

# Typage par PCR-HRM, une alternative au sérotypage par agglutination des salmonelles circulant dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien

Audrey SAUTRON <sup>1</sup>, Anaïs ETHEVES <sup>2</sup>, Eric CARDINALE <sup>2</sup>, Vincent PORPHYRE <sup>3</sup>, et Philippe LAURENT <sup>4</sup>

1 : **Département Génie biologique**, IUT de Saint-Pierre - Université de La Réunion

2 : **Cirad - UMR ASTRE** - Plateforme Cyroi, Sainte Clotilde - La Réunion

3 : **Cirad - UMR 112** Systèmes d'élevage en milieux méditerranéens et tropicaux, Station Ligne-Paradis, Saint Pierre - La Réunion

4 : **Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments** – Département Génie biologique, IUT de Saint-Pierre - Université de La Réunion

**7<sup>ème</sup> édition des journées scientifiques QualiREG**

**16-21 Novembre 2018**

**Moroni, COMORES**

# Salmonelles et salmonelloses

Les salmonelles sont des entérobactéries responsables chez l'homme

## LA FIEVRE TYPHOÏDE

infection généralisée  
parfois mortelle

## SALMONELLOSES

« mineures »

*Salmonella*

non-typhiques

## Infections d'origine alimentaire

Les salmonelles sont une des 4 principales causes de maladies diarrhéiques dans le monde (OMS)

Principaux symptômes :

- nausées, vomissements
- douleurs abdominales, diarrhées
- maux de tête, frissons
- fièvre élevée

Cas général :

Tout rentre dans l'ordre en **2 à 3 jours**  
ou au maximum en une semaine

Chez les jeunes enfants

ou les personnes âgées :

peut être beaucoup **plus sévère**  
parfois **mortelle**

## Réservoir principal et sources d'infection

**Tube digestif** → animaux domestiques et sauvages  
→ homme

### Contamination

- **par voie orale** :

- ingestion d'aliments contaminés consommés crus ou peu cuits

→ œufs, viandes, lait... → alimentation animale

NB : contamination par nuisibles à proximité des élevages

- contact direct avec un homme ou un animal infecté

→ défaut des mesures d'hygiène dans une famille  
ou une collectivité

- Plus rarement **par voie aérienne** :

→ en particulier dans les élevages intensifs confinés

**Les salmonelles sont transmises tout au long de la chaîne alimentaire**



Mise en place de systèmes nationaux de surveillance

CNR et ANSES

**Identification précise des souches**

# Caractérisation des salmonelles

## Méthodologie

### Prélèvement

Bactériologie classique

Tests biochimiques  
d'identification

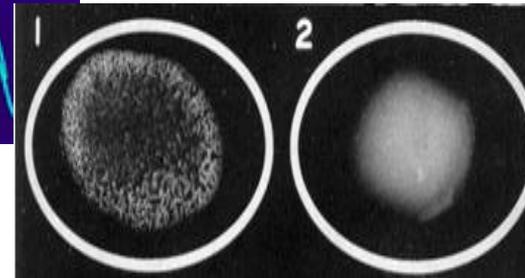
Sérotypage classique  
par agglutination

### Sérovar

Sous-typage éventuel  
pour les sérovars fréquents

Techniques remplacées par séquençage  
complet du génome depuis 2016

CNR



## Technique de Référence (ISO 6579-3)

200 antisérums

Antigène somatiques O

Antigènes flagellaires H

**plus de 2600 sérovars**

- certains très rares

- **d'autres très fréquents**

**S. Typhimurium 27,6%**

**S. Enteritidis 23%**

humaine, en France  
moyenne entre 2002 et 2010

## Sérotypage par agglutination

**difficile à mettre en œuvre**  
en autocontrôle de routine



- Contraintes techniques
- Coût des sérums

### Alternative : faire appel à un prestataire

CNR *Salmonella*, ANSES, Laboratoires  
Vétérinaire Départementaux...



**Couts et délais de  
réponses importants**



**Freins pour le suivi exhaustif et  
précis de la chaine alimentaire**

### Alternative : typage par HRM

Zeinzinger *et al.* 2012 : Typage 39/47 sérotypes

**Couverture** 94% origine humaine,  
85 % origine alim. vet. et env.

Nos travaux  
préliminaires 2017 :

**HRM : 10X moins cher que sérotypage**

Typage de 20 souches – 6/7 sérotypes

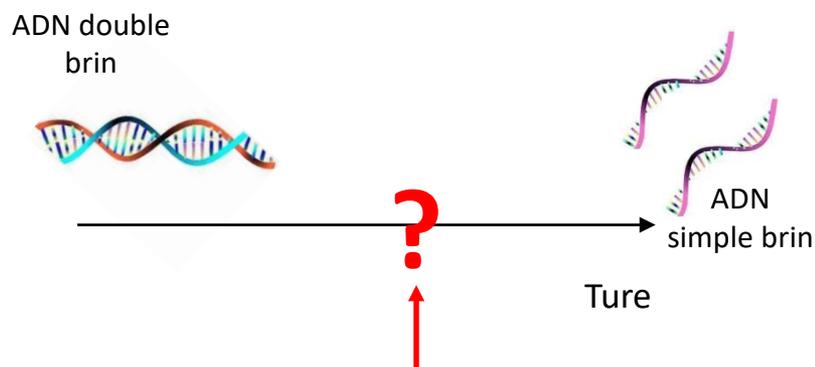
**A valider sur plus de sérotypes et plus de souches**

# Le typage par PCR - HRM

Analyse HRM - High Resolution Melting

## Le principe

Mise en évidence rapide de la différence de **température de fusion** ( $T_m$ ) de marqueurs ADN amplifiés par PCR.



