

ABRÉVIATIONS

A :	Acceptable
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ag:	Antigène
AGISAR :	WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance
AGISAR :	Groupe consultatif de l'OMS sur la surveillance intégrée de la résistance aux antimicrobiens
Ala :	Alanine
AM:	amoxicilline
AMC :	amoxicilline + acide clavulanique
AN :	amikacine
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail
Arg :	Arginine
ARN :	Acide Ribonucléique
ASN :	Association Sénégalaise de Normalisation
Asn :	Asparagine
Asp :	Acide aspartique
BCP :	Bromocrésol pourpre
BET :	Bromure d'éthidium
BLAST :	Basic local alignment search tool
BLSE:	bêtalactamases à spectre élargi
C :	Chloramphénicol
CASFM :	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CAZ :	Céftazidime
CEDEAO :	Communauté Economique Des Etats de l'Afrique de l'Ouest
CF :	Céfalotine
C3G :	Céphalosporines de troisième génération
CIN :	Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine
CIP :	Ciprofloxacine
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CNA :	Centre National d'Aviculture
CNCA :	Comité National du Codex Alimentarius
CNR:	Centre National de référence
CRISPR:	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPOL:	Clustered Regularly Interspaced short palindromic repeats Polymorphism
CTX :	Céfotaxime
Cys :	Cytosine
DO:	Densité optique
DT:	Definitive phage type
EDES :	Association Interprofessionnelle pour la promotion des échanges ACP-UE de fruits, légumes, fleurs et plantes
EI :	Elevage industriel
EISMV:	Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar
ESI :	Elevage semi industriel
ET :	Elevage traditionnel
FAO :	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FCFA :	Franc des Communautés Financières d'Afrique
<i>fli</i> :	gènes de flagellines
FOX :	Céfoxitine

Gln :	Glutamine
Glu :	Acide glutamique
Gly :	Glycine
GM:	gentamicine
I :	Intermédiaire
IFT:	Institute of Food Technologists
Ile :	Isoleucine
IMP:	Imipénème
<i>intl</i> :	gène de l'intégrase
<i>inv</i>:	invasion
ISO:	International Organization for Standardization
LB :	Lysogeny Broth
LBA :	Lysogeny Broth Agar
Leu :	Leucine
LSAHE:	Laboratoire de sécurité alimentaire et d'hygiène de l'environnement
Lys :	Lysine
MDR region:	Multi-drug resistance region
MKTTn :	Muller-Kauffman au tétrationate-novobiocine
MLST :	Multilocus Sequence Typing
MLVA:	Multi Locus Variable Analysis
MOA :	Maladies d'origine alimentaire
Mq :	Marqueur de taille
N :	Nombre
NA :	acide nalidixique
NCBI :	National Center for Biotechnology Information
NOR :	norfloxacin
NS :	Non satisfaisant
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF:	Open reading frame
p :	plasmide
pb :	paire de base
PC :	Poulet de chair
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFGE:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
Phe :	Phénylalanine
PIB:	produit intérieur brut
<i>Pip</i>:	pathogenicity island-encoded proteins
PMQR :	Plasmid mediated quinolone resistance
PP :	Poulet du pays
PPR :	Poulet de ponte réformé
Pro :	Proline
PVD :	Pays en voie de développement
<i>qnr</i> :	quinolone resistance
QRDR:	Quinolone-Resistance-Determining Region
RIIP :	Réseau International des Instituts Pasteur
<i>rpoB</i> :	RNA polymérase
<i>rrs</i> :	<i>16S-rRNA</i>
RVS :	Rappaport-Vassiliadis Soja
SDE:	Sénégalaise Des Eaux
Ser :	Sérine

SGI :	Salmonelles porté par l'îlot génomique
SPI :	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
Spv :	<i>Salmonella</i> plasmid virulence
SSA :	Sécurité Sanitaire des Aliments
ST :	Séquence type
sulf :	gène de résistance aux sulfamides
SXT :	triméthoprim + sulfaméthoxazole
TAE :	Tris-acetate EDTA
TBE :	Tris-borate-EDTA
TE :	tétracycline
TIAC :	Toxi-infection alimentaire collective
TIC :	ticarcilline
Thr :	Threonine
Tm :	Température d'hybridation
Tn :	transposon
Tyr :	Tyrosine
U :	Urbaine
UA :	Union Africaine
UBPE :	Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques
UEMOA :	Union Economique et Monétaire Ouest Africaine
Unps :	Union Nationale des Provendiers du Sénégal
USA :	United States of America
Val :	Valine
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VNTR :	Variable numbers of tandem repeats
WGS :	Whole Genome Sequencing.
XLD :	Xylose Lysine Désoxycholate

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Illustration d'une pratique de plumage manuel	17
Figure 2: Illustration d'une pratique de plumage manuel	18
Figure 3: Cycle de diffusion des salmonelles dans l'environnement	24
Figure 4 : Structure génétique de SGI1	27
Figure 5 : Mécanisme de résistance aux quinolones et fluoroquinolones	29
Figure 6 : Vente de poulets au Sénégal	37
Figure 7 : Emplacement de Sangalkam et de Keur massar et une photo d'une ferme à Sangalkam	39
Figure 8 : Répartition des bactéries entéro-pathogènes isolées des selles au centre de santé Baye Talla Diop de Pikine	43
Figure 9 : Répartition des bactéries entéro-pathogènes isolées des selles de patients au Dispensaire St Martin de Rebeuss	44
Figure 10 : Distribution des sérovars de <i>Salmonella</i> d'origine humaine	46
Figure 11 : Répartition mensuelle des salmonelles d'origine humaine	46
Figure 12 : Pourcentage de résistance des salmonelles d'origine humaine	47
Figure 13 : Prévalence des salmonelles isolées au niveau des poulets en fonction des marchés de Dakar	51
Figure 14 : Variation des sérovars d'origine alimentaire	52
Figure 15: Variations mensuelle des salmonelles isolées des carcasses de poulets	52
Figure 16: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des salmonelles d'origine alimentaire	55
Figure 17 : Photo de ferme à hygiène acceptable.....	56
Figure 18: Photo de ferme à hygiène non satisfaisante	57
Figure 19 : Répartition des sérovars de <i>Salmonella</i> dans les élevages de poulet de chair de la zone péri-urbaine de Dakar	58
Figure 20 : Variations mensuelle des salmonelles d'origine animale (2012-2013)	58
Figure 21 : Pourcentage de résistance des salmonelles aux antibiotiques	60
Figure 22 : Photo de CMI de la CIP et de NA des souches de <i>salmonella</i> Nal ^R	62
Figure 23 : Bande des gènes <i>ParC</i> , <i>ParE</i> , <i>intI1</i>	78
Figure 24 : Bande du gène <i>aac(6')-Ib</i>	79
Figure 25: Bande du gène <i>qnrD</i>	79
Figure 26 : Bande des gènes <i>gyrB</i> et <i>orf4/sul1</i>	79
Figure 27: Résultats des PCR positives pour les facteurs de virulence <i>OrfL</i> , <i>invA</i> , <i>pipD</i> , <i>spvR</i>	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Répartition des patients par tranche d'âge au Dispensaire St Martin de Rebeuss .	42
Tableau II : Répartition des parasites retrouvés dans les selles	42
Tableau III : Répartition des adénovirus et des rotavirus identifiés au Dispensaire St Martin de Rebeuss.....	43
Tableau IV: Distribution des sérotypes de <i>Salmonella</i> isolées au Dispensaire S ^t Martin de Rebeuss.....	44
Tableau V : Répartition des sérotypes de salmonelles isolées des selles de patients au Laboratoire de Biologie Médicale.....	45
Tableau VI : Profils de résistance des souches de <i>Salmonella</i> isolées des selles humaines. ...	48
Tableau VII : Les sites de vente et la provenance des poulets à Dakar	49
Tableau VIII : Profils de résistance des salmonelles d'origine alimentaire	54
Tableau IX: Descriptions des élevages de poulet de chair visités dans la zone périurbaine de Dakar.	56
Tableau X : Profils de résistance des souches de <i>Salmonella</i> isolées des fientes de poulets...	59
Tableau XI : Détermination des CMI de salmonelles NA ^R et CIP ^R	61
Tableau XII: Résultats de l'antibiogramme des transconjugants de 10 souches de salmonelles	63
Tableau XIII : Liste des amorces pour la recherche des gènes de résistance aux quinolones .	72
Tableau XIV: Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de <i>Salmonella</i>	72
Tableau XV: Liste des amorces pour la caractérisation des intégrons de classes 1 et 2	73
Tableau XVI: Liste des amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulence	74
Tableau XVII : Profil de résistance des souches et cassettes au niveau des intégrons de classe 1	75
Tableau XVIII : Mutations du gène <i>gyrB</i>	77
Tableau XIX : Mutations du gène <i>parE</i>	78
Tableau XX: Répartition des déterminants génétiques de la résistance et de la virulence des salmonelles au niveau humaine, animale et alimentaire	82

Sommaire

Introduction	1
Première Partie :	7
GENERALITES	7
 Chapitre I : Sécurité sanitaire des aliments	8
1. Définition	8
2. Historique	8
3. Importance de la sécurité sanitaire des aliments au Sénégal	8
4. Situation dans le contexte international	9
5. Situation des maladies d'origine alimentaire dans les pays en voie de développement (PVD)	10
6. Problématique de l'émergence de nouveaux pathogènes d'origine alimentaire	11
7. Conseils pratiques donnés par l'OMS pour se protéger des maladies d'origine alimentaire	12
 Chapitre II: L'aviculture au Sénégal	14
I. AVICULTURE ET PRODUCTION DE LA VIANDE DE POULET AU SENEGAL	14
1. Introduction	14
2. Les types d'élevage de poulet de chair	14
3. Caractéristiques de l'aviculture moderne	14
4. Importance économique de l'aviculture moderne au Sénégal	15
5. Aviculture traditionnelle au Sénégal	16
6. Importance socio-économique de l'aviculture	16
II. DE L'ABATTOIR A LA VENTE DE LA VIANDE DE POULET AU SENEGAL	16
1. Introduction	16
2. Types de poulets commercialisés	16
3. Les abatteurs	17
4. Les transformateurs	17
5. La commercialisation	18
 Chapitre III : <i>Salmonella</i> et antibiorésistance	19
I. GENERALITES SUR SALMONELLA	19
1. Définition et classification	19
2. Caractères bactériologiques	19
2.1. Morphologie	19
2.2. Culture	19
3. Caractères biochimiques	19
4. Diagnostic	20
4.1. Diagnostic bactériologique	20
4.1.1. Conditions et milieux de culture	20
4.1.2. Morphologie des colonies	20
4.1.3. Identification	20
4.1.3.1. Tests biochimiques	20
4.1.3.2. Sérotypage	20
a) Le typage antigénique	20
b) Le typage moléculaire ou génomique	20
4.2. Diagnostic moléculaire	22
5. Epidémiologie	22
5.1 Réservoir de la maladie et contamination humaine	22

