 14 sous-types [52]. Ces études suggèrent l'utilité de la RAPD pour suivre des souches SE isolées d'épisodes cliniques humains. En revanche, la RAPD semble moins discriminante que la lysotypie pour l'étude de souches de sérotype Typhimurium [32].

Le choix préliminaire des amorces utilisables apparaît crucial. Ainsi Lin et al. [52] en ont retenu six parmi 65 testées, sur la base de l'obtention d'une amplification, avec des profils clairs, et une discrimination au sein de la population étudiée. Un choix précis de ces amorces lors d'essais préliminaires est un prérequis indispensable pour une utilisation raisonnée de la RAPD : lorsque des lots d'amorces adaptées sont identifiés et employés, la RAPD constitue une méthode simple rapide et intéressante pour typer les SE.

Dans notre étude, des essais préliminaires ont été effectués avec 40 amorces décanucléotidiques sur trois souches de chacun des deux sérotypes étudiés. Deux décanucléotides ont été retenus pour l'étude des SE et trois autres pour STm. La reproductibilité des profils obtenus a été confirmée pour l'ensemble des amorces. Sept RAPDtypes ont été ainsi définis parmi les 56 souches STm avec les trois amorces choisies. Cependant, la discrimination obtenue ne correspondait pas précisément aux résultats de ribotypie, lesquels étaient en accord avec les commémoratifs. L'utilisation concomitante des deux approches doit être recommandée, la technique de RAPD constituant seulement une première approche et devant être complétée par la ribotypie, qui demeure la méthode de référence. L'analyse par RAPD a séparé les SE en trois groupes, en accord avec les commémoratifs et leurs caractéristiques phénotypiques. Ainsi, l'hypothèse de deux lignées clonales dans un parquet a été proposée, et confirmée ensuite par lysotypie. La présence de trois souches avec des RAPD-

types différents dans un autre bâtiment pouvait suggérer des événements indépendants de contamination, probablement liés à un défaut de protection sanitaire. La RAPD apparaît ainsi comme une approche intéressante pour améliorer le suivi des souches aviaires de SE [66].

3.3.2. Amplification spécifique à partir de séquences répétées (rep-PCR)

Des séquences conservées et répétées du génome bactérien ont été décrites chez les entérobactéries, les séquences Rep (*repetitive extragenic palindromic*) et les séquences Eric (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*). Des amorces spécifiques de ces séquences répétées du génome ont été décrites afin d'amplifier spécifiquement des fragments d'ADN compris entre ces séquences. Elles sont utilisées dans les techniques appelées respectivement Rep-PCR et Eric-PCR, et réunies sous le vocable plus général de rep-PCR [112]. Les fragments amplifiés sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose.

Les profils d'amplification de l'ADN génomique obtenus par Eric-PCR ont été appliqués récemment à une étude épidémiologique de salmonelles de divers sérotypes, suggérant l'existence de profils « sérotype-spécifiques » [110]. Toutefois, la méthode rep-PCR n'a pas permis de discriminer des souches de *S. Dublin* [42].

Dans notre étude, après des essais préliminaires en vue d'optimiser les conditions de réaction, seulement deux profils stables et reproductibles ont été observés parmi les STm et un seul parmi les SE, identique à l'un des profils retrouvés chez les STm. Ce résultat est en contradiction avec ceux de Van Lith et Aarts [110], et suggèrent un intérêt limité à utiliser cette approche dans des études épidémiologiques sur *Salmonella* [66].

3.3.3. PCR ribotypie

D'autres méthodes ont été développées, qui amplifient les régions intergéniques 16S-23S [28, 43]. Cette méthode appelée PCR ribotypie, permet de détecter le polymorphisme dans les régions intergéniques 16S-23S, soit par analyse directe des produits d'amplification, soit après leur digestion par des enzymes de restriction.