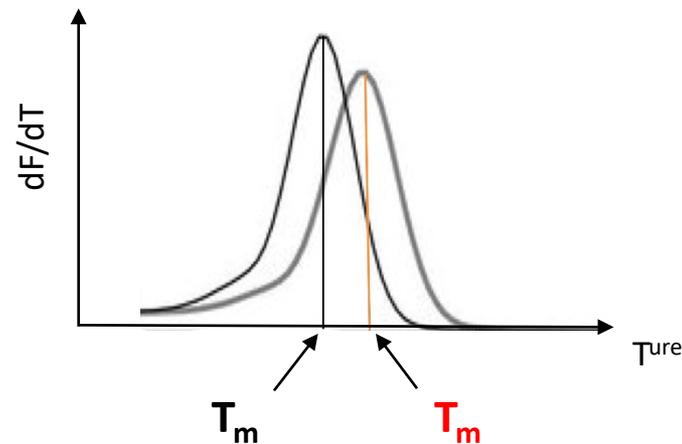
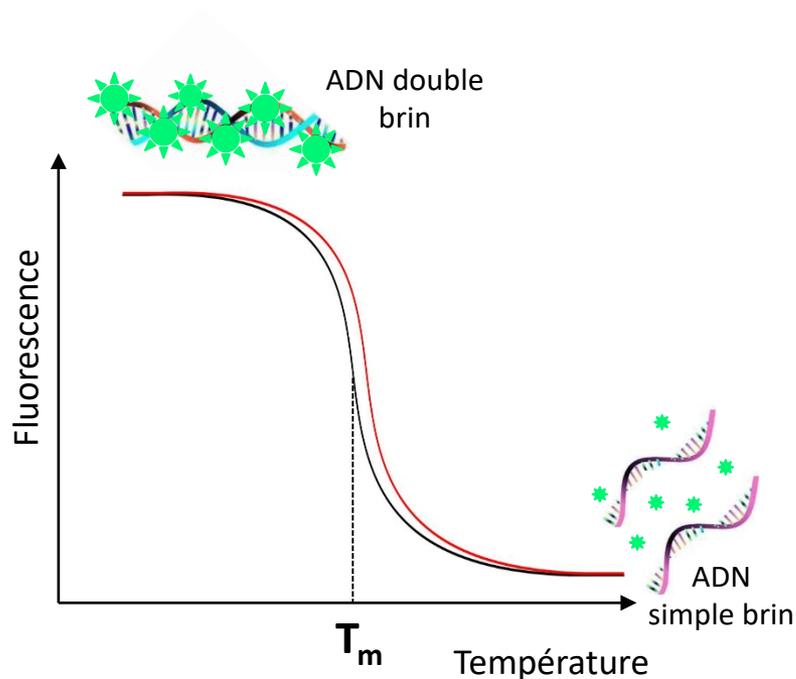
$T_m$  = température à laquelle  
50% double brin et 50% simple brin

# Le typage par PCR - HRM

Analyse HRM - High Resolution Melting

## Le principe

Mise en évidence rapide de la différence de **température de fusion** ( $T_m$ ) de marqueurs ADN amplifiés par PCR.