5.2 Survie et diffusion dans l'environnement	23
6. Déterminants génétiques de la virulence chez <i>Salmonella</i>	24
6.1 Facteurs de virulence.....	24
6.2. Îlots de pathogénicité	24
6.3 Plasmide de virulence.....	25
II. ANTIBIORESISTANCE	26
1. Résistance des salmonelles aux antibiotiques	26
1.1 Les îlots génomiques de résistance (SGI)	26
1.2 Problèmes posés par SGI1	27
2. Mécanisme de résistance des salmonelles aux quinolones	28
2.1 Introduction	28
2.2 Quinolones, fluoroquinolones	28
2.2.1 Introduction	28
2.2.2 Cible des quinolones	28
2.2.3 Classification.....	28
2.3 Mécanisme d'action des quinolones et fluoroquinolones.....	28
2.3.1 Pénétration dans la bactérie.....	28
2.3.2 Action intracellulaire.....	28
2.4 Mécanismes de résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones.....	29
3. Problématique de l'antibiorésistance des souches de <i>Salmonella</i>	30
Deuxième Partie :	31
Etude Expérimentale	31
PRESENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE	32
I. Matériel biologique.....	34
II.Méthodologie.....	34
A. RECHERCHE DES ETIOLOGIES DES DIARRHEES	34
1. Introduction	34
2. Méthodes	34
2.1 Méthode d'échantillonnage	34
2.2 Recueil et validation des données	34
2.3 Diagnostic.....	34
2.3.1 Examen parasitologique des selles.....	34
2.3.2 Examen virologique des selles	35
2.3.3 La coproculture	35
2.3.3.1 Isolement et identification	35
2.3.3.2 Sérotypage.....	35
2.3.3.3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	36
2.3.3.4 Analyse des données	36
B. EVALUATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION PAR LES SALMONELLES DES POULETS VENDUS A DAKAR.....	36
1. Introduction	36
2. Recherche des salmonelles au niveau des poulets vendus à Dakar.....	36
2.1 Méthode d'échantillonnage	36
2.2 Méthodologie au laboratoire d'analyse	37
2.2.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide (eau peptonée).....	37
2.2.2 Enrichissement en milieu sélectif.....	37
2.2.3 Isolement et identification	38
2.2.4 Confirmation	38
2.2.5 Sérotypage, détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques	38
2.3 Recueil et validation des données	38

C. ÉVALUATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION DES ELEVAGES DE POULET DE CHAIR PAR LES SALMONELLES	38
1. Méthode d'échantillonnage	38
2. Méthodes bactériologiques	39
2.1 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide	40
2.2 Enrichissement en milieu sélectif	40
2.3 Isolement et identification	40
2.4 Confirmation	40
2.5 Sérotypage, détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques	40
3. Recueil et validation des données	40
D. DETERMINATION DES CMI ET CONJUGAISON BACTERIENNE	41
1. Détermination des CMI	41
2. Conjugaison bactérienne	41
III. Résultats, discussion et conclusion	41
1. RESULTATS GLOBAUX	41
1.1 Recherche des étiologies des diarrhées	41
1.1.1 Population d'étude	41
1.1.2 Résultats microbiologiques	42
1.1.3 Distribution des sérovars de salmonelles	45
1.1.4 Antibiorésistance des souches de salmonelles	47
1.2. Evaluation du niveau de contamination par les salmonelles des poulets vendus en étalage	48
1.2.1 Description des sites de vente et d'élevage des poulets à Dakar	48
1.2.2 Type de poulets vendus et niveau de contamination	50
1.2.3 Distribution des sérovars	51
1.2.4 Antibiorésistance	53
1.3. Evaluation du niveau de contamination des élevages de poulet de chair par les salmonelles	55
1.3.1 Description des élevages de poulets	55
1.3.2 Distribution des sérovars	57
1.3.3 Antibiorésistance	58
1.4. Résultats des CMI et de la conjugaison bactérienne	60
2. DISCUSSION	64
3. CONCLUSION	69
I. Matériel biologique	71
II. Méthodologie	71
1. INTRODUCTION	71
2. METHODES	71
2.1 Extraction d'ADN	71
2.2 Détection des déterminants génétiques de la résistance	71
2.2.1 Détection des gènes de résistance aux quinolones	71
2.2.2 Détection des intégrons et des cassettes	72
2.3 Détection des déterminants génétiques de la virulence des salmonelles	74
2.3.1 Introduction	74
2.3.2 Détection des gènes de virulence	74
III. Résultats, discussion et conclusion	75
A. RESULTATS	75
1. Caractérisation des intégrons	75
2. Détection des gènes de résistances aux quinolones	76
3. Détection des gènes de virulence	80
4. Comparaison des gènes de résistance et de virulence des salmonelles au niveau des trois secteurs	80

B. DISCUSSION	83
C. CONCLUSION	87
Conclusion générale	90
et perspectives	90
Références	93
Bibliographiques	93
Webographie	101
Annexes	103
Résumé	159

Introduction

Le risque de transmission des bactéries zoonotiques a augmenté à cause de la mondialisation du commerce des denrées alimentaires, les changements dans les systèmes de production des aliments, les modifications des procédés agronomiques. Actuellement la sécurité sanitaire des aliments est au centre des préoccupations des consommateurs et demeure l'enjeu du secteur agro-alimentaire. Selon l'OMS la sécurité sanitaire des aliments englobe toutes les mesures destinées à consommer des aliments sains. Les politiques et les mesures appliquées en la matière doivent porter sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation (OMS, 2015a). Dans le cadre de la mondialisation, la sécurité sanitaire des aliments est devenue un enjeu international sur le plan de la compétitivité. Au niveau de la consommation locale, la demande est moins exigeante, parce que contrainte par des problèmes financiers, n'incite pas à accorder toute l'importance requise au concept de sécurité sanitaire des aliments.

Les maladies transmissibles par les aliments sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité dans le monde. L'OMS estime que 70% des 1,5 milliard de cas de diarrhées recensés chaque année dans le monde peuvent être attribués à une contamination biologique des aliments (OMS, 2007). Actuellement aux Etats Unis une personne sur six souffre chaque année d'une maladie d'origine alimentaire (MOA) (Institute of Food Technologists, 2015). En Angleterre et au pays de Galles, on recense 2 366 000 cas, 21 138 hospitalisations et 718 décès par an (Adak, 2002). En France l'augmentation constante des repas pris au restaurant participe aussi à l'évolution des MOA: près de 65% des foyers déclarés en 2010 sont survenus en restauration collective (Institut de veille sanitaire, 2011).

Selon l'OMS, chaque année 1 personne sur 10 tombe malade en consommant des aliments contaminés et que 420 000 en meurent. Les enfants de moins de 5 ans sont particulièrement exposés et chaque année 125 000 décèdent en raison de ces maladies. C'est en Afrique et l'Asie du Sud-Est que la charge ces maladies est la plus élevée (OMS, 2015b).

En Afrique sub-saharienne, la prévalence des maladies d'origine alimentaire a considérablement augmentée au cours des deux dernières décennies du fait de l'urbanisation, de la modification des systèmes écologiques et microbiologiques et des changements directement liés à la dégradation des systèmes d'assainissement et de l'environnement humain immédiat¹.

Les risques de contamination des aliments sont de plus en plus élevés à cause de la globalisation et de l'utilisation de la biotechnologie. L'usage des pesticides, la mauvaise

¹ <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/meetings/2005/italy>

gestion des déchets, les aliments de la rue contribuent à la contamination des aliments (Aidara, 2012).

Les maladies d'origine alimentaire sont généralement d'origine infectieuse ou toxique. Ces maladies peuvent être provoquées par des bactéries du genre *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, certaines espèces du genre *Vibrio*, des virus et des parasites ou des substances chimiques qui pénètrent dans l'organisme par le biais d'eau ou d'aliments contaminés.

En Afrique de l'Ouest y compris le Sénégal les salmonelles mineurs ou non typhoidiques sont les principales causes de gastroentérites chez les enfants et les adultes vivants avec le VIH (Seydi et al., 2005, 2008). En 2010 une étude a été réalisée sur les étiologies des diarrhées à Dakar et sa banlieue ; la prévalence des salmonelles était de 4,7% (Sambe-Ba et al., 2013). *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis sont les sérotypes les plus fréquemment retrouvés au Sénégal (Fall-Niang et al., 2013 ; Seydi et al., 2005 ; 2008).

Au Sénégal, en 2005, avec l'arrêt des importations de la viande de volaille ; suite aux menaces de la grippe aviaire, le secteur avicole a fait preuve d'un réel dynamisme et a connu un essor remarquable. La production locale de viande de volaille a été de 28 688 tonnes en 2011, représentant à la vente au détail, un chiffre d'affaire de 43,032 milliards de francs FCFA. la filière avicole est confrontée à des contraintes telles que le manque d'organisation de la profession et les difficultés de commercialisation (Duteurtre et al., 2005). La production de poulet de chair souffre notamment de l'absence d'abattoir moderne. Plus généralement, le secteur de l'aviculture n'occupe pas une place importante dans la politique du Gouvernement en matière d'élevage (Gaye, 2004). Au Sénégal, plusieurs études ont été réalisées sur la qualité microbiologique des aliments.

En Casamance une étude de Dione montrait que les même sérovars de salmonelles étaient retrouvés aussi bien des fèces et des carcasses de poulets. Les sérovars Brancaster (57,9%), Goelzau (10,7%), Kentucky (8,4%) et Hadar (7,3%) étaient majoritaire (Dione et al, 2009). On note aussi l'émergence de *Salmonella enterica* sérovar (Kentucky ST198, Agona ST13 et Istanbul ST33) dans la filière avicole (carcasses de poulets) au Sénégal Dione et al., 2012.