La discrimination s'est révélée proche de celle obtenue par ribotypie sur des souches de sérotype Typhimurium [69]. La PCR-ribotypie appliquée à divers sérotypes s'est ainsi montrée discriminante au sein de sérotypes comme Typhimurium, mais non au sein de sérotypes comme Enteritidis [44]. Cependant, récemment, la PCR ribotypie a autorisé la subdivision de souches SE : l'un des PCR-ribotypes était étroitement lié au PT8, alors que onze profils étaient détectés parmi les PT4 et 5 parmi les PT1. Ce travail concluait à la circulation épidémique de multiples clones de SE PT4 [70]. Les mêmes auteurs ont analysé des souches SE isolées de toxoinfections alimentaires chez l'homme, et sont parvenus à subdiviser les SE PT4 analysées en six PCR ribotypes ; mais ils ont souligné que cette approche demeurerait pour l'instant d'application réservée à des laboratoires de référence [73].

4. CONCLUSION

De nombreux marqueurs phénotypiques et génotypiques sont maintenant disponibles pour des études épidémiologiques de souches de salmonelles. Des approches différentes ont été proposées comme l'AFLP (*amplified fragment length polymorphism*).

Les différentes qualités des marqueurs utilisés doivent être évaluées afin de déterminer quels sont les plus adaptés. Ainsi, le pouvoir de discrimination d'un marqueur, capacité à distinguer des souches non reliées, peut être évalué par calcul d'un indice de discrimination [36, 37]. La

construction de dendrogrammes montrant les relations génétiques entre lignées clonales peut renforcer cette analyse. Ainsi des dendrogrammes construits à l'aide des méthodes « *single linkage* » ou UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) ont été appliqués à des études épidémiologiques sur des souches de *Salmonella* [46, 65, 70, 76].

La reproductibilité doit être précisément étudiée avec l'optimisation des conditions techniques, en particulier lorsque des méthodes d'amplification sont utilisées. La qualité des résultats dépend alors des études préliminaires, même si celles-ci sont fastidieuses.

La stabilité des marqueurs doit être démontrée par des études tant *in vitro* qu'*in vivo*. L'instabilité a en effet été rapportée pour des marqueurs comme les profils plasmidiques et les lysotypes, et la stabilité devra être éprouvée pour les profils de restriction ou d'amplification. Des auteurs ont ainsi testé la stabilité *in vitro* [68, 111], d'autres se sont intéressés à la stabilité *in vivo*. Ainsi dans notre travail, la stabilité des différents marqueurs évalués a été confirmée à l'aide d'une souche de *Salmonella* inoculée à des poulets axéniques élevés en isolateurs et régulièrement prélevés au cours des 15 semaines d'élevage [65, 66].

La plupart des auteurs ont comparé simultanément plusieurs marqueurs, comme le lysotype, le profil plasmidique ou le ribotype, et ont conclu à l'intérêt de la combinaison de plusieurs de ces marqueurs.

Dans notre étude, nous avons également proposé l'utilisation combinée de plusieurs marqueurs dans des études épidémiologiques, avec des nuances dans la hiérarchisation en fonction du sérotype. Le ribotype et l'IS_{type} ont semblé bien adaptés à l'étude de souches de sérotype Typhimurium. Nous avons souligné l'intérêt des antibiotypes, des profils plasmidiques et surtout de la RAPD pour amé-

liorer le suivi de souches SE aviaires isolées sur le terrain.

REMERCIEMENTS

Ce travail est issu d'une thèse de l'Université Claude-Bernard-Lyon I n° 185-96, intitulée « Étude épidémiologique de salmonelles isolées dans des élevages avicoles et évaluation de leur pouvoir pathogène ». Je tiens tout particulièrement à remercier Mme Elisabeth Chaslus-Dancla (laboratoire d'écopathologie microbienne, Station de pathologie aviaire et parasitologie, Inra Tours, 37380 Nouzilly) pour son accueil chaleureux, ses encouragements et les nombreuses corrections apportées aux différents manuscrits.