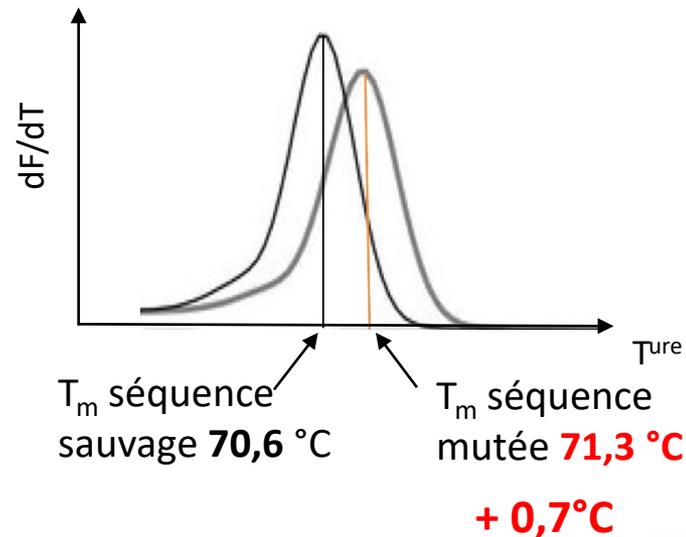
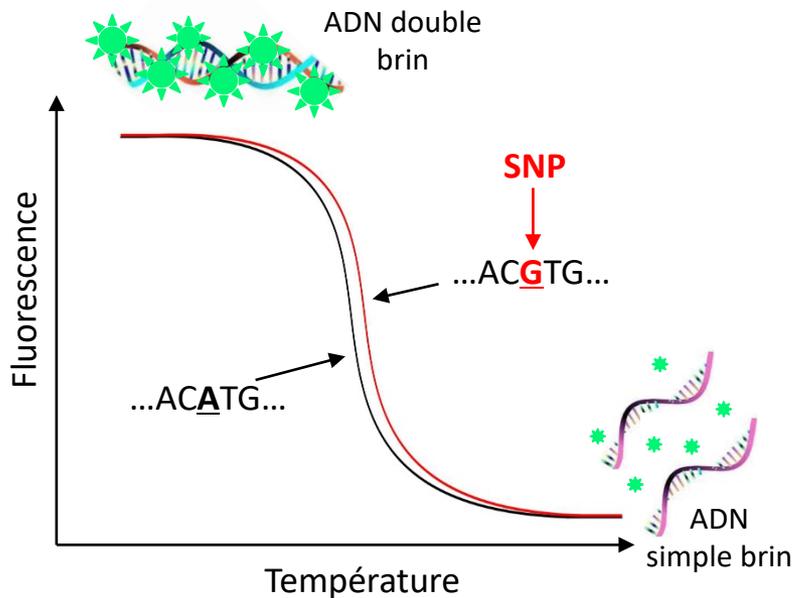
# Le typage par PCR - HRM

Analyse HRM - High Resolution Melting

## Le principe

Mise en évidence rapide de la différence de **température de fusion** ( $T_m$ ) de marqueurs ADN amplifiés par PCR.

Possibilité de mettre en évidence des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP)



# Matériels et méthodes

**Les souches** 90 souches, 13 sérovars les + fréquents, zone Sud-ouest de l'OI

S. Agona n=15	S. Irumu n=1	S. Newport n=18	S. Weltevreden n=7
S. Anatum n=11	S. Kentucky n=5	S. Paul n=2	
S. Enteritidis n=3	S. Livingstone n=8	S. Typhimurium n=12	
S. Give n=1	S. Molade n=1	S. Virchow n=6	

## La méthode

**Extraction d'ADN** : QIAGEN « Dneasy Blood and Tissue Kit »

**Dosage et aliquot** : 50 pg/ $\mu$ L

**Amplification et HRM** : Rotor-Gene 2plex HRM Qiagen™

Triplex	170 pb	<i>fljB</i> (flagelline)
Marqueurs	171 pb	<i>gyrB</i> (sous-unité B de l'ADN gyrase)
	241 pb	<i>ycfQ</i> (répresseur transcriptionnel)