Afin de limiter l'influence négative des pathologies majeures rencontrées dans les élevages dont les salmonelloses, les éleveurs ont recours à l'utilisation abusive de médicaments vétérinaires, en particulier les antibiotiques (Biagui, 2002). En 2004 BADA-Alamedji et al., ont révélé la présence de résidus d'antibiotiques dans la chair de poulet dans environ 10% des élevages enquêtés. Les risques potentiels liés à la présence des résidus d'antibiotiques sont entre autres, la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques. Des échanges de matériel génétique sont possibles entre ces bactéries entraînant la diffusion des résistances d'un genre

bactérien à un autre et/ou d'un commensale à un pathogène. La conséquence immédiate de la résistance aux antibiotiques est l'échec thérapeutique.

En Afrique du Sud entre 2012 et 2014 une étude de surveillance des salmonelles était faite des fermes aux abattoirs. La prévalence des salmonelles était de 5%, *Salmonella* Enteritidis (21,5%) était majoritaire (Magwedere et *al.*, 2015).

Il s'agit donc d'un réel problème de Santé Publique nécessitant la mise en place d'un système de surveillance efficace permettant le recueil de données à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire, mais aussi à partir de maladies humaines transmissibles par les aliments.

Cela ne peut se faire qu'en mettant en place une surveillance intégrée sur les salmonelles au niveau humain, alimentaire et animal et caractériser au plan moléculaire les souches issues des trois secteurs.

Les bactéries acquièrent la résistance grâce à des éléments génétiques élaborés. La dissémination de cette résistance se fait par l'intermédiaire du chromosome, des plasmides, des transposons, des intégrons et plus récemment les îlots génomiques de résistance décrits chez *Salmonella* (SGI). Ces bactéries résistantes peuvent causer des épidémies mondiales comme le cas de *Salmonella* Typhimurium DT104 (Mather, 2013).

Les souches DT104 présentent un phénotype de résistance à plusieurs antibiotiques appartenant à cinq familles différentes incluant l'ampicilline-amoxicilline, le chloramphénicol-florfenicol, la streptomycine-spectinomycine, les sulfamides et la tétracycline (phénotype ACSSuT). Les gènes de résistance, responsables du phénotype ACSSuT, sont portés par un élément génétique situé au niveau chromosomique nommé SGI1, *Salmonella* Genomic Island 1 (Targant, 2010).

Actuellement, on note l'émergence de souches de salmonelles multirésistantes aux quinolones et aux fluoroquinolones telle que *Salmonella* Kentucky ST198 dans la filière avicole (Le Hello S et *al.*, 2013, Dione et *al.*, 2012). Les quinolones et fluoroquinolones sont des antibiotiques de dernière resort. Elles sont très utilisées en médecine vétérinaire dans les élevages de poulets. C'est pourquoi, dans notre travail nous nous sommes intéressés spécifiquement aux mécanismes de résistance des salmonelles vis-à-vis des quinolones et fluoroquinolones.

Les résistances aux quinolones et fluoroquinolones surviennent principalement par mutations successives au niveau des gènes chromosomiques (*gyr*, *par*). Plus récemment, trois familles de gènes de résistance de support plasmidique, transférables horizontalement, ont été décrites (protection réversible de la cible par des protéines de type *qnr*, acétylation de l'antibiotique

aac(6)-Ib-cr ou efflux spécifique *QepA*) (Cavaco et al., 2009 ; Robicsek et al., 2006 ; Yamane et al., 2007).

Nous nous sommes aussi intéressés aux facteurs de virulence qui sont nécessaires aux microorganismes pour provoquer une maladie. Nous avons cherché à voir les liens entre la résistance et la virulence des souches ; autrement les souches résistantes sont-elles les plus pathogènes ?

Les objectifs principaux de cette étude ont été de :

- Collecter sur une période d'un an des souches de salmonelles d'origine humaine, alimentaire et animale à Dakar.
- Étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches de salmonelles isolées des trois secteurs.
- Caractériser au plan moléculaire des souches isolées des trois secteurs.

Les objectifs spécifiques sont :

Estimer la prévalence de *Salmonella* isolées des :

- Selles de patients diarrhéiques au niveau de Dakar et de sa banlieue,
- Carcasses de poulets, produits localement et vendus en étalage dans les marchés polyvalents de Dakar (Sandaga ; Tilène ; Fass ; Castors ; Colobane ; Grand Dakar ; Grand Yoff ; Parcelles assainies),
- fientes de poulet et /ou des litières prélevées au niveau des élevages de Keur Massar et de Sangalkam.
- Évaluer la prévalence de la résistance aux antimicrobiens sur les souches de *Salmonella* provenant des trois secteurs.

Évaluer les déterminants génétiques de la résistance et de la virulence sur 100 souches de *Salmonella* provenant des trois secteurs :

- Rechercher les intégrons de classe 1, 2, 3 ;
- Faire le séquençage pour déterminer l'agencement des cassettes ;
- Rechercher les gènes de résistance aux quinolones ;
- Rechercher les facteurs de virulence ;
- De déterminer les CMI pour les souches résistantes aux quinolones (**NA**, **CIP**) ;
- De faire la conjugaison bactérienne pour voir si les gènes sont transférables.

Nous présenterons cette étude en deux parties :

- La première partie divisée en chapitres sera consacrée à la sécurité sanitaire des aliments, l'aviculture, les généralités sur les salmonelles et l'antibiorésistance.
- La deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale où seront présentés les différentes études réalisées en vue de l'atteinte des objectifs fixés, les résultats obtenus, leur discussion et les publications issues de ce travail.

Rapport-Gratuit.com

Première Partie :

GENERALITES

Chapitre I : Sécurité sanitaire des aliments

1. Définition

Selon l'OMS la sécurité sanitaire des aliments englobe toutes les mesures destinées à consommer des aliments sains. Les politiques et les mesures appliquées en la matière doivent porter sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation (OMS, 2015a) «**de la ferme à l'assiette**».

2. Historique

Depuis 1963, un code international de l'alimentation a été créé afin de veiller à la sécurité sanitaire des aliments dans le monde. Le Codex Alimentarius, administré conjointement par la FAO et l'Organisation mondiale de la santé, établit des normes relatives, entre autres, aux résidus de pesticides et de produits vétérinaires, aux additifs, aux importations de produits alimentaires, et aux méthodes d'inspection et d'échantillonnage. Il ya à la base de nombreuses normes nationales de l'alimentation (FAO, 2015). Cette commission a été créée afin d'établir des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages, dans le cadre du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Les buts principaux de ce programme sont la protection de la santé des consommateurs, la promotion de pratiques loyales dans le commerce des aliments et la coordination de tous les travaux de normalisation ayant trait aux aliments entrepris par des organisations aussi bien gouvernementales que non gouvernementales.

3. Importance de la sécurité sanitaire des aliments au Sénégal

Le Sénégal a opté pour une agriculture d'exportation et une libéralisation de son espace économique. Dans le cadre de la mondialisation, la sécurité sanitaire des aliments est devenue un enjeu international sur le plan de la compétitivité et le contrôle répond à plusieurs considérations telles que :

- protéger la santé des consommateurs ;
- mieux valoriser les produits alimentaires ;
- et vérifier de manière objective, honnête et fiable que les produits faisant l'objet d'échanges intra ou internationaux répondent à des normes communément acceptées (Banque mondiale /FAO-CP, 2004).

Au niveau de la consommation locale, la demande est moins exigeante, parceque contrainte par des moyens financiers, n'incite pas à accorder toute l'importance requise au concept de

sécurité sanitaire des aliments. Pour accompagner le Sénégal dans ce processus d'amélioration de la sécurité sanitaire et de la qualité des produits alimentaires que la FAO et la Banque mondiale ont démarré des activités en synergie pour la mise en place d'un programme d'appui à l'amélioration de la sécurité sanitaire (Banque mondiale /FAO-CP, 2004). D'autres programmes (EDES : Association Interprofessionnelle pour la promotion des échanges ACP-UE de fruits, légumes, fleurs et plantes.) et structures (CNCA : Comité National du Codex Alimentarius, UA : Union Africaine, UEMOA, ASN : Association Sénégalaise de Normalisation) accompagnent le Sénégal dans cette importante mission.

- Niveau de sécurité sanitaire des aliments destinés à la consommation locale

Les denrées alimentaires produites et destinées au marché local, sont généralement commercialisées dans des conditions d'hygiène très précaire. Il en résulte, que ces aliments présentent une charge microbienne relativement élevée, limitant leur durée de conservation. Par contre les risques de toxi-infections liés à leur consommation, sont considérablement réduits par les modes de préparation culinaire qui font habituellement appel à la cuisson poussée dans l'eau. A l'abattoir, l'inspection de salubrité existe et permet d'écarter les viandes manifestement dangereuses comme celles provenant d'animaux atteints de tuberculose bovine. C'est pourquoi, les consommateurs qui s'approvisionnent auprès des abatteurs clandestins où les viandes ne sont pas inspectées, courent de gros risques (Sylla, 2014).

4. Situation dans le contexte international

Actuellement, la préoccupation des consommateurs en matière de sécurité sanitaire des aliments s'est fortement accrue. A chacun des maillons de la chaîne, du producteur au consommateur, en passant par les services de contrôle, toutes les parties prenantes ont un rôle à jouer pour garantir la qualité de notre alimentation.

L'OMS estime que les maladies diarrhéiques tuent chaque année 1,8 millions d'enfants dans le monde et sont le plus souvent d'origine alimentaire (INFOSAN, 2008). Bien que la plupart des décès dus aux maladies diarrhéiques surviennent dans les pays en développement, les maladies d'origine alimentaire (MOA) sont loin de s'y cantonner. On estime que, chaque année, elles sont à l'origine d'environ 76 millions de cas, 325 000 hospitalisations et 5 000 décès aux Etats Unis d'Amérique (Mead, 1999).

En France, l'augmentation constante des repas pris au restaurant participe aussi à l'évolution des (MOA): près de 65% des foyers déclarés en 2010 sont survenus en restauration collective (Institut de veille sanitaire, 2011).

Ces dernières décennies, l'incidence des épisodes graves de contamination alimentaire a augmenté (INFOSAN, 2008). Cela peut être dû par l'augmentation des voyages internationaux et des migrations, l'accroissement du commerce des animaux vivants et des denrées alimentaires, l'urbanisation rapide dans les pays en développement, associée à des modifications du traitement et de la consommation des aliments. On ne connaît pas encore la véritable ampleur de la charge de morbidité et des coûts inhérents aux aliments dangereux, mais on pense qu'ils ont un impact important, notamment sur la sécurité sanitaire mondiale, l'économie et le développement.