RÉFÉRENCES

- [1] Anderson E.S., Ward L.R., De Saxe M.J., De Sa J.D.H., Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*, J. Hyg. Camb. 78 (1977) 297-300.
- [2] Baggesen D.L., Olsen J.E., Bisgaard M., Plasmid profiles and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from successive flocks of chickens on three parent farms, Avian. Pathol. 21 (1992) 569-579.
- [3] Baggesen D.L., Wegener H.C., Madsen M., Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 1, 4, or 6 to phage type 7 with loss of lipopolysaccharide, J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 330-333.
- [4] Baquar N., Threlfall E.J., Rowe B., Stanley J., Phage type 193 of *Salmonella typhimurium* contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles, FEMS Microbiol. Lett. 115 (1994) 291-296.
- [5] Bisercic M., Ochman H., The ancestry of insertion sequences common to *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 175 (1993) 7863-7868.
- [6] Borrego J.J., Castro D., Jimenez-Notario M., Luque A., Martinez-Manzanares E., Rodriguez-Avial C., Picazo J.J., Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain, J. Clin. Microbiol. 30 (1992) 3058-3064.
- [7] Brisabois A., Frémy S., Moury F., Casin I., Breuil J., Collatz E., Epidemiological survey on antibiotic susceptibility of *Salmonella typhimurium* strains from bovine origin in France, in : Ploufragan *Salmonella* and salmonellosis '97 proceedings, 20-22 mai 1997, 1997, pp. 337-341.
- [8] Brown D.J., Baggesen D.L., Hansen H.B., Bisgaard M., The characterization of Danish isolates by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by phage typing and plasmid profiling 1980-1990, Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 102 (1994) 208-214.
- [9] Brown J.C., Thomson C.J., Amyes S.G.B., Mutations of the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella typhimurium* and three other *Salmonella* species leading to decreased susceptibilities to 4-quinolone drugs, J. Antimicrob. Chemother. 37 (1996) 351-356.
- [10] Buchrieser C., Brosch R., Buchrieser O., Kristl A., Luchansky J.B., Kaspar C.W., Genomic analyses of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains from Austria and phage type 8 strains from the United States, Zentralbl. Bakteriologie. 285 (1997) 379-388.
- [11] Canarelli B., Laurans G., Thomas D., Zadwadzki P., Eb F., Epidémiologie des *Salmonella* solées de 1978 à 1992 au CHU d'Amiens (908 souches), Méd. Mal. Infect. 25 (1995) 716-720.
- [12] Cave M.D., Eisenach K.D., Templeton G., Salfinger M., Mazurek G., Bate J.H., Crawford J.T., Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 262-266.
- [13] Chart H., Rowe B., Threlfall E.J., Ward L.R., Conversion of *Salmonella enteritidis* phage type 4 to phage type 7 involves loss of lipopolysaccharide with concomitant loss of virulence, FEMS Microbiol. Lett. 60 (1989) 37-40.
- [14] Corbion C., Frémy S., Piquet C., Pires-Gomes C., Inventaire des *Salmonella* 1990-1991, Éditions Cneva, Maisons-Alfort, 1992.
- [15] Davin-Regli A., Abed Y., Charel R.N., Bollet C., deMico P., Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns, Res. Microbiol. 146 (1995) 561-568.
- [16] Dorn C.R., Silapanuntakul R., Angrick E.J., Shipman L.D., Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks, Avian. Dis. 36 (1993) 844-851.
- [17] Ellsworth D.L., Rittenhouse K.L., Honeycutt R.L., Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns, Biotechniques 14 (1993) 214-217.
- [18] Erdem B., Threlfall E.J., Schofield S.L., Ward L.R., Rowe B., Plasmid profile typing provides a method for the differentiation of strains of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolated in Turkey, Lett. Appl. Microbiol. 19 (1994) 265-267.
- [19] Esteban E., Snipes K., Hird D., Kasten R., Kinde H., Use of ribotyping for characteri-