Zeinzinger *et al.* 2012



## Détermination des profils HRM : les CP (Curve Profile)

Chaque souche de sérotype connu se voit attribuer un CP servant de référence

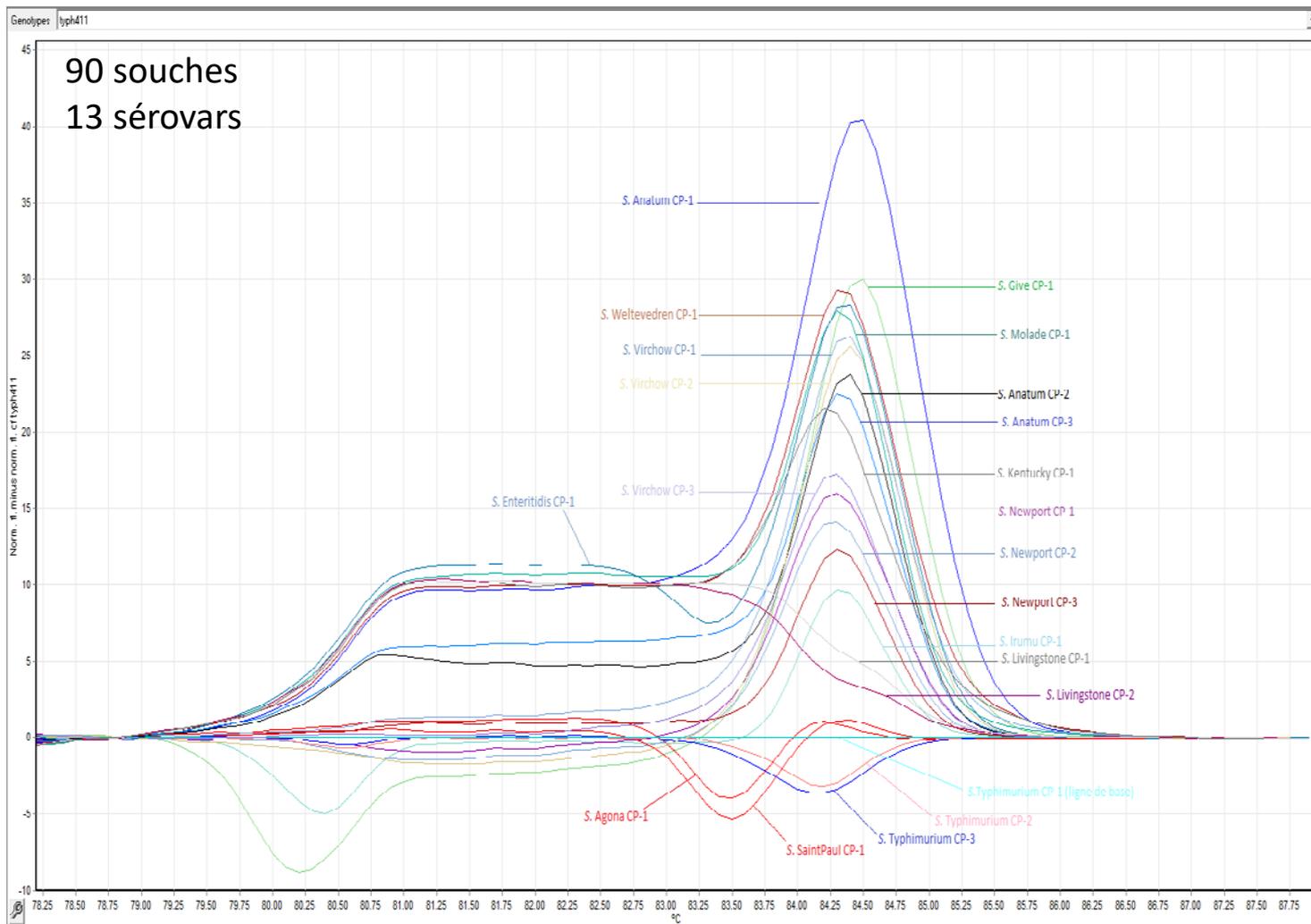
90 souches

13 sérovars

# Résultats - discussions

## Détermination des profils HRM : les CP (Curve Profile)

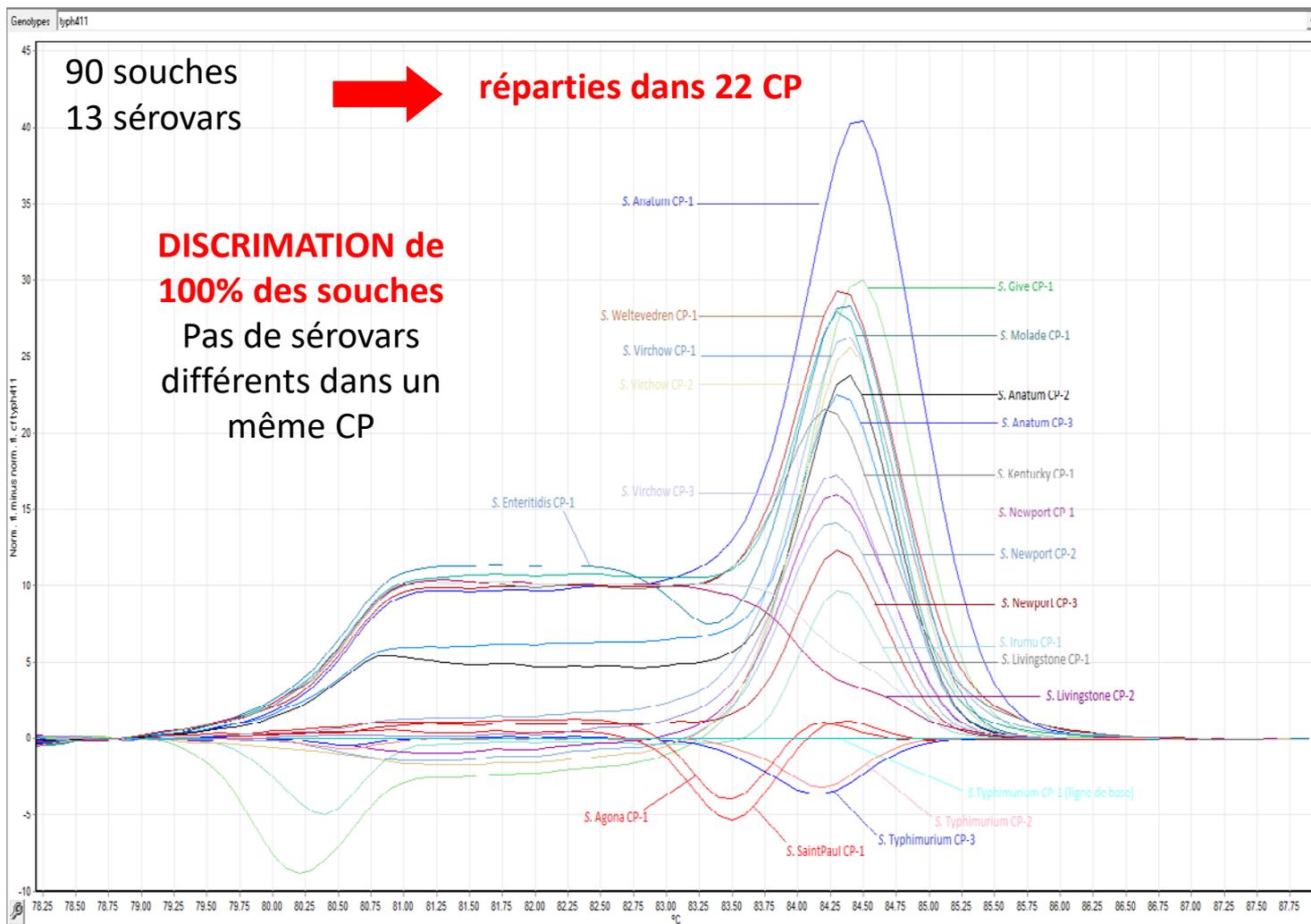
Chaque souche de sérotype connu se voit attribuer un CP servant de référence