L'incidence des maladies d'origine alimentaire est peut être de 300 à 350 fois plus élevée que le nombre de cas recensés dans le monde (FAO₁, 2015). L'augmentation des risques dus au MOA peut être aussi liée aux changements dans les systèmes de distribution, aux nouveaux produits, aux nouvelles technologies de production et de conservation, aux formes de consommation, à la présence de pathogènes virulents, à l'introduction de pathogènes dans différentes zones géographiques, aux changements immunologiques dans certains segments de population et à l'approvisionnement mondial (FAO₂, 2015).

Les maladies d'origine alimentaire constituent une menace quasi omniprésente dans les pays industrialisés, mais ces pays disposent de systèmes très élaborés de surveillance pour assurer la sécurité de l'alimentation.

5. Situation des maladies d'origine alimentaire dans les pays en voie de développement (PVD)

En Afrique, les diarrhées d'origine alimentaire sont responsables de près de 20 millions de décès par an ; les enfants de moins de cinq ans sont les plus touchés : 30 660 enfants africains meurent chaque année suite à la consommation d'aliments contaminés. En Afrique subsaharienne, la prévalence des maladies d'origine alimentaire a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies du fait de l'urbanisation, de la modification des systèmes écologiques et microbiologiques, des changements qui sont directement liés à la dégradation des systèmes d'assainissement (FAO/OMS, 2005). Les risques de contamination des aliments sont de plus en plus élevés à cause de la globalisation et de l'utilisation de la biotechnologie.

L'usage des pesticides, la mauvaise gestion des déchets, les aliments de la rue contribuent à la contamination des aliments (Aidara, 2012).

Certains problèmes sont particuliers aux pays en voie de développement, notamment :

- Le manque d'hygiène et d'accès à de l'eau potable qui favorisent les contaminations microbiennes, particulièrement chez les enfants de moins de cinq ans.
- Les systèmes de contrôle sont défaillants d'où la circulation sur le marché d'aliments avec peu de garantie sanitaire. Ces problèmes ont un impact sur la sécurité sanitaire des aliments et favorisent les MOA.

Ces maladies imposent un lourd fardeau au système de santé et réduisent notablement la productivité économique. Du fait des pertes de revenus qu'elles entraînent, elles perpétuent le cycle de la pauvreté dans lequel se trouvent les personnes les plus démunies qui vivent généralement, au jour le jour. Cependant, la sécurité des aliments au Sénégal montre beaucoup de manquements, comme l'absence de données sur le fardeau des maladies d'origine alimentaire, la faiblesse des moyens d'intervention, l'insuffisance de capacités analytiques des laboratoires et le manque d'informations des populations. Il est devenu urgent de mettre en place un système national de sécurité sanitaire des aliments, en vue de garantir la protection de la santé des consommateurs.

En janvier 2015, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a lancé le projet de « Renforcement de la capacité de surveillance, d'alerte rapide et de préparation à la gestion des urgences de Sécurité Sanitaire des Aliments dans la région de l'UEMOA, et mise en œuvre au Sénégal ». Prévu sur trois ans, le projet est appuyé financièrement par le Grand-Duché de Luxembourg. Il vise à la fois à aider le gouvernement sénégalais à identifier et gérer efficacement les situations d'urgence liées à la Sécurité Sanitaire des Aliments (SSA) et à assister les pays de l'Union Economique et Monétaire Ouest-Africaine (UEMOA) dans l'élaboration de stratégies régionales et nationales de développement et d'amélioration des systèmes de surveillance et d'alerte rapide en matière de SSA. Il viendra ainsi appuyer la décision prise au niveau du continent de créer au sein de l'Union Africaine (UA), une Autorité Africaine de Sécurité Sanitaire des Aliments et un Système d'Alerte Rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux.

6. Problématique de l'émergence de nouveaux pathogènes d'origine alimentaire

Parmi les tendances récentes qui influent sur la salubrité alimentaire, le plus inquiétant c'est l'émergence de nouveaux pathogènes d'origine alimentaire. Ces pathogènes émergents

comprennent de nouveaux agents infectieux récemment identifiés de même que les pathogènes d'origine alimentaire déjà connus et dont le comportement s'est modifié ; c'est le cas de certaines bactéries notamment :

- *E. coli* O 157 : H 7 (*E. coli* entérohémorragique), identifié en 1982 aux USA lors d'une épidémie de diarrhées sanglantes liée à la consommation d'hamburgers. Depuis, il est devenu un important agent d'origine alimentaire responsable d'importantes épidémies sur plusieurs continents. Cette bactérie provoque un syndrome urémique hémolytique, une insuffisance rénale et des décès particulièrement chez les jeunes enfants. La plus grosse épidémie a eu lieu au Japon en 1996 et a touché près de 6300 écoliers (Infectious Agents Surveillance Center, 1996).
- *E. coli* O 104 : H 4 (*E. coli* entérohémorragique) qui est multirésistant et a été responsable d'une épidémie survenue en Allemagne en Mai 2011 (INFOSAN 2011)
- *Campylobacter* connu depuis le début du XXe siècle comme agent pathogène de maladies animales, n'a que récemment été reconnu responsable de maladies chez l'homme (OMS, 2011). Depuis 1990, il apparaît comme l'une des causes principales de maladie bactérienne chez l'homme.
- *Salmonella* sérotype Enteritidis est apparu dans les années «80» un peu partout dans le monde entier. Depuis lors, elle a connu une ampleur beaucoup plus importante en Europe et en Amérique du Nord. Les infections dues à cette bactérie sont liées à la consommation de volaille et d'œufs.
- *Salmonella* Typhimurium DT104, résistante à cinq antibiotiques couramment prescrits s'est également propagée dans le monde (Rodrigue et *al.*, 1990 ; Threlfall 2000 ; Mather 2013).

7. Conseils pratiques donnés par l'OMS pour se protéger des maladies d'origine alimentaire

A l'occasion de la Journée Mondiale de la Santé de 2015, l'OMS a recommandé cinq conseils pratiques (5 clefs pour des aliments plus sûrs), simples mais essentiels pour se prévenir des maladies d'origine alimentaire. Selon le Dr Kazuaki Miyagishima (Directeur du Département OMS Sécurité sanitaire des aliments et des zoonoses) les producteurs sont les responsables de la sécurité sanitaire des aliments que l'on achète mais on peut se protéger en utilisant les cinq clés qui sont les suivantes :

- Prendre l'habitude de la propreté pour éviter les contaminations (lavage des mains etc..).
- Séparer les aliments crus des aliments cuits pour éviter la contamination croisée.
- Faire bien cuire les aliments pour tuer les microorganismes.
- Maintenir les aliments à bonne température (60°C ou 5°C) pour éviter la prolifération bactérienne.
- Utiliser de l'eau et des produits sûrs.

Chapitre II: L'aviculture au Sénégal

I. Aviculture et production de la viande de poulet au Sénégal

1. Introduction

L'aviculture concerne l'élevage d'oiseaux dans le but d'en tirer une production pour l'homme. Dans notre étude nous nous intéresseront particulièrement à l'élevage de poulet. Au Sénégal, les productions avicoles sont toujours dominées par le système d'élevage familial, très répandu en milieu rural.

Cependant, l'aviculture commerciale s'est considérablement développée au cours de la dernière décennie principalement en périphérie des grands centres urbains et totaliserait actuellement quelques treize millions de sujets (rapport 2009 CNA-CIMEL/Mbao).

L'aviculture constitue, de nos jours, un moyen non négligeable pour satisfaire les besoins en protéines animales des populations de nos pays africains, en particulier du Sénégal. La viande blanche comparée aux autres productions animales, offre les meilleurs rendements de conversion des calories végétales en calories animales et de transformation des protéines. De plus, la viande de volaille possède des qualités nutritionnelles et diététiques remarquables entre-autres, une faible teneur en graisse et une concentration assez élevée en acides aminés essentiels (Pare, 2012).

2. Les types d'élevage de poulet de chair

Au Sénégal, l'aviculture se distingue en deux systèmes différents selon le mode d'élevage : l'aviculture traditionnelle et l'aviculture moderne.

Le **système traditionnel** exploite les races locales et se caractérise par un apport minime voire nul d'intrants (aliments, médicaments) et une faible productivité.

Le **système moderne**, quant à lui, est celui qui prédomine dans les régions de Dakar et de Thiès, en raison de l'existence d'un marché de consommation et des conditions climatiques favorables au développement et à la survie des races améliorées. D'après Traore (2006b), la région de Dakar abrite plus de 80% des effectifs de ces élevages commerciaux. Il exige également un certain niveau d'investissement et une organisation des différents intervenants. Contrairement au système traditionnel, l'importance de l'aviculture moderne réside en sa plus grande productivité.

3. Caractéristiques de l'aviculture moderne

Ce type d'aviculture se caractérise par l'élevage des volailles de souches exotiques dont la production est réglée dans ses moindres détails par l'aviculteur. Ces volailles reçoivent un

aliment complet et en quantité précise, bénéficient d'une protection sanitaire et médicale, et sont logées dans des conditions régulièrement contrôlées (Habyarimana, 1994). Elle est surtout concentrée dans la zone agro-écologique des Niayes. En 2004, la région de Dakar comptait 5.301.943 têtes de poulet de chair (Traore, 2006b).

4. Importance économique de l'aviculture moderne au Sénégal

En effet, après l'arrêt de l'importation de produits avicoles, suite à l'avènement du virus de la grippe aviaire hautement pathogène, une augmentation de la production avicole sénégalaise qui était en déclin était notée parce que fortement concurrencée par les importations. Celle-ci est passée d'un effectif de 6.935.029 en 2005, à 20.998.220 en 2012 (CNA-CIMEL/Mbao, 2013), soit une augmentation de 203 pour cent. Les effectifs des autres espèces de volailles sont marginaux. Seuls quelques dindons sont élevés pour les fêtes de Noël, notamment par le Ministère de l'Élevage, au niveau du CNA de Mbao.

La filière avicole sénégalaise, à l'instar des pays de la CEDEAO est l'une des filières agroalimentaires les plus porteuses d'espoir pour la réduction de la pauvreté et la croissance économique. C'est ainsi que tous les pays de la CEDEAO ont retenu l'aviculture au titre des 5 spéculations agricoles stratégiques. Au Sénégal, plusieurs indicateurs l'attestent tels que :

- Sa contribution au PIB de l'Élevage qui est de 17% (information donnée à l'occasion de l'assemblée générale constitutive de l'Union Nationale des Provendiers du Sénégal (Unps) en aout 2012) ;
- Son chiffre d'affaires global qui a été de près de 130 milliards de FCFA en 2011².
- Sa place en terme de création d'emploi occupe plus de 50 000 emplois directs et indirects ;
- Avec 30% de l'offre du sous secteur traditionnel et une consommation per capita (par tête) de près de 3,79 kg/an, elle demeure une source de protéines essentielle aux populations et une réponse à la lutte contre la malnutrition rurale et à l'insertion des jeunes. La viande de volaille est la moins chère sur le marché ; elle est donc la viande la plus accessible pour les ménages.