- zation of *Salmonella* serotypes, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 233–237.
- [20] Fadl A.A., Nguyen A.Z., Khan M.I., Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 987–989.
- [21] Fica A.E., Horowitz H.W., Lior H., Cabello F.C., Demonstration of persistence of *Salmonella typhimurium* in an AIDS patient by molecular methods, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 2327–2330.
- [22] Frost J.A., Ward L.R., Rowe B., Acquisition of a drug resistance plasmid converts *Salmonella enteritidis* phage type 4 to phage type 24, *Epidemiol. Infect.* 103 (1989) 243–248.
- [23] Frost J.A., Kelleher A., Rowe B., Increasing ciprofloxacin resistance in *Salmonellas* in England and Wales 1991–1994, *J. Antimicrob. Chemother.* 37 (1996) 85–91.
- [24] Gibert I., Barbé J., Casadesús J., Distribution of insertion sequence IS200 in *Salmonella* and *Shigella*, *J. Gen. Microbiol.* 136 (1990) 2555–2560.
- [25] Grimont F., Grimont P.A.D., Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools, *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 137B (1986) 165–175.
- [26] Grimont F., Grimont P.A.D., La carte d'identité moléculaire des bactéries, *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 6 (1991) 9–12.
- [27] Gulig P.A., Danbara H., Guiney D.G., Lax A.J., Norel F., Rhen M., Molecular analysis of *spv* virulence genes of the salmonella virulence plasmids, *Mol. Microbiol.* 7 (1993) 825–830.
- [28] Gürtler V., Stanisich V.A., New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region, *Microbiol.* 142 (1996) 3–16.
- [29] Haeghebaert S., Delarouge-Astagneau E., Vaillant V., Le Querrec F., Les toxi-infections alimentaires en France en 1995, *Bull. Épidémiol. Hebd. n° spécial* 28–29 (1997).
- [30] Hansen L.M., Jang S.S., Hirsh D.C., Use of random fragments of chromosomal DNA to highlight restriction site heterogeneity for fingerprinting isolates of *Salmonella typhimurium* from hospitalized animals, *Am. J. Vet. Res.* 54 (1993) 1648–1652.
- [31] Hickman-Brenner F.W., Stubbs A.D., Farmer III J.J., Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 2817–2823.
- [32] Hilton A.C., Banks J.G., Penn C.W., Random amplification of polymorphic DNA of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences, *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1996) 575–584.
- [33] Hilton A.C., Banks J.G., Penn C.W., Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*, *Lett. Appl. Microbiol.* 24 (1997) 243–248.
- [34] Hird D.W., Kinde H., Case J.T., Charlton B.R., Chin R.P., Walker R.L., Serotypes of *Salmonella* isolated from California turkey flocks and their environment in 1984–89 and comparison with human isolates, *Avian. Dis.* 37 (1993) 715–719.
- [35] Hubert B., Dehaumont P., Quenum B., Pignault A., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1989, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 16 (1990) 65–67.
- [36] Hunter P.R., Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods, *J. Clin. Microbiol.* 28 (1990) 1903–1905.
- [37] Hunter P.R., Gaston M.A., Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity, *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 2465–2466.
- [38] Jacob W.K., Kühn H., Kürschner H., Rabsch W., Beitrag zur epidemiologischen Analyse der *Salmonella typhimurium*-Infektionen beim Rind - Ergebnisse der Lyso- und Biochemotypie für die Region Ostthüringen in der Zeit von 1974 bis 1991, *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 106 (1993) 265–269.
- [39] Jouve J.L., La qualité microbiologique des aliments – maîtrise et critères, PolyTechnica, Paris, 1993.
- [40] Katouli M., Kühn I., Wollin R., Möllby R., Evaluation of the PhP system for biochemical-fingerprint typing of strains of *Salmonella* of serotype Typhimurium, *J. Med. Microbiol.* 37 (1992) 245–251.
- [41] Katouli M., Seuffer R.H., Wollin R., Kühn I., Möllby R., Variations in biochemical phenotypes and phage types of *Salmonella enteritidis* in Germany 1980–92, *Epidemiol. Infect.* 111 (1993) 199–207.
- [42] Kérouanton A., Brisabois A., Grout J., Picard B., Molecular epidemiological tools for *Salmonella* Dublin typing, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14 (1996) 25–29.
- [43] Kostman J.R., Alden M.B., Mair M., Edlind T.D., LiPuma J.J., Stull T.L., A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 204–208.
- [44] Lagatolla C., Dolzani L., Tonin E., Lavenia A., Di Michele M., Tommasini T., Monti-Bragadin C., PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 2440–2443.
- [45] Lam S., Roth J.R., IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence, *Cell* 34 (1983) 951–960.