# Résultats - discussions

## Détermination des profils HRM : les CP (Curve Profile)

Chaque souche de sérotype connu se voit attribuer un CP servant de référence



# Pourquoi plus de CP que de sérotypes ?

Mutations ponctuelles intra-sérotype → Détection de **sous-types** à l'intérieur du même sérotype

➔ **HRM permet un typage plus fin que le sérotypage**

## Validation

Exemple

	Agona CP-1	Anatum CP-1	Anatum CP-2	Anatum CP-3	Enteritidis CP-1
Agona CP-1	100%	0%	2,77%	0,52%	0,01%
Anatum CP-1	0%	100%	0,40%	2,09%	14,32%
Anatum CP-2	2,77%	0,40%	100%	83,95%	29,48%
Anatum CP-3	0,52%	2,37%	83,95%	100%	40,10%
Enteritidis CP-1	0,01%	14,32%	29,48%	40,10%	100%

15 souches de *S. Agona*  
➔ Agona - CP1

15 souches de *S. Anatum*  
➔ **3 Anatum - CP1**  
**4 Anatum - CP2**  
**4 Anatum - CP3**

Ici Anatum CP - 1 douteux car le taux de similarité est éloigné de Anatum CP-2 et CP-3

Sous type d'Anatum ?  
Génotype divergent

Sérotype différent ?  
Ex : Enteritidis

➔ Sérotypage de vérification

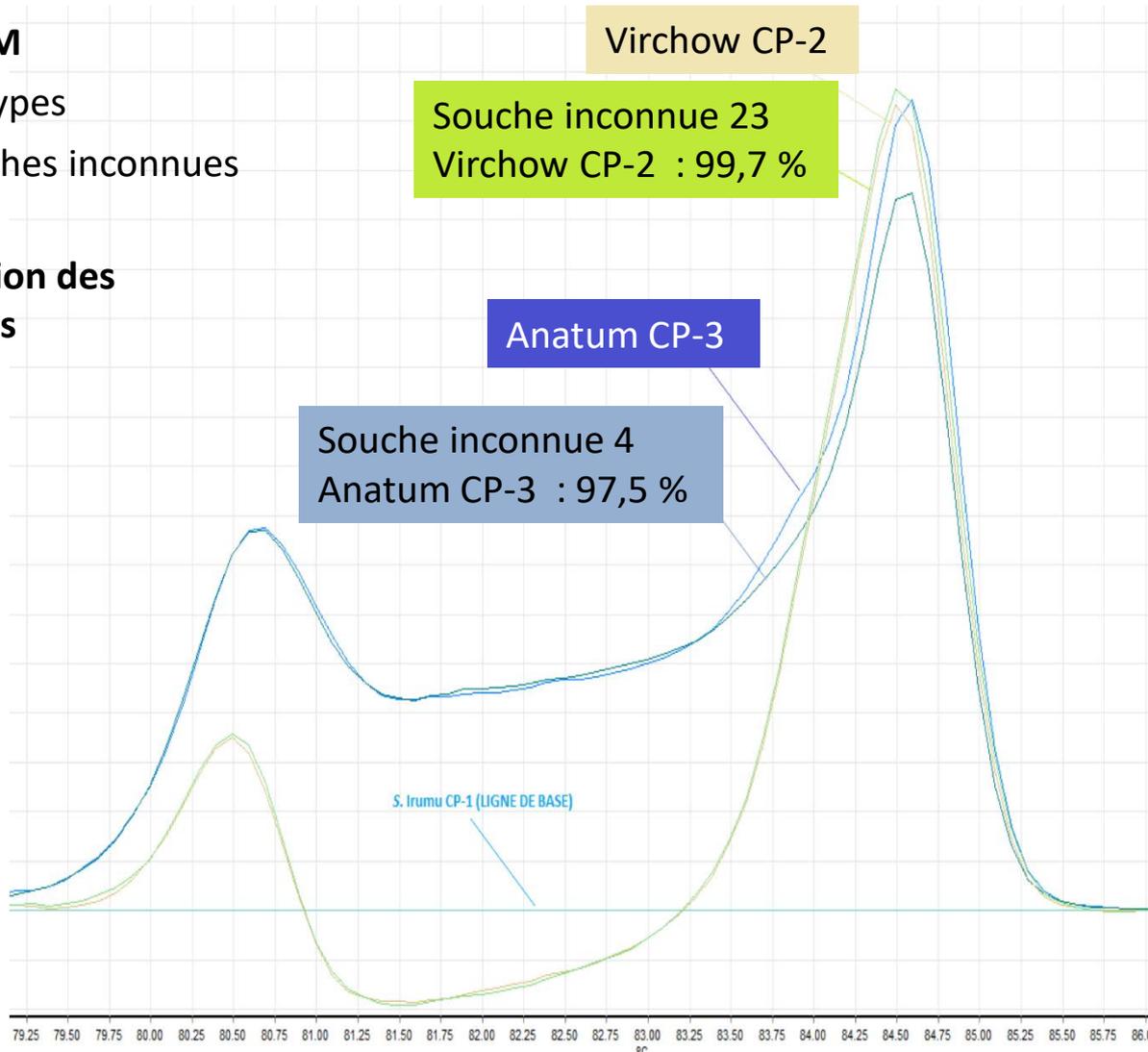
Sérotype Anatum validé  
donc **Anatum CP - 1 validé**