La filière connaît un boom spectaculaire depuis quelques années, mais reste à la merci des pressions des pays étrangers qui exigent que le Sénégal lève sa mesure suspensive pour renouer avec les importations de viandes de volailles congelées³.

² <http://www.sedima.com/index.php/le-groupe/le-secteur-avicole>

³ <http://www.sedima.com/index.php/le-groupe/le-secteur-avicole>

5. Aviculture traditionnelle au Sénégal

L'aviculture traditionnelle regroupe des exploitations de type familial, dispersées en petites unités de production où les motifs économiques et les normes rationnelles de conduite du troupeau sont pratiquement relégués au second plan (Buldgen et *al.*, 1992). Dans ces élevages, la taille moyenne des unités de production est de 10 sujets. Ce sont des poules locales douées d'une bonne rusticité, élevées dans un système extensif où l'apport d'intrants (aliments, médicaments) est réduit.

6. Importance socio-économique de l'aviculture

L'aviculture familiale est une activité financièrement rentable malgré sa faible productivité. La vente des poulets et des œufs est presque un profit net du moment où l'utilisation d'intrants dans cette activité est faible. L'aviculture traditionnelle constitue ainsi un moyen d'accumulation de capital et le poulet est souvent employé dans le système de troc dans les sociétés où il n'y a pas beaucoup de circulation monétaire (Guèye, 2003). Les revenus générés par la vente sont distribués de manière directe ou indirecte pour le bien-être de tous les membres du ménage. De plus, la viande du poulet de race locale est la plus chère parmi les principaux types de viandes commercialisées dans la ville de Dakar (Sénégal, 2007).

II. De l'abattoir à la vente de la viande de poulet au Sénégal

1. Introduction

L'élevage avicole occupe une place de choix dans l'économie sénégalaise. Il offre des opportunités d'emploi et permet de satisfaire les besoins de la population en protéines animales en constante augmentation (Traore, 2006a). La consommation de volaille telle que le poulet peut être à l'origine de MOA.

Lors de la production, la transformation ou la vente les poulets peuvent être contaminés par les agents pathogènes tels que les salmonelles. Ce qui peut être source de diarrhée si le poulet n'est pas bien cuit.

2. Types de poulets commercialisés

Au Sénégal plusieurs types de poulet sont commercialisés sur le marché à savoir :

- Les poulets du pays ou poulet local cette catégorie de volaille est produite au niveau de l'élevage traditionnel. Ils sont destinées à la consommation.
- Les poulets de chair qui sont généralement produits au niveau de l'élevage industriel. Ils sont destinées à la consommation.

- Les poulets de ponte proviennent des deux types d'élevage (industriel et traditionnel), ils sont destinés à la ponte des œufs ou à la consommation (suite à leur réforme).

3. Les abatteurs

L'abattage de poulets n'est pas un secteur organisé au Sénégal. En effet, au niveau des fermes d'élevage où le producteur préfère vendre des poulets, l'abattage des poulets de chair est assuré par des manœuvres. Parfois, c'est le commerçant qui achète les poulets sur pied et loue les services de ces derniers avant d'acheminer les poulets abattus au niveau des structures de plumage.

Certains commerçants amènent avec eux des prestataires de services qui leur assurent l'abattage des poulets achetés. Au niveau des marchés, les abatteurs sont très présents pour les clients ; ils se chargent d'abattre, de plumer et d'éviscérer manuellement (Diagne MM, 2008).

4. Les transformateurs

Les transformateurs interviennent uniquement dans le circuit des poulets prêts à cuire. En effet, nous distinguons deux types d'intervenants : ceux qui font du plumage manuel et ceux qui font plumage mécanique. Ces derniers disposent d'une plumeuse qui leur permet de procéder au plumage des poulets déjà abattus. En effet, les structures de plumage au niveau de la zone des Niayes ne procèdent pas à l'abattage mais seulement au plumage, à l'éviscération, à l'égouttage et à l'emballage. Quant au plumage manuel, il se rencontre surtout au niveau des marchés urbains où se trouvent des prestataires de services. Ces derniers procèdent à l'abattage des poulets et au plumage pour les clients. Il existe deux types de plumage manuel :

- Plumaison humide dans un fut d'eau polluée (figure 1)
- Plumaison à sec à même le sol (figure 2)

Plumaison humide dans un fut d'eau polluée



Figure 1 : Illustration d'une pratique de plumage manuel

Source (Gueye, 2011)

Plumaison à sec à même le sol

Figure 2: Illustration d'une pratique de plumage manuel

Source (Gueye, 2011)

Il existe deux tueries artisanales qui appartiennent à un opérateur privé. Ce dernier travaille avec beaucoup d'éleveurs et avec les Bana-banas (commerçant) également qui souhaitent vendre des poulets prêts à cuire. Toutefois, aucun de ces deux types de traitement des poulets de chair ne garantit des conditions d'hygiène acceptables. Ce qui influe négativement sur la présentation des produits (poulets prêts à cuire) et compromet de toute évidence la qualité de ces derniers (Diagne MM, 2008). Actuellement, plusieurs études démontrent une contamination importante de ces poulets par les agents pathogènes telle que les salmonelles (Dione et *al.*, 2012). Une grande corrélation entre le taux de contamination des poulets par les salmonelles et l'hygiène au niveau des élevages mais aussi de l'abattage et des points de vente a été faite (Gueye, 2011).

- **Éviscération** : Cette étape doit commencer au plus 45 minutes après l'abattage. Au-delà de ce délai, les intestins deviennent poreux sous l'action d'enzymes et des micro-organismes (salmonelles) qu'ils contiennent peuvent en sortir et atteindre les muscles, donc contaminer la carcasse. Lors de cette étape, les pattes et la tête sont coupées, la carcasse est fendue au niveau du cloaque et les abats retirés. Le foie, le cœur et le gésier sont remis après éviscération.

5. La commercialisation

Elle est assurée par les acheteurs – revendeurs « banabanas » qui approvisionnent d'autres commerçants (détaillants) au niveau des marchés urbains et/ou les restaurants, boucheries, épicerie. Les « banabanas » ont des relations étroites avec certains producteurs qui constituent leurs principaux fournisseurs (Diagne MM, 2008).

Chapitre III : *Salmonella* et antibiorésistance

I. Généralités sur *Salmonella*

1. Définition et classification

Les salmonelles sont des Entérobactéries du genre *Salmonella*. En 1896, Widal ayant eu l'idée d'agglutiner des souches de bacille typhique avec le sérum de malades atteints de typhoïde, découvre alors la diversité antigénique de ces bacilles. L'étude séparée des antigènes somatiques O, flagellaires H et de surface Vi date des travaux de Weil *et al.* en 1918. L'inventaire de la diversité antigénique de ces bactéries, maintenant regroupés dans le genre *Salmonella*, a été l'œuvre successivement de White en 1926, de Kauffman en 1952 puis de Le Minor en 1987. Kauffman considérait chaque sérotype comme une espèce et leur donnait un nom latin (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium, etc....). Il reconnaissait dans le genre des sous-genres numérotés de I à IV. Le sous-genre I regroupait les salmonelles de l'homme et des animaux à sang chaud tandis que les autres sous-genres étaient plutôt associés aux animaux à sang froid (Freney *et al.*, 2000). La classification de 2004 regroupe les salmonelles en 3 espèces : *Salmonella enterica* qui est une espèce habituelle, *Salmonella bongori* qui est une espèce rare et *Salmonella subterranea* (Aubry, 2012). Mais seules les deux premières sont reconnues par l'OMS (Agbaje *et al.*, 2011).

Salmonella enterica est subdivisée en 6 sous-espèces. La sous espèce *enterica enterica* est la plus fréquente et comporte 2600 sérovars. Elle représente 99,5% des souches isolées.

Les autres sous espèces *enterica* sont *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *salamae* et *indica* et sont des salmonelles non humaines (Freney *et al.*, 2000).

2. Caractères bactériologiques

2.1. Morphologie

Ce sont des bacilles droits à Gram négatif, souvent mobiles.

2.2. Culture

Les salmonelles sont des bactéries aéro-anaérobies et se développent à une température de 37°C sur milieux ordinaires.

3. Caractères biochimiques

Les salmonelles possèdent des caractères biochimiques communs aux entérobactéries. Ce sont des aéro-anaérobies, fermentant le glucose en produisant du gaz, réduisant les nitrates en nitrites. Elles sont catalase positive et oxydase négative. Des sérotypes comme *Salmonella* Typhi sont agazogènes. Les caractères permettant l'identification biochimique des salmonelles sont l'absence d'uréase, de tryptophane désaminase, de production d'acétone (test de Voges-Proskauer) et de fermentation du lactose. Il y a production d'H₂S à partir du

thiosulfate et une décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine. Des sérotypes comme *Salmonella* Typhi ne décarboxylent pas l'ornithine ; *Salmonella* Paratyphi A ne produit pas d'H₂S et ne décarboxyle pas la lysine (Freney et *al.*, 2000).

4. Diagnostic

4.1. Diagnostic bactériologique

4.1.1. Conditions et milieux de culture

Les salmonelles peuvent être recherchées par coproculture. L'utilisation de milieux sélectifs contenant des inhibiteurs est obligatoire car le prélèvement est polymicrobien. La culture des salmonelles ubiquistes nécessite une étape de pré-enrichissement avec des bouillons comme le Mueller-Kauffmann, le Rappaport-Vassiliadis et l'eau peptonée. Plusieurs milieux peuvent être utilisés pour l'isolement. Le milieu Rambach permet une bonne identification des salmonelles de même que le milieu Hektoen, XLD, S-S.

4.1.2. Morphologie des colonies

Sur Rambach, elles sont de couleur rose fuchsia (sauf *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi qui sont incolores) ; leur taille varie de 0,5 à 2mm. Sur Hektoen les colonies sont transparentes, vertes avec un centre noir du fait de leur production d'H₂S. Sur XLD les salmonelles sont de couleur rouge avec un centre noir. Sur S-S les colonies caractéristiques de *Salmonella* (lactose négatif) sont opaques, translucides ou transparentes et généralement avec un centre noir (H₂S positif).