- [46] Landeras E., Gonzalez-Hevia M.A., Alzugaray R., Mendoza M.C., Epidemiological differentiation of *Salmonella enteritidis* by ribotyping, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 2294–2296.
- [47] Le Minor L., Popoff M.Y., Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 (1987) 465–468.
- [48] Le Minor L., Véron M., Bactériologie médicale, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1989.
- [49] Lepoutre A., Salomon J., Charley C., Le Querrec F., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1993, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 52 (1994) 245–247.
- [50] Leroy-Sétrin S., Lesage M.C., Chaslus-Dancla E., Lafont J.P., Clonal diffusion of EPEC-like *Escherichia coli* from rabbits as detected by ribotyping and random amplified polymorphic DNA assays, *Epidemiol. Infect.* 114 (1995) 113–121.
- [51] Liebisch B., Schwarz S., Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates, *J. Med. Microbiol.* 44 (1996) 52–59.
- [52] Lin A.W., Usera M.A., Barrett T.J., Goldsby R. A., Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*, *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 870–876.
- [53] Lombard I., Lepoutre A., Charley C., Le Querrec F., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1992, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 49 (1993) 227–229.
- [54] Marshall B., Pignault A., Le Querrec F., Cluzan S., Lepoutre A., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1991, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 32 (1992) 153–155.
- [55] Martel J.L., Prave M., Evolution du risque salmonellique en médecine vétérinaire, *Rev. Méd. Vet.* 145 (1994) 563–569.
- [56] Martel J.L., Chaslus-Dancla E., Coudert M., Poumarat F., Lafont J.P., Survey of antimicrobial resistance in bacterial isolates from diseased cattle in France, *Microbial Drug Resistance* 1 (1995) 273–283.
- [57] Martel J.L., Chaslus-Dancla E., Coudert M., Lafont J.P., Évolution de la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles d'origine bovine en France, *Méd. Mal. Infect.* 26 (1996) 415–419.
- [58] Martinetti G., Altwegg M., rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as tool for typing *Salmonella* Enteritidis, *Res. Microbiol.* 141 (1990) 1151–1162.
- [59] Martini A., Filetici E., Fantasia M., *Epidemiological markers of Salmonella typhimurium* isolates in Rome, *J. Med. Microbiol.* 37 (1992) 104–108.
- [60] Matsutani S., Ohtsubo E., Distribution of the *Shigella sonnei* insertion elements in Enterobacteriaceae, *Gene* 127 (1993) 111–115.
- [61] McDonough P.L., Timoney J.F., Jacobson R.F., Khakhria R., Clonal groups of *Salmonella typhimurium* in New York state, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 622–627.
- [62] Meunier J.R., Grimont P.A.D., Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting, *Res. Microbiol.* 144 (1993) 373–379.
- [63] Micheli M.R., Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E., Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 1921–1922.
- [64] Millemann Y., Étude épidémiologique de salmonelles isolées dans des élevages avicoles et évaluation de leur pouvoir pathogène, thèse, université Claude-Bernard-Lyon I, 1996.
- [65] Millemann Y., Lesage M.C., Chaslus-Dancla E., Lafont J.P., Value of plasmid profiling, ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *enteritidis*, *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 173–179.
- [66] Millemann Y., Lesage-Descauses M.C., Lafont J.P., Chaslus-Dancla E., Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 14 (1996) 129–134.
- [67] Monzon-Moreno C., Aubert S., Morvan A., El Solh N., Usefulness of three probes in typing isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *J. Med. Microbiol.* 35 (1991) 80–88.
- [68] Murase T., Nakamura A., Matsushima A., Yamai S., An epidemiological study of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field electrophoresis (PFGE): several PFGE patterns observed in isolates from a food poisoning outbreak, *Microbiol. Immunol.* 40 (1996) 873–875.
- [69] Nastasi A., Mammina C., Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of sporadic and outbreak-associated strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium, *Res. Microbiol.* 146 (1995) 99–106.
- [70] Nastasi A., Mammina C., Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in southern Italy during the years 1980–1994, *Res. Microbiol.* 147 (1996) 393–403.
- [71] Nastasi A., Mammina C., Villafrate M.R., rDNA fingerprinting as a tool in epidemiology