## Test à l'aveugle

### PCR-HRM

- 22 CP types
- 28 souches inconnues

### Vérification des sérotypes



# Résultats - discussions

Test à l'aveugle 28 souches → 100% de réussite

N° souche	Génotype - CP	% de confiance	Sérotype
1	Agona CP-1	98.64	Agona
2	Anatum CP-1	97.98	Anatum
3	Anatum CP-2	99.62	Anatum
4	<b>Anatum-CP3</b>	<b>97.50</b>	<b>Anatum</b>
5	Anatum CP-2	99.30	Anatum
6	Anatum CP-2	99.68	Anatum
7	Anatum CP-1	99.08	Anatum
8	Newport CP-1	99.67	Newport
9	Newport CP-1	98.73	Newport
10	Newport CP-2	97.76	Newport
11	Newport CP-2	99.02	Newport
12	Newport CP-2	98.60	Newport
13	StPaul CP-1	98.97	StPaul
14	Typhimurium CP-1	98.88	Typhimurium
15	Typhimurium CP-3	99.28	Typhimurium
16	Typhimurium CP-3	99.65	Typhimurium
17	Typhimurium CP-3	98.91	Typhimurium
18	Typhimurium CP-2	99.66	Typhimurium
19	Typhimurium CP-2	99.62	Typhimurium
20	Typhimurium CP-2	99.37	Typhimurium
21	Virchow CP-1	98.39	Virchow
22	Virchow CP-1	99.37	Virchow
23	<b>Virchow CP-2</b>	<b>99.77</b>	<b>Virchow</b>
24	Enteritidis CP-1	98.81	Enteritidis
25	Weltevedren CP-1	98.37	Weltevedren
26	Weltevedren CP-1	99.01	Weltevedren
27	Kentucky CP-1	99.11	Kentucky
28	Livingstone CP-1	99.89	Livingstone

Taux de similarité le plus faible

→ 97,50 %



**Pas de seuil défini a priori**

L'opérateur estime la fiabilité en comparant les taux de similarité des CP

Ex : deux CP distincts avec taux de similarité supérieur à 90 % pour la même souche



← Typage douteux

**Sérotypage de confirmation**

# Conclusions - Perspectives

## Technique

- **Evaluer la répétabilité de la méthode**
  - Stabilité des résultats pour le même échantillon dans les mêmes conditions
- **Evaluer la reproductibilité de la méthode**
  - Stabilité des résultats pour le même échantillon par un autre laboratoire (opérateurs différents, matériels différents, protocole identique)
- **Enrichir la base de données : souches issues de contextes différents**
  - Continuer à évaluer le pouvoir discriminant
- **Tester la PCR sur suspension bactérienne calibrée**
  - S'affranchir de l'étape d'extraction d'ADN

# Conclusions - Perspectives

Technique **fiable, rapide** et **10X moins chère** que le sérotypage

- Limites**
- Disposer d'un espace dédié à la PCR
  - Investissement dans une PCR en temps réel ( 20 000 euros)
  - Formation du personnel à la biologie moléculaire
  - Nécessiter de passer les étalons à chaque amplification

## Applications

### Suivi exhaustif à grande échelle de la chaîne alimentaire

- **Etat des lieux sanitaire** et mesures correctives
- **Dispersion spatio-temporelle des souches**