4.1.3. Identification

4.1.3.1. Tests biochimiques

Une première orientation sur Kligler-Hajna est possible (glucose+, lactose-, H₂S+, gaz+). *Salmonella* Typhi a souvent une faible production d'H₂S. La galerie API 20E (BioMérieux) permet une identification plus complète

4.1.3.2. Sérotypage

a) Le typage antigénique

Le typage antigénique est le sérotypage classique qui se fait par agglutination. Les salmonelles expriment des antigènes somatiques (O) et des antigènes flagellaires (H). Le sérotype Typhi exprime en plus un antigène de surface (Vi).

b) Le typage moléculaire ou génomique

La caractérisation de lignées de bactéries résistantes aux antibiotiques mais aussi la surveillance globale des épidémies nécessitent une comparaison directe des souches de différentes localités. Malheureusement la plupart des méthodes de typage couramment

utilisées sont mal adaptées pour ce type de comparaison car elles exigent une standardisation dans chaque laboratoire et dépendent de réactifs spécialisés. Les méthodes basées sur les séquences d'ADN sont plus convenables car elles permettent une comparaison directe des souches typées de différentes régions du monde grâce à des bases de données internationales (Maiden *et al.*, 1998). C'est le cas de la «*Multilocus Sequence Typing (MLST)*».

La MLST est un système de typage basé sur les séquences d'ADN. Cette méthode nécessite le séquençage de 7 régions internes conservées (dits gènes de ménage, d'environ 500 paires de base chacune) de gènes, et a été développée pour plusieurs bactéries pathogènes dont *Salmonella spp* en 2002 (Achtman M, 2012). Les résultats sont partagés avec la communauté scientifique par l'intermédiaire du site MLST *Salmonella* de l'Environmental Research Institute de Cork⁴ qui recense, en 2012, 1669 séquençotypes pour plus de 500 sérotypes (Achtman *et al.*, 2012).

Il existe d'autres techniques de typage moléculaire :

- **Le séquençage après PCR des gènes de flagellines *fliC* et *fliB***. Cette méthode se base sur l'analyse des gènes codant pour les 2 phases flagellaires de *Salmonella*.
- **L'analyse du polymorphisme des 2 régions CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) par PCR puis séquençage. Plus de 3800 spacers différents ont été décrits par cette méthode et accessibles sur le site web⁵. Cette méthode originale a été mise au point au CNR *Salmonella* (Fabre *et al.*, 2012). Actuellement des techniques de sous-typage moléculaire des salmonelles existent :
- **L'électrophorèse en champ pulsé** (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) à l'aide de différentes endonucléases (méthode standardisée et de référence PulseNet, accessible sur le site web⁶).
- **L'analyse MLVA** (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour le sérotype Typhimurium et son variant monophasique (méthode standardisée et harmonisée depuis 2011). Une plate-forme web dédiée au MLVA est accessible sur le site web⁷.
- **La méthode CRISPOL, méthode de sous-typage à haut débit** de *S. enterica* sérotype Typhimurium et de ses variants monophasiques basée sur le polymorphisme des régions CRISPR. Cette méthode, mise au point au sein de l'UBPE en 2009, repose sur la détection de

⁴ <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>

⁵ <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/crispr/CRISPRDB.html>

⁶ <http://www.cdc.gov/pulsenet/>

⁷ <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlva/>

68 spacers présents chez Typhimurium. Cette détection est effectuée par hybridation en milieu liquide à l'aide de 72 sondes fixées sur des microbilles grâce à la **technologie xMAP de Luminex®**.

- **Whole Genome Sequencing (WGS)** ou Séquençage du génome complet semble être la meilleure méthode pour le typage épidémiologique par rapport aux autres techniques de typage moléculaire et de sous typage moléculaire.

4.2. Diagnostic moléculaire

Le Séquençage du gène *rrs* (codant pour l'ARN 16S) **ou du gène *rpoB*** (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) permet de vérifier l'appartenance des souches au genre *Salmonella* (*rrs*) et aux différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* (*rpoB*) grâce à la comparaison des séquences obtenues à celles contenues dans la base de données de l'UBPE (Weill, 2011).

5. Epidémiologie

5.1 Réservoir de la maladie et contamination humaine

Le large spectre d'animaux pouvant être porteurs de *Salmonella* a fait que les viandes et particulièrement les volailles, les produits carnés, les œufs et les produits laitiers et une grande variété de produits alimentaires, consommés crus, peu cuits ou ayant fait l'objet d'une contamination post-cuisson, peuvent être à l'origine d'une contamination humaine (95% des cas).

Cependant, dans la littérature on décrit que d'autres aliments comme les végétaux, les coquillages, etc. peuvent en être l'origine (ANSES, 2011). Une contamination croisée entre un aliment sain et un aliment contaminé peut également avoir lieu dans les magasins, lors des distributions de denrées, dans les restaurants ou au domicile lors de la préparation des repas. Plus rarement, la contamination peut avoir pour origine un contact direct avec un animal malade ou porteur sain par l'intermédiaire des mains. La contamination peut se faire aussi par contacte directe avec les reptiles qui sont des porteurs sains de *Salmonella* (Ricard, 2015).

Les salmonelles présentes dans les matières fécales des animaux peuvent contaminer les pâturages, les sols et l'eau, puis y survivre pendant plusieurs mois. Ainsi, l'environnement et l'eau non traitée peuvent également représenter une source de contamination.

La contamination de l'homme se fait généralement par le biais d'aliments souillés (95% des cas, principalement par les aliments crus), mais aussi par contact avec des individus ou animaux infectés.

Les aliments sont habituellement des viandes hachées (hachis), de la charcuterie (saucisses, salaison, pâtés), de la volaille, des rôtis de bœuf préparés d'avance et des œufs (ovoproduits,

crème pâtissière, mayonnaise, crème glacée), du poisson et coquillages (huîtres, moules, mollusques, crustacés) (Weill, 2013).

5.2 Survie et diffusion dans l'environnement

Du fait de la localisation des salmonelles dans le tube digestif des animaux infectés, la contamination de l'environnement s'effectue lors de l'excrétion des matières fécales (Berends *et al.*, 1996). Plus les animaux sont concentrés dans une certaine zone, plus il est difficile de contrôler les transmissions entre eux.

Les salmonelles peuvent survivre pendant de très longues périodes dans le milieu extérieur. Pour la plupart des sérovars, la survie dans l'eau douce à 20°C se limite généralement à 3 semaines (Villate, 2001). Ces bactéries peuvent se fixer sur de nombreux supports, comme les bottes, les brosses, les pelles, les roues de brouettes, les vêtements... Lors du nettoyage et de la désinfection des bâtiments d'élevage et d'engraissement, il faut considérer tout ce matériel inanimé, qui peut être la cause d'une réinfection du lot suivant. Peuvent aussi être contaminés : les toiles d'araignée, l'eau, les sous-produits d'activités agro-alimentaires, les aliments pour animaux, les environs des fermes, les poissons et les oiseaux (Berends *et al.*, 1996). Les rongeurs et les insectes peuvent être aussi une source importante de *Salmonella* dans un élevage.

Les salmonelles possèdent une grande capacité de survie dans l'environnement, en particulier dans les eaux résiduaires (chargées en matière organique) dans les boues issues des stations d'épuration et sur les terres agricoles. Leur diffusion dans l'environnement est très importante. Le cycle des salmonelles décrit leur aptitude à se transmettre d'une espèce animale à une autre, à contaminer tous les biotopes et à infecter l'homme par l'intermédiaire de son alimentation (Figure 3). Dans ces conditions, la présence de salmonelles dans l'environnement direct des animaux d'élevage semble inéluctable.

Chez un animal porteur sain, les salmonelles sont généralement hébergées au niveau du tube digestif et font l'objet d'une excrétion fécale intermittente. Au Sénégal, Cardinale *et al.* (2004) a montré que 28,6% des fientes issues de 70 fermes de poulets de chair sont infectées par *Salmonella*.

Chez le poulet les salmonelles sont plus retrouvées au niveau de la peau qu'au niveau du muscle. Le cou et l'anus sont les parties de la carcasse de poulet les plus contaminées. Il faut dès lors appliquer des normes d'hygiène très strictes lors de la production de chair de poulet.

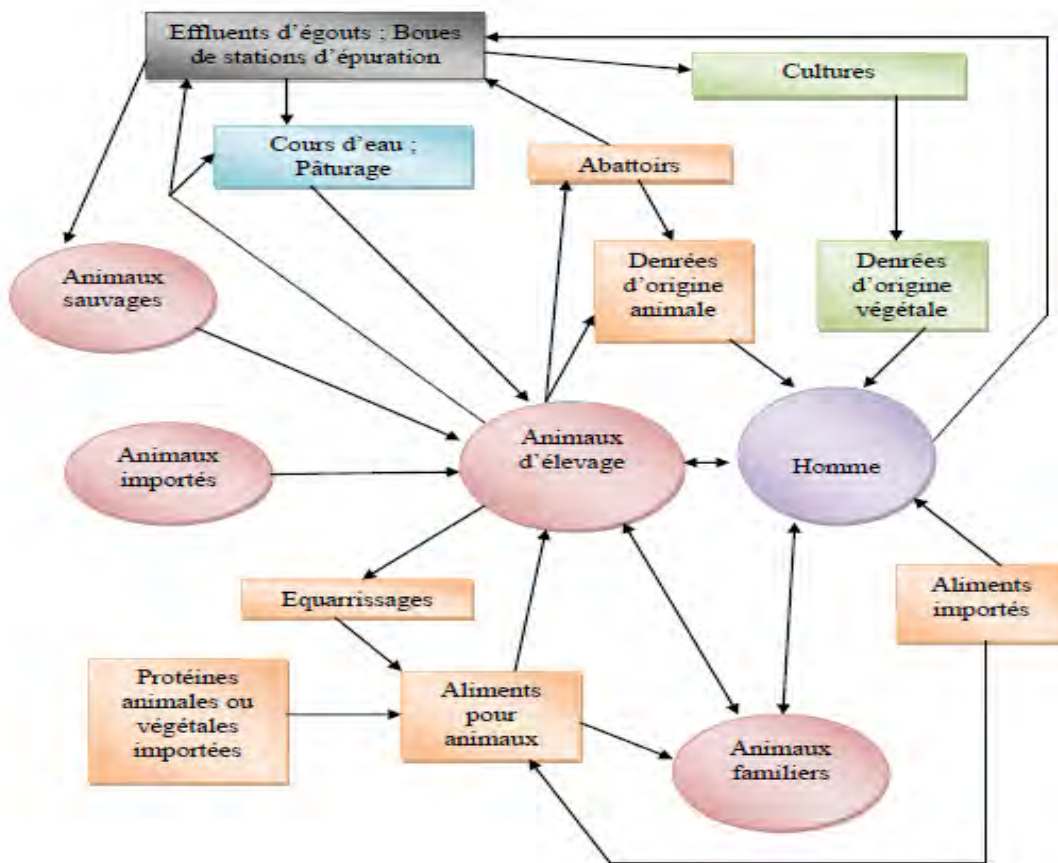


Figure 3: Cycle de diffusion des salmonelles dans l'environnement

(Mossel et *al.*, 1995).