- logical analysis of *Salmonella typhi* infections, *Epidemiol. Infect.* 107 (1991) 565–576.
- [72] Nastasi A., Mammina C., Villafrate M.R., Epidemiology of *Salmonella typhimurium*: ribosomal DNA analysis of strains from human and animal sources, *Epidemiol. Infect.* 110 (1993) 553–565.
- [73] Nastasi A., Mammina C., Fantasia M., Pontello M., Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from foodborne outbreaks occurring in Italy, 1980–1994, *J. Med. Microbiol.* 46 (1997) 377–382.
- [74] Nolan L.K., Giddings C.W., Brown J., The distribution of *invA*, *pagC* and *spvC* genes among *Salmonella* isolates from animals, *Vet. Res. Commun.* 19 (1995) 167–177.
- [75] Olsen J.E., Skov M.N., Threlfall E.J., Brown D.J., Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing, *J. Med. Microbiol.* 40 (1994) 15–22.
- [76] Olsen J.E., Skov M.N., Angen Ø., Threlfall E.J., Bisgaard M., Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE, *Microbiology* 143 (1997) 1471–1479.
- [77] O'Reilly C., Black G.W., Laffey R., McConnell D.J., Molecular analysis of an IS200 insertion in the *gpt* gene of *Salmonella typhimurium* LT2, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 6599–6601.
- [78] Ørskov F., Ørskov I., Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other Bacteria, *J. Infect. Dis.* 148 (1983) 346–357.
- [79] Pierre V., Tchakamian S., Le Querrec F., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1994, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 21 (1996) 99–101.
- [80] Pignault A., Cluzan S., Dehaumont P., Hubert B., Les toxi-infections alimentaires collectives en 1990, *Bull. Épidémiol. Hebd.* 25 (1991) 99–101.
- [81] Pignato S., Nastasi A., Mammina C., Fantasia M., Giammanco G., Phage types and ribotypes of *Salmonella* Enteritidis in southern Italy, *Zentralbl. Bakteriol.* 283 (1996) 399–405.
- [82] Poppe C., McFadden K.A., Brouwer A.M., Demczuk W., Characterization of *Salmonella enteritidis* strains, *Can. J. Vet. Res.* 57 (1993) 176–184.
- [83] Popoff M.Y., Bockemühl J., Hickman-Brenner F.W., Supplement 1995 (no. 39) to the Kauffmann-White scheme, *Res. Microbiol.* 147 (1996) 765–769.
- [84] Powell N.G., Threlfall E.J., Chart H., Rowe B., Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance, *FEMS Microbiol. Lett.* 119 (1994) 193–198.
- [85] Powell N.G., Threlfall E.J., Chart H., Schofield S.L., Rowe B., Correlation of change in phage type with pulsed field profile and 16S *rrn* profile in *Salmonella enteritidis* phage types 4, 7 and 9a, *Epidemiol. Infect.* 114 (1995) 403–411.
- [86] Rankin S., Platt D.J., Phage conversion in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: implications for epidemiology, *Epidemiol. Infect.* 114 (1995) 227–236.
- [87] Reeves M.W., Evins G.M., Heiba A.A., Plikaytis B.D., Farmer J.J., Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov., *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 313–320.
- [88] Ridley A.M., Punia P., Ward L.R., Rowe B., Threlfall E.J., Plasmid characterization and pulsed-field electrophoretic analysis demonstrate that ampicillin-resistant strains of *Salmonella enteritidis* phage type 6a are derived from *Salm. enteritidis* phage type 4, *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1996) 613–618.
- [89] Roberts J.A., Sockett P.N., The socio-economic impact of human *Salmonella enteritidis* infection, *Int. J. Food. Microbiol.* 21 (1994) 117–129.
- [90] Rodrigue D.C., Tauxe R.V., Rowe B., International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.* 105 (1990) 21–27.
- [91] Rodrigue D.C., Cameron D.N., Puhf N.D., Brenner F.W., St.Louis M.E., Wachsmuth K., Tauxe R.V., Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* isolates in the United States, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 854–857.
- [92] Schiaffino A., Beuzon C.R., Uzzau S., Leori G., Cappuccinelli P., Casadesus J., Rubino S., Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2375–2380.
- [93] Schierwater B., Ender A., Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 4647–4648.
- [94] Schwarz S., Liebisch B., Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H, *Lett. Appl. Microbiol.* 19 (1994) 469–472.
- [95] Schwarz S., Liebisch B., Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis for the identification of *Salmonella enterica* subsp.