**Coût abordable**

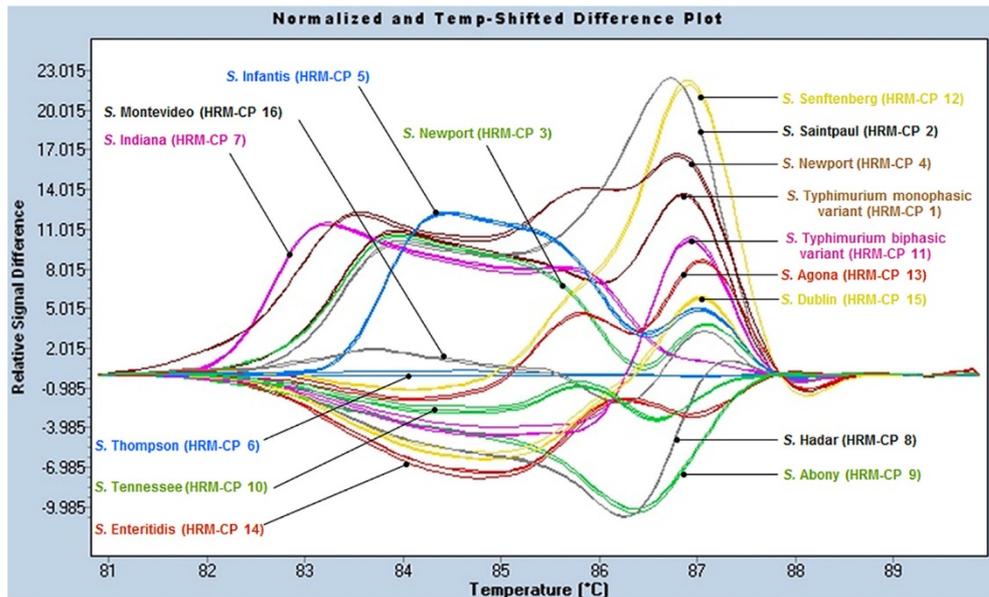
Filières : élevages, transport, animaux,  
abattoirs, produits, environnement...

Sérotypage : technique de référence

Validation des CP

Caractérisation des  
souches atypiques

# Merci de votre attention



## Centre National de Référence des *Salmonella*

Exhaustivité :

**66 % des salmonelloses**

Métropole et DOM TOM  
(2002-2010)

## Réseau *Salmonella*

Alerte produit, épidémie,  
diagnostic en élevage,  
autocontrôles

Les salmonelloses sont

- soit **sporadiques**
- soit liées à une **Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC)**

### USA

par an  
Scallan *et al.*

**1,2 millions** de cas de **toxi-infections**  
**23 000 hospitalisations**  
**450 morts**

### Europe

par an  
EFSA

**100 000 cas humains** sont signalés  
charge économique associée → **3 milliards d'euros par an**

### France

Van Cauteren  
*et al.* 2015

**4305 hospitalisations** en moyenne/an entre 2008 et 2015



Mise en place de **systèmes nationaux de surveillance**  
**CNR et ANSES**

### OBJECTIFS

- Suivi de la dispersion spatio-temporelles des souches
- Investigations et Prévention des TIAC
- Améliorations des conditions sanitaires des filières



**Identification précise des souches**  
**IMPERATIF**

## Réservoir principal

**Tube digestif** de la plupart des animaux domestiques et sauvages

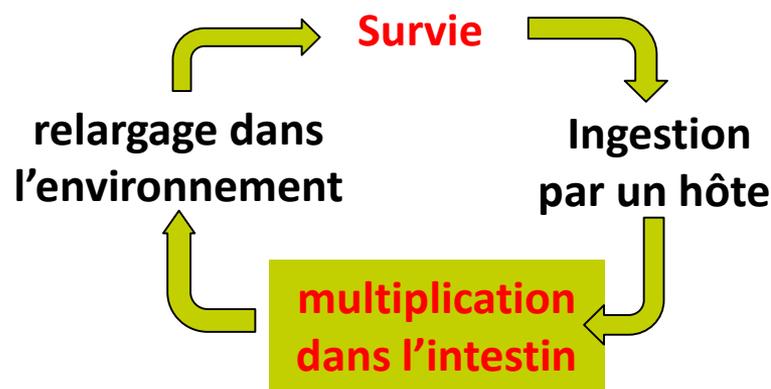
destinés à l'**alimentation humaine**  
volailles, porcs et bovins,

**animaux de compagnie**  
chats, chiens, oiseaux et reptiles  
(ex : tortues...)

## Réservoirs secondaires

- ne s'y multiplient que rarement
- peuvent y survivre très longtemps

- ex : dans un plat préparé mal conservé
- ex : plus d'un an sur
  - des poussières
  - des effluents d'élevage (lisiers...)



## 2 réseaux complémentaires en France

surveillance des souches d'origine

**Humaine**

**Non - Humaine**

**Centre National de  
Référence des *Salmonella***

**Institut Pasteur de Paris/ InVS**

**+ 1400 laboratoires d'analyses médicales  
volontaires (privés et publics)**

**Réseau Salmonella**

**ANSES + 140 laboratoires  
volontaires (privés et publics)**  
*Salmonella* isolées  
de la **chaîne alimentaire**

**Collaboration**

Données

- épidémiologiques
- caractérisation des souches

**OBJECTIFS**

**Suivi de la dispersion spatio-temporelles des souches**  
**Investigations et Prévention des TIAC**  
**Améliorations des conditions sanitaires des filières**



nécessite

**Identification précise des souches**

# Sérotypage par agglutination

La technique de référence...