6. Déterminants génétiques de la virulence chez *Salmonella*

6.1 Facteurs de virulence

La virulence constitue l'aptitude relative d'une bactérie à induire l'apparition d'une pathologie infectieuse (Martínez et *al.*, 2002). Les facteurs de virulence sont nécessaires aux microorganismes pour provoquer une maladie. Les caractéristiques essentielles de la pathogénie des salmonelles sont leur capacité à entrer dans les cellules-hôtes et à y demeurer comme parasite intracellulaire facultatif (Millemann, 1998).

6.2. Îlots de pathogénicité

Les étapes essentielles de la pathogénie sont sous la dépendance de facteurs de virulence codés par des gènes organisés en blocs sur le chromosome, qualifiés « d'îlots de pathogénicité » ou SPI (*Salmonella* Pathogenicity Island) et constituant une des caractéristiques essentielles de la virulence des salmonelles (Millemann, 1998, Van Asten et *al.*, 2005). Il est important

d'identifier les gènes de virulence qui sont responsables de l'établissement de l'infection par *Salmonella spp* chez les volailles. Cinq îlots de pathogénicité (SPI) ont été bien caractérisés (Fàbrega et *al.*, 2013). SPI1 et SPI2 encodent des systèmes de sécrétion de type III qui confèrent les principales caractéristiques de virulence de *S. enterica* (Van Asten et *al.*, 2005). SPI1 est impliqué dans l'invasion des cellules de l'hôte et de l'inflammation. Présent dans SPI1 (Campioni et *al.*, 2012), le gène d'invasion *invA*, existe chez la plupart des souches de *Salmonella*. Il est lié à l'invasion des cellules phagocytaires ou non phagocytaires de la muqueuse intestinale (Zou et *al.*, 2012). Ce gène est utilisé en tant que marqueur génétique pour les *Salmonella* pathogènes (Peterson et *al.*, 2010). SPI2 est nécessaire pour coder les protéines impliquées dans la survie intracellulaire et la réplication au sein de phagocytes. Il contribue également à la dissémination systémique des salmonelles (Hensel, 2004). *SpiC* est un gène de SPI2 codant pour les composants structuraux et de sécrétion. Il contribue à initier la production de médiateurs ayant une fonction considérable dans la virulence de *Salmonella*. Le gène *spiC* est aussi impliqué dans l'expression d'un composant du filament des flagelles jouant un rôle important après l'infection à *Salmonella* (Uchiya et *al.*, 2009).

SPI3 est présent dans toutes les lignées. Toutefois, les distributions des SPI4 et SPI5 n'ont pas été établies (Fluit, 2005). SPI4 joue un rôle lors de l'interaction initiale avec l'épithélium intestinal et contribue à la persistance à long terme (Fàbrega et *al.*, 2013). Le gène *orfL* de SPI4 est nécessaire à la survie intra-macrophages et porte éventuellement un système impliqué dans la sécrétion de toxines (van Asten et *al.*, 2005). SPI5 est impliqué dans la réalisation de plusieurs processus pathogènes lors de l'infection (Fàbrega et *al.*, 2013). *PipD*, premier gène de l'îlot SPI5, a une cible à la surface ou à l'intérieur des cellules hôtes (Wood et *al.*, 1998).

6.3 Plasmide de virulence

Salmonella dispose d'autres facteurs de virulence non portés par des SPI. C'est le cas des plasmides qui peuvent être soit libres ou sous forme intégrée. Ce sont des molécules d'ADN capable de réplication autonome et non essentielle à la survie de la cellule. Ils contiennent fréquemment des gènes de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds ou aux antiseptiques, ainsi que des gènes de virulence comme *spvRABCD*. Ce dernier potentialise la propagation systémique de l'agent pathogène et l'aide à se répliquer dans les sites extra-intestinaux (Zou et *al.*, 2012). En effet, l'expression de ces gènes pourrait jouer un rôle dans la multiplication intracellulaire de *Salmonella*. Le produit de la *spvR* est une protéine de

régulation positive essentielle pour l'expression des autres gènes *spv* (Millemann 1998 ; Van Asten et *al.*, 2005).

II. Antibiorésistance

1. Résistance des salmonelles aux antibiotiques

La résistance des salmonelles aux antibiotiques est générale acquise par l'intermédiaire de structures génétiques notamment les plasmides, transposons, intégrons, îlots génomiques.

1.1 Les îlots génomiques de résistance (SGI)

Salmonella Genomic Island 1 a été décrit pour la première fois chez *Salmonella* Typhimurium DT104 ; Les souches DT104 présentent un phénotype de résistance à plusieurs antibiotiques appartenant à cinq familles différentes incluant l'ampicilline-amoxicilline, le chloramphénicol-florfenicol, la streptomycine-spectinomycine, les sulfamides et la tétracycline (phénotype ACSSuT). Les gènes de résistance, responsables du phénotype ACSSuT, sont portés par un élément génétique situé au niveau chromosomique nommé SGI1. *Salmonella* Genomic Island 1, d'une taille approximative de 43 kb, est constitué de 44 cadres ouverts de lecture (ORF: open reading frame) qui ont été nommés de S001 à S044 (Targant, 2010) (figure 4). En 2005, Doublet et al démontrent que SGI1 est un **élément mobile intégratif** (Doublet et *al.*, 2005).

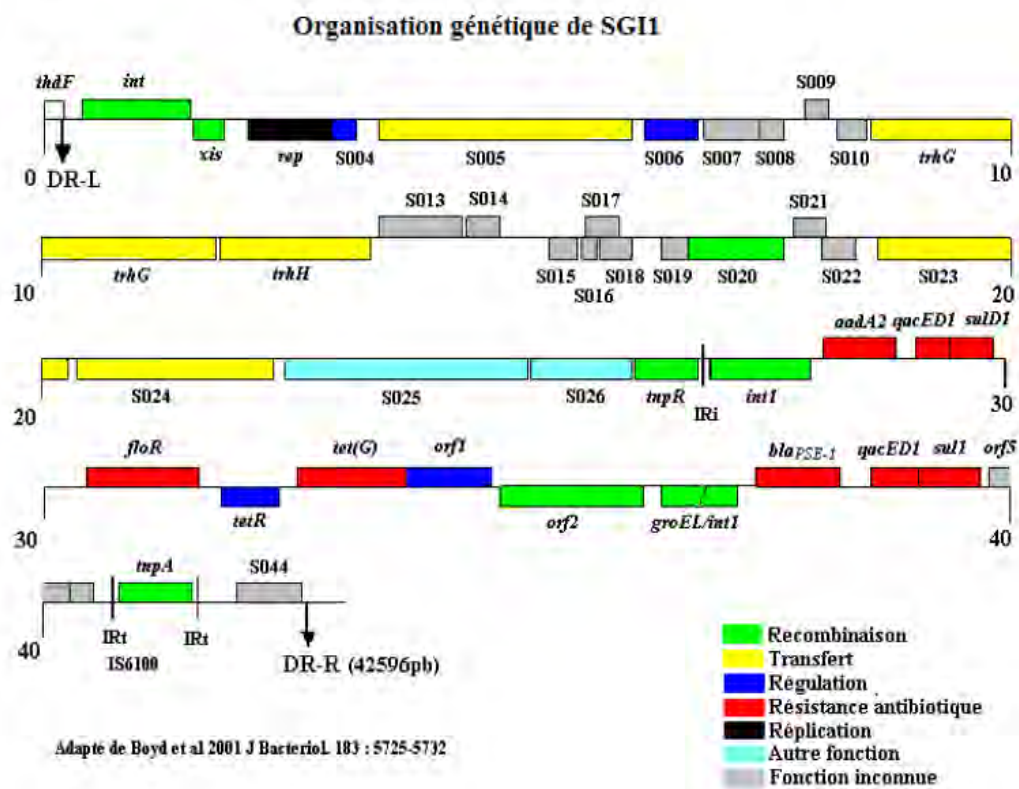


Figure 4 : Structure génétique de SGI1

1.2 Problèmes posés par SGI1

Du fait de son intégration dans le chromosome, SGI1 est une structure stable. Sa présence dans une souche n'est pas influencée par la pression des antibiotiques dans son environnement. Son intégration dans le chromosome assure également sa réplication et sa transmission à la descendance (Targant, 2010).

La présence de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques sur un support commun augmentent la probabilité **d'échec thérapeutique**.

Ensuite, la pression de sélection exercée par un antibiotique dont le gène de résistance est porté par SGI1 conduira à la sélection et à la propagation de tous les gènes de résistance présents sur SGI1: c'est le phénomène de **co-sélection**.

L'acquisition de nouvelles résistances par SGI1 représente une préoccupation importante car il reste peu d'antibiotiques susceptibles d'être utilisés en cas d'infections par une souche multi-résistante portant SGI1.

Un risque majeur est la transmission de SGI1 à d'autres pathogènes que *Salmonella* Typhimurium DT104. SGI1 a été déjà décrit chez une souche *Salmonella* Paratyphi B mais il est possible qu'on le retrouve dans l'avenir dans **d'autres espèces bactériennes pathogènes**

telles qu'*Escherichia coli*, *Shigella spp.* ou *Vibrio spp.* qui portent tous un gène *thdf* conservé (Targant, 2010).

2. Mécanisme de résistance des salmonelles aux quinolones

2.1 Introduction

Dans cette partie du travail nous nous intéresserons seulement à la résistance des salmonelles vis-à-vis des quinolones et fluoroquinolones.

Les études de surveillance montrent qu'il y a une distribution des salmonelles entre les fermes et abattoirs (Dione et *al.*, 2009), ce qui pose un grand risque de toxi-infection Alimentaire. Actuellement on note l'émergence de salmonelle multirésistante telle que *Salmonella* Kentucky ST198 dans la filière avicole (Le Hello S et *al.*, 2013, Dione et *al.*, 2012).