- enterica* serovar Typhimurium vaccine strain Zoosaloral H and its differentiation from wild type strains of the same serovar, Zentralbl. Bakteriologie 281 (1994) 442–450.
- [96] Sockett P.N., The economic implications of human salmonella infection, J. Appl. Bacteriol. 71 (1991) 289–295.
- [97] Sørum H., Bøvre K., Bukholm G., Lassen J., Olsvik Ø., A unique plasmid profile characterizing *Salmonella enteritidis* isolates from patients and employees in a hospital, Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 98 (1990) 25–29.
- [98] Stanley J., Jones C.S., Threlfall E.J., Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution, FEMS Microbiol. Lett. 82 (1991) 83–90.
- [99] Stanley J., Goldsworthy M., Threlfall E.J., Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*, FEMS Microbiol. Lett. 90 (1992) 153–160.
- [100] Stanley J., Baquar N., Threlfall E.J., Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16S *rrn* loci, J. Gen. Microbiol. 139 (1993) 1133–1140.
- [101] Stubbs A.D., Hickman-Brenner F.W., Cameron D.N., Farmer III J.J., Differentiation of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping, J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 199–201.
- [102] Swaminathan B., Barrett T.J., Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious disease, J. Microbiol. Methods. 23 (1995) 129–139.
- [103] Thong K.L., Ngeow Y.F., Altwegg M., Navaratnam P., Pang T., Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 1070–1074.
- [104] Threlfall E.J., Chart H., Interrelationships between strains of *Salmonella enteritidis*, Epidemiol. Infect. 111 (1993) 1–8.
- [105] Threlfall E.J., Frost J.A., Ward L.R., Rowe B., Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 49 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations, Epidemiol. Infect. 104 (1990) 243–251.
- [106] Threlfall E.J., Chart H., Ward L.R., de Sa J.D.H., Rowe B., Interrelationships between strains of *Salmonella enteritidis* belonging to phage types 4, 7, 7a, 8, 13, 13a, 23, 24 and 30, J. Appl. Bacteriol. 75 (1993) 43–48.
- [107] Threlfall E.J., Hampton M.D., Chart H., Rowe B., Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from humans, poultry and eggs, Epidemiol. Infect. 112 (1994) 25–31.
- [108] Tyler K.D., Wang G., Tyler D., Johnson W.M., Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens, J. Clin. Microbiol. 35 (1997) 339–346.
- [109] Usera M.A., Popovic T., Bopp C.A., Strockbine N.A., Molecular subtyping of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains from the United States, J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 194–198.
- [110] Van Lith L.A.J.T., Aarts H.J.M., Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes, Lett. Appl. Microbiol. 19 (1994) 273–276.
- [111] Van Soolingen D., Hermans P.W.M., de Haas P.E.W., Soll D.R., van Embden J.D.A., Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis, J. Clin. Microbiol. 29 (1991) 2758–2786.
- [112] Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, Nucleic Acids Res. 19 (1991) 6823–6831.
- [113] Wall P.G., Ross D., van Someren P., Ward L.R., Threlfall J., Rowe B., Features of the epidemiology of multidrug resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales, in : Ploufragan Salmonella and salmonellosis '97 proceedings, 20–22 mai 1997, 1997, pp. 565–567.
- [114] Ward L.R., Threlfall E.J., Human salmonellosis in England and Wales – current situation, in : Ploufragan Salmonella and salmonellosis '97 proceedings, 20–22 mai 1997, 1997, pp. 547–549.
- [115] Ward L.R., de Sa J.D.H., Rowe B., A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*, Epidemiol. Infect. 99 (1987) 291–304.
- [116] Weide-Botjes M., Kobe B., Schwarz S., Lange C., A molecular typing system for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar, in : Ploufragan Salmonella and salmonellosis '97 proceedings, 20–22 mai 1997, 1997, pp. 127–129.
- [117] Welsh J., McClelland M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Res. 18 (1990) 7213–7218.
- [118] Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res. 18 (1990) 6531–6535.
- [119] Woodward M.J., McLaren I., Wray C., Distribution of virulence plasmids within salmonellae, J. Gen. Microbiol. 135 (1989) 503–511.