...mais difficile à mettre en œuvre en autocontrôle de routine

## Disponibilités des sérums :

200 sérums nécessaires au sérotypage complet d'une souche de *Salmonella*



Seulement 85 sérums commercialisés (Biorad)

## Coût des sérums :

Entre 44 et 150 euros le flacon pour 60 typages environ (tarifs à La Réunion)

## Gestions des stocks :

Maintien d'une collection minimale opérationnelle de sérums permettant le typage complet des sérovars les plus courants



Péréemption

## Contrainte technique :

Technique fastidieuse demandant un personnel spécialement formé et entraîné

## Alternative : faire appel à un prestataire

CNR *Salmonella*, ANSES, Laboratoires Vétérinaire Départementaux...



Couts et délais de réponses importants

**Freins pour le suivi exhaustif et précis de la chaîne alimentaire**

# Typage par PCR - HRM des salmonelles

## Conclusions

### Sur le plan technique

#### Résultats positifs et perspectives prometteuses

- En terme
- de **spécificité** et de **congruence** avec le sérotypage
  - de **temps d'analyse : 2 h HRM / 2 jours sérotypage**  
(voir qqs semaines si prestation)

### Sur le plan financier

#### Coût du sérotypage

« Fait maison » | ex : *S. Typhymurium* : **23,50 € TTC**  
Coût d'un plateau de sérums (*a minima* /ANSES) : **11 176 € TTC** 

Prestation de services | Non-certifié (LVD) : **59 € HT /souche**  
Certifié (ANSES) : **79,58 € HT /souche** Urgence :  
Possibilité d'abonnement : ↘ **12 € HT /souche**



Expédition de produits biologiques à risque infectieux  
Envoi sous triple emballage

**1000 € HT /colis**



# Le typage par HRM de salmonelles

## Cycling :

Pré- dénaturation : **95°C, 10 min**

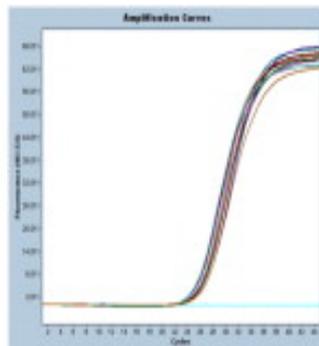
Dénaturation :	<b>95°C, 10 s</b>	30 cycles
Hybridation :	<b>55°C, 10 s</b>	
Elongation :	<b>72°C, 10 s</b>	

HRM de **65°C à 95°C**, palier de **0,1°C**

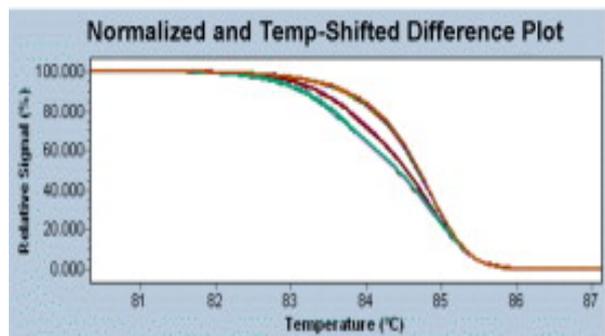
# Le typage par HRM de salmonelles

## Ajustement et identification de « Cuve-Profile »

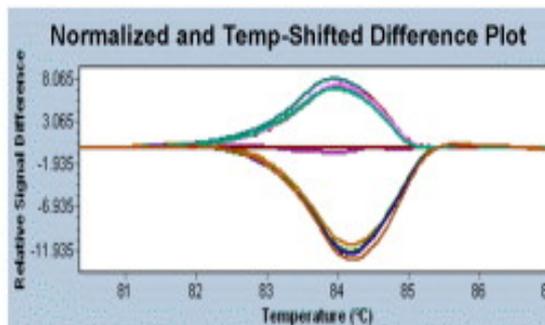
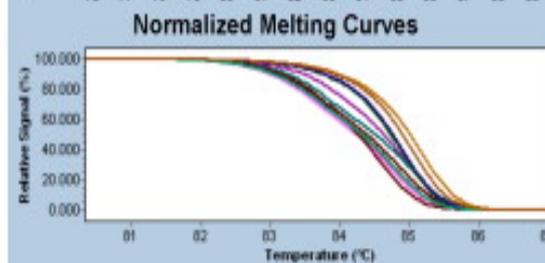
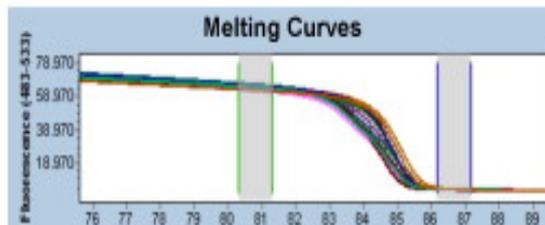
### 1. Validation des amplifications



- Normalization
- Temperature Shift
- Difference Plot



### 2. Analyse en gene scanning



Durée totale pour typer  
**70 souches** → **2 h env**