

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

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

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^{ème} 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

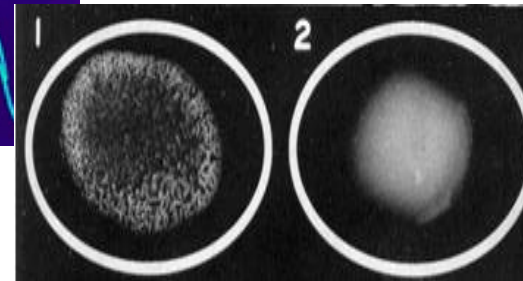
Sérotypage classique
par agglutination

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

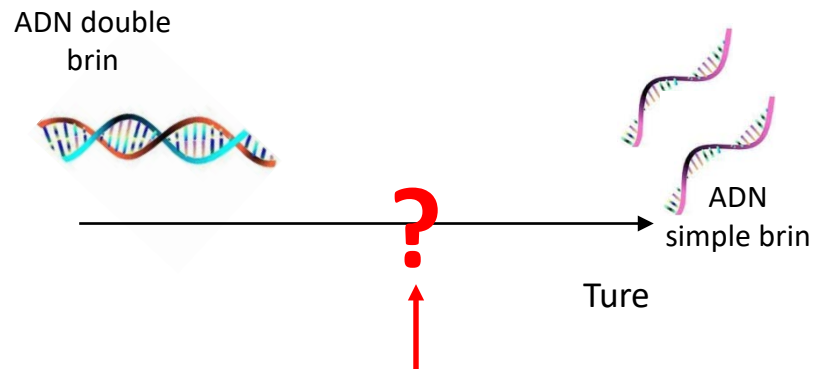
A valider sur plus de sérotypes et plus de souches

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.



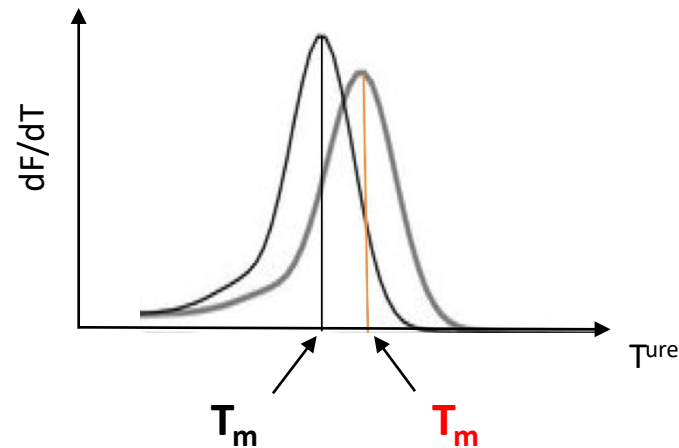
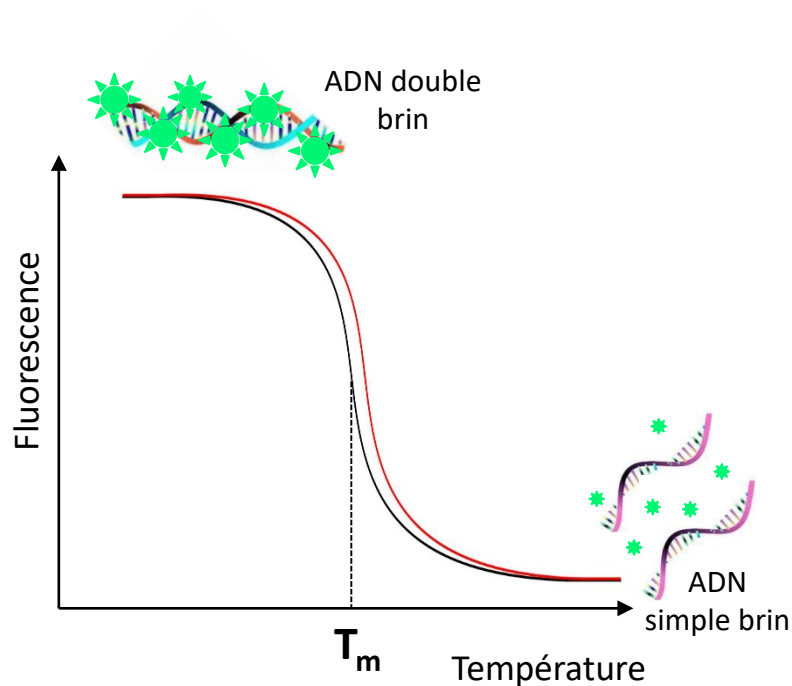
T_m = température à laquelle
50% double brin et 50% simple brin

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.