2.2 Quinolones, fluoroquinolones

2.2.1 Introduction

Les quinolones sont l'une des classes d'antibiotiques les plus prescrites dans le monde, ce qui explique l'augmentation constante des résistances bactériennes à ces antibiotiques (Kongsoi, 2015).

2.2.2 Cible des quinolones

Les quinolones ont pour cibles deux enzymes de la classe des topoisomérases : la gyrase et la topoisomérase IV.

2.2.3 Classification

Suivant leur mécanisme et leur structure, on distingue deux classes de topoisomérases : les topoisomérases de type I et celles de type II.

Il existe généralement deux topoisomérases de type I chez les bactéries : la topoisomérase 1 et la topoisomérase 3.

Chez les bactéries, les deux topoisomérases de type II sont : la gyrase et la topoisomérase IV.

2.3 Mécanisme d'action des quinolones et fluoroquinolones

2.3.1 Pénétration dans la bactérie

Les quinolones et les fluoroquinolones pénètrent très bien dans les bactéries à Gram négatif, dont la membrane externe est riche en porines livrant le passage aux petites molécules hydrophiles.

2.3.2 Action intracellulaire

Lorsqu'elles diffusent dans le cytoplasme, les quinolones vont inhiber de manière sélective la réplication de l'ADN bactérien.

2.4 Mécanismes de résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones

Les mécanismes de résistance aux quinolones sont de deux types (la résistance chromosomique et la résistance plasmidique) (figure 5).

- Résistance chromosomique

Les résistances surviennent principalement par mutations successives au niveau des gènes chromosomiques (*gyr*, *par*) des cibles des quinolones (Migma et al., 2011).

- Résistance plasmidique

Il a été récemment décrit des gènes de résistance aux quinolones à localisation plasmidique communément appelés PMQR pour « Plasmid mediated quinolone résistance » chez *Salmonella* et chez d'autres entérobactéries (Strahilevitz et al., 2009). Ces gènes ont trois types de mécanismes de résistance :

Le premier mécanisme de résistance repose sur la protection réversible de la cible par production de protéines appelées *Qnr* (pour quinolone résistance) avec *QnrA*, *QnrB* et *QnrS*. Récemment *QnrD* et *QnrC* ont été découverte chez *Salmonella* (Cavaco et al., 2009).

Les protéines de type *Qnr* confèrent un haut niveau de résistance aux quinolones de première génération et un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Le deuxième mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones est constitué de *aac* (6 ϵ)*ib-cr*, qui code pour une nouvelle variante du commun aminoglycoside acétyltransférase qui est capable d'acétylation le substituant pipérazinyle de certaines fluoroquinolones, réduisant ainsi leurs activités (Robicsek et al., 2006).

Le troisième mécanisme est assuré par le gène *qepA*, qui code pour une pompe à efflux appartenant à la superfamille majeure de facilitateur (Yamane et al., 2007).

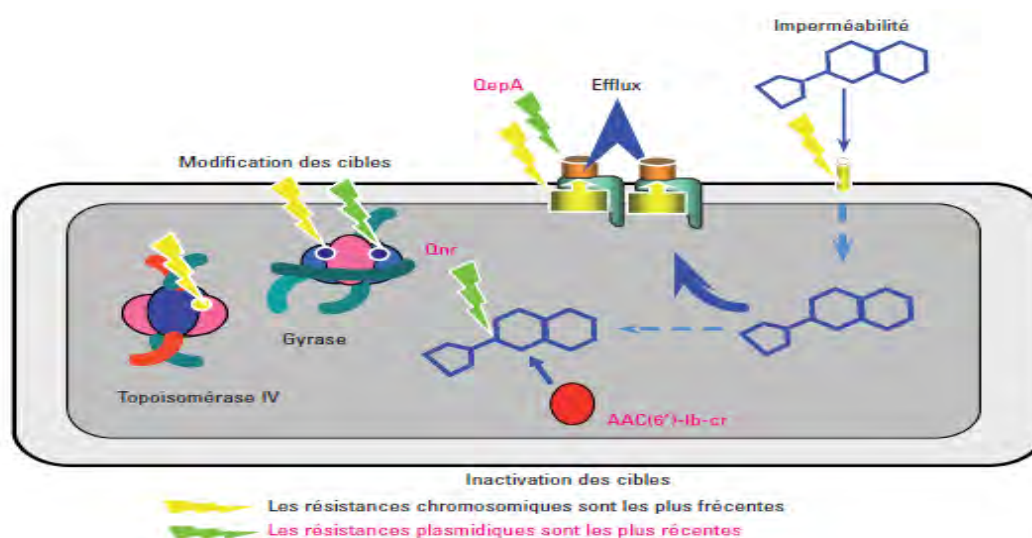


Figure 5 : Mécanisme de résistance aux quinolones et fluoroquinolones

Il est important de noter que chaque mécanisme confère individuellement un bas niveau de résistance aux fluoroquinolones (quelques fois indétectable sur un antibiogramme classique). La résistance de haut niveau aux fluoroquinolones provient de la combinaison de plusieurs mécanismes.

3. Problématique de l'antibiorésistance des souches de *Salmonella*

Les tubes digestifs des animaux et des humains sont des réservoirs de bactéries à majorité anaérobies. Cette flore commensale exerce un effet de barrière complet ou partiel contre la colonisation du tube digestif par des espèces exogènes qui peuvent parfois être pathogènes.

La forte utilisation d'antibiotiques de stimulation de la croissance et de protection des animaux d'élevage en médecine vétérinaire a eu comme conséquence la sélection des formes résistantes de bactéries dans l'écosystème. Des échanges de matériel génétique sont possibles entre ces bactéries entraînant la diffusion des résistances d'un genre à l'autre, d'un commensale à un pathogène. La conséquence immédiate de la résistance aux antibiotiques en médecine vétérinaire est l'échec thérapeutique.

La mise en évidence de souches de *Salmonella* résistantes est particulièrement préoccupante. En effet, il est fréquent d'observer un échange de gènes de résistance voir même de bactéries résistantes entre l'homme et l'animal. Du point de vue des flux de gènes, il n'y a pas d'étanchéité absolue entre les mondes bactériens d'origine animale ou humaine. Des exemples de gènes de résistance, identifiées à la fois chez des bactéries isolées en médecine humaine ou vétérinaire, portés par des structures génétiques mobiles sont nombreux (Cambray, 2010). On peut citer la multirésistance des salmonelles porté par l'îlot génomique SGI.

L'étude de ces données permet de comparer des fréquences d'isolement des gènes de résistance d'origine humaine et animale dès lors, il pourrait être possible de quantifier prospectivement, la vitesse d'émergence d'un mécanisme de résistance dans un des mondes après qu'il ait émergé dans l'autre.

Deuxième Partie :

Etude Expérimentale

PRESENTATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

L'approche utilisée dans ce travail est une approche intégrée dans le contexte de « One Health ».

Ce travail comprenait deux études :

Étude 1 : Recherche des salmonelles au niveau humain, alimentaire et animal

Dans cette étude les salmonelles ont été recherchées pendant la même période (Juillet 2012 à juillet 2013) au niveau des trois secteurs. Les données épidémiologiques, la prévalence des salmonelles, les sérovars prédominants et l'antibiorésistance ont été déterminés pour chaque secteur. Les sérovars les plus fréquents et les plus résistants ont été utilisés dans la deuxième étude pour la caractérisation moléculaire.

Étude 2 : Caractérisation moléculaire de souches de salmonelles isolées des aliments, des animaux et des humains

Dans cette partie du travail nous avons recherché :

- Les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques et de la virulence

Étude 1 :

Recherche des salmonelles au niveau humain, alimentaire et animal

I. Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué de selles de patients au niveau humain, de fèces et fientes de poulets au niveau vétérinaire et de carcasses de poulets au niveau alimentaire.

II. Méthodologie

A. Recherche des étiologies des diarrhées

1. Introduction

Il s'agissait d'évaluer la prévalence des salmonelles chez des sujets diarrhéiques. Les autres agents entéropathogènes étaient aussi recherchés dans le cadre de la coproculture classique afin d'identifier l'agent étiologique de la diarrhée.

2. Méthodes

2.1 Méthode d'échantillonnage

L'étude a porté sur des patients présentant des symptômes de diarrhées. Les structures sanitaires de Dakar et de sa banlieue (Dispensaire Saint Martin de Rebeuss (centre-ville), le centre de santé Baye Talla Diop (ex Dominique) de Pikine, ont été choisis pour le recrutement des patients entre juillet 2012 et juillet 2013. Des échantillons de selles étaient prélevés chez des patients diarrhéiques (enfants et adultes) sélectionnés au hasard et n'ayant pas reçu de traitement antibiotique de préférence dans les quinze jours précédant l'épisode diarrhéique. Une fiche de consentement éclairé était signée par les personnes majeures, les parents ou tuteurs si le patient était mineur, marquant ainsi leur accord à participer à l'étude.

Dès que les résultats des analyses étaient connus, ils étaient communiqués aux personnels soignant qui pouvaient ainsi adapter les traitements.

Par ailleurs, des souches de salmonelles isolées de patients diarrhéiques ont été également recueillies pendant la même période au laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

2.2 Recueil et validation des données

Pour chaque patient nous avons effectué un prélèvement de selles accompagné d'un questionnaire pour recueillir les données sociodémographiques (voir annexe 1). Les prélèvements étaient acheminés à l'unité de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar.

2.3 Diagnostic

2.3.1 Examen parasitologique des selles

L'examen macroscopique et microscopique des selles étaient effectués le premier jour.

Examen microscopique : L'examen à l'état frais était fait au grossissement X 40. La présence de leucocytes, d'hématies, de germes à mobilité caractéristique (*Vibrio cholerae*, *Campylobacter*), de formes parasitaires et de levures filamenteuses était rapportée sur la feuille de paillasse. La recherche des kystes et des œufs de parasites a été réalisée par la technique de coloration des selles après concentration avec une solution de Merthiolate Iode Formol. La coloration de Gram permettait d'évaluer la composition et l'état de la flore intestinale du patient.

2.3.2 Examen virologique des selles

La recherche des virus entériques (Adenovirus et Rotavirus) était effectuée au laboratoire de Bactériologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Dakar en utilisant le kit Vikia adénorotavirus (BioMérieux) 1 à 2 h après l'émission des selles. Le mode d'emploi, la lecture et l'interprétation des résultats sont présentés dans l'annexe 2.

2.3.3 La coproculture

2.3.3.1 Isolement et identification

Les selles ont été isolées sur des milieux sélectifs après enrichissement sur différents bouillons [sélénite, Mueller-Kauffman et