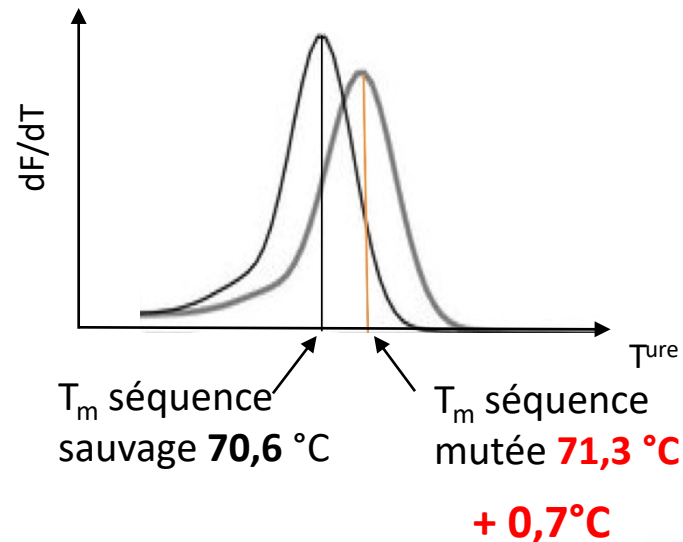
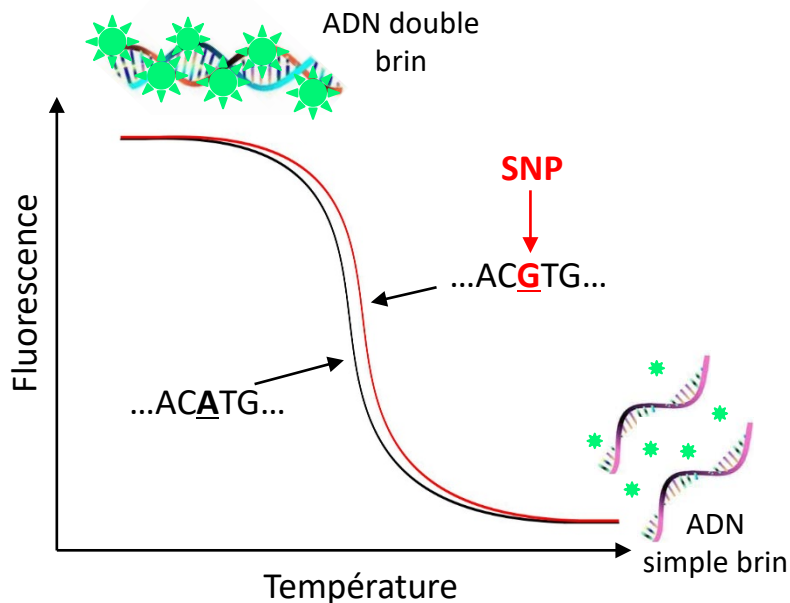
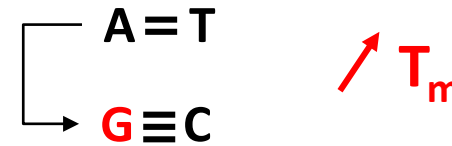
Le typage par PCR - HRM

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/ μ 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

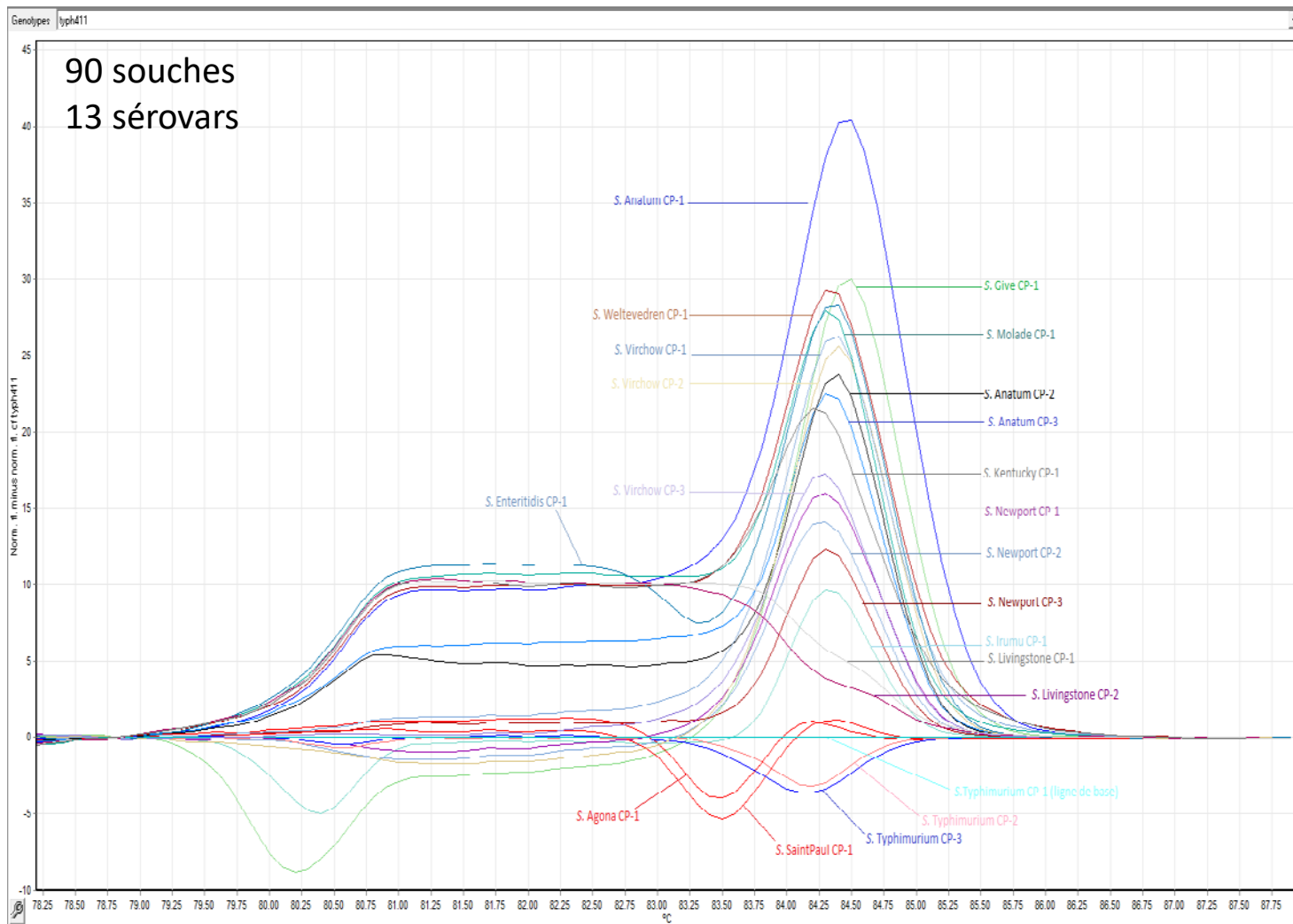
90 souches

13 sérovars

Résultats - discussions

Détermination des profils HRM : les CP (Curve Profile)

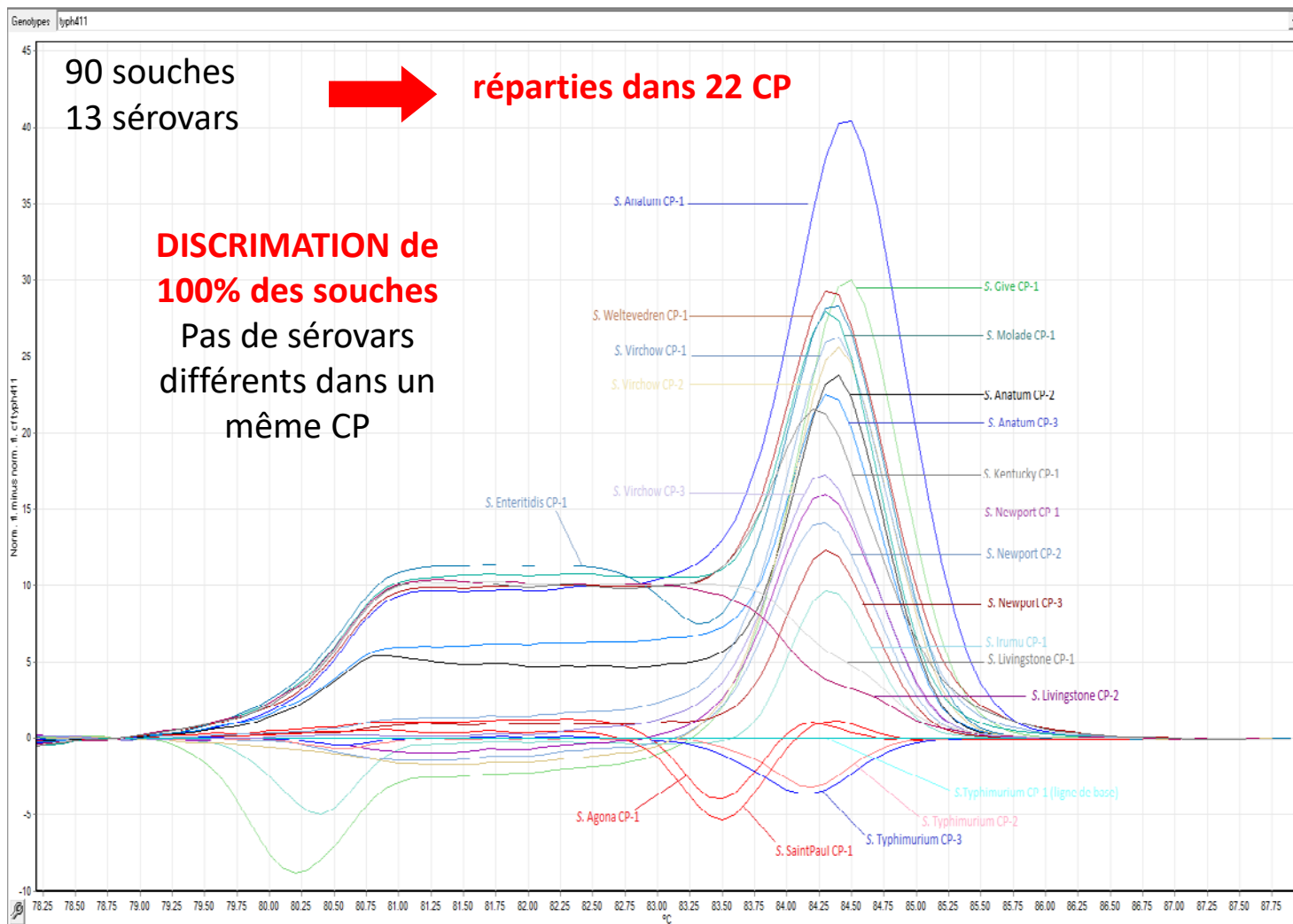
Chaque souche de sérotype connu se voit attribuer un CP servant de référence



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

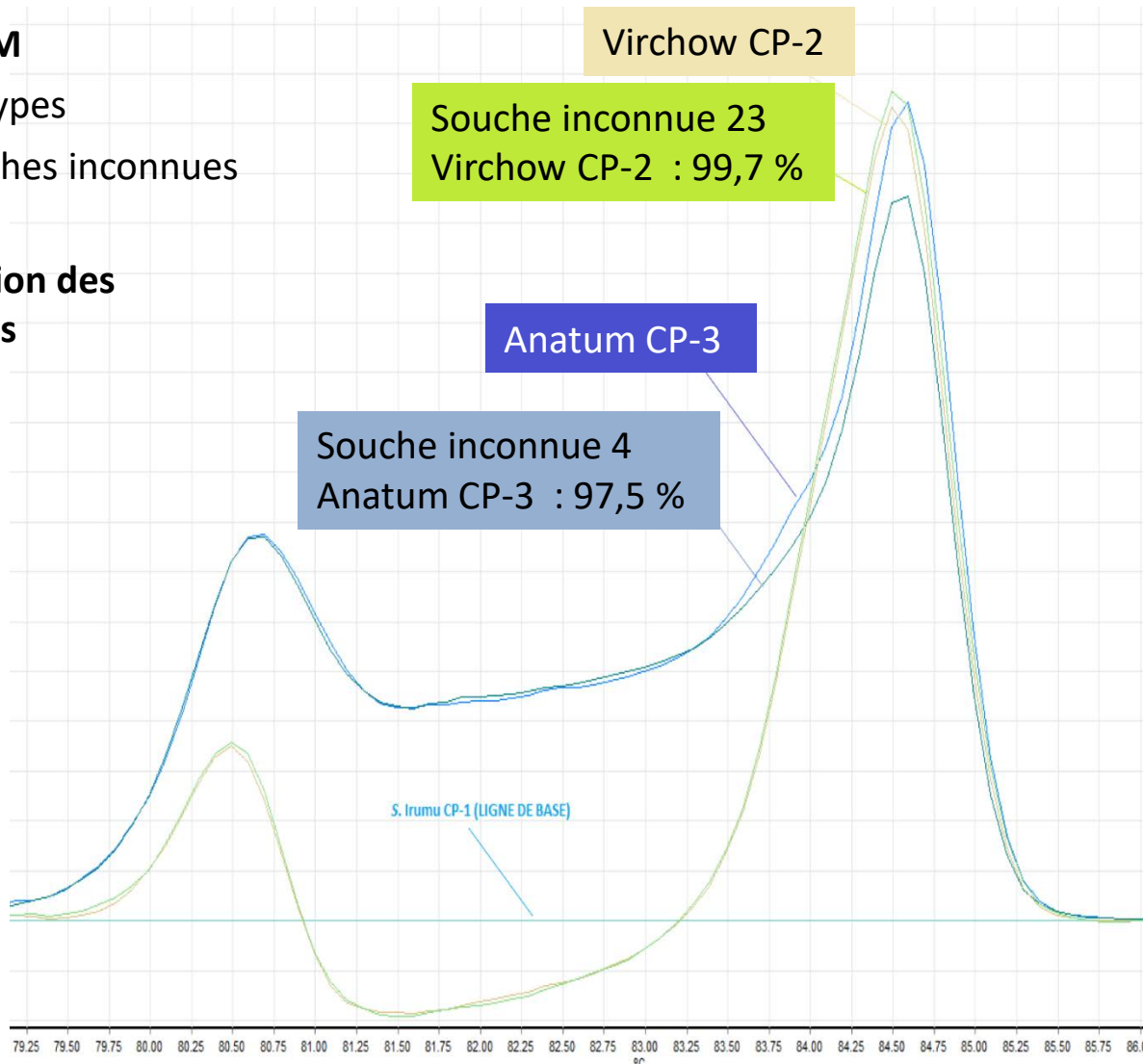
Sérotype Anatum validé
donc **Anatum CP - 1 validé**

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	Anatum-CP3	97.50	Anatum
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	Virchow CP-2	99.77	Virchow
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

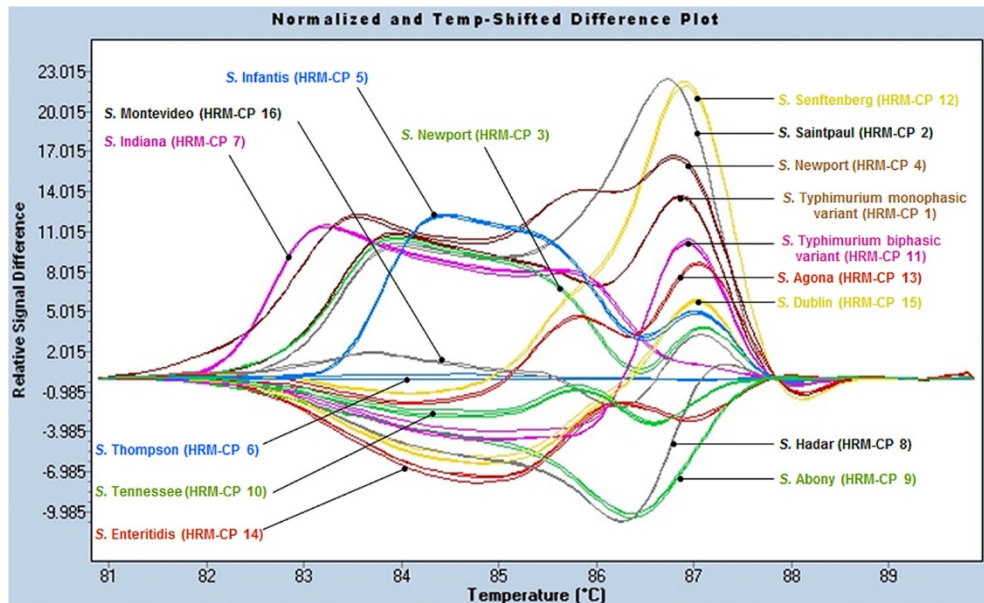
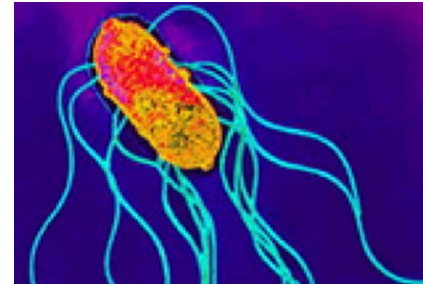
Filières : élevages, transport, animaux,
abattoirs, produits, environnement...

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

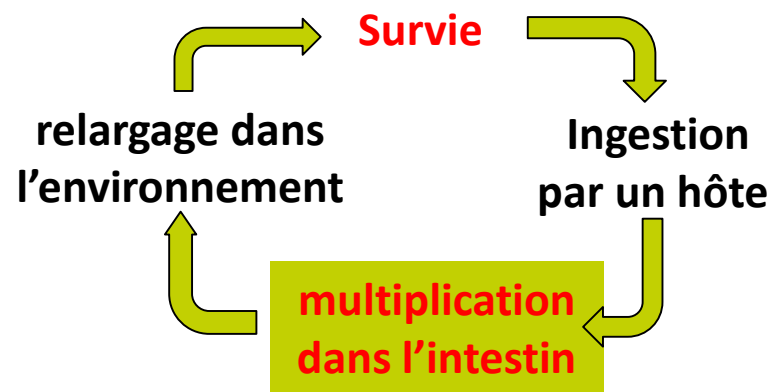
destinés à l'**alimentation humaine**
volailles, porcs et bovins,

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



Péremption

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**

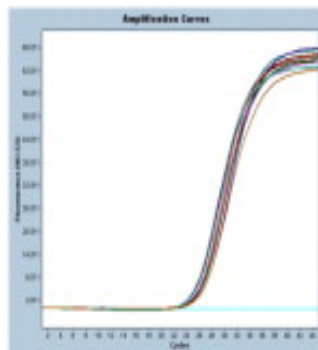
Dénaturation :	95°C, 10 s	30 cycles
Hybridation :	55°C, 10 s	
Elongation :	72°C, 10 s	

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

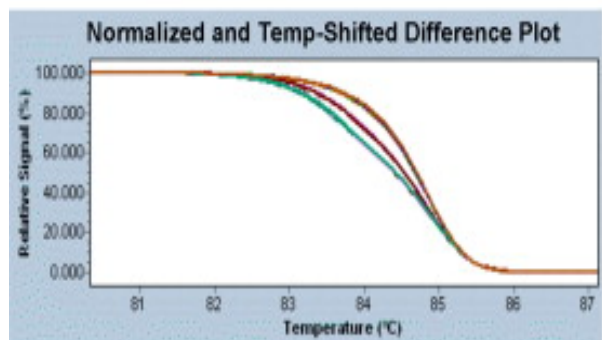
Le typage par HRM de salmonelles

Ajustement et identification de « Cuve-Profile »

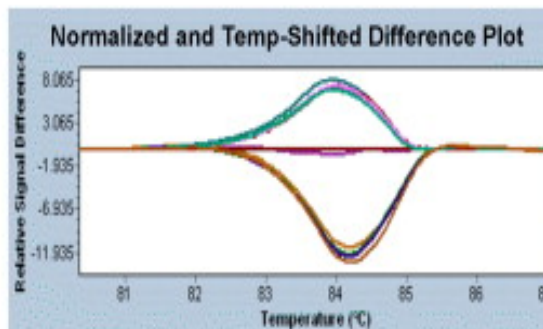
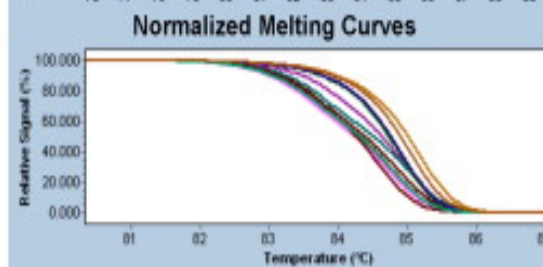
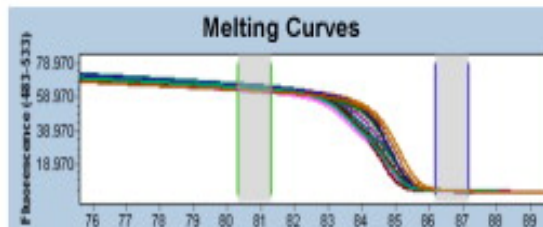
1. Validation des amplifications



- Normalization
- Temperature Shift
- Difference Plot



2. Analyse en gene scanning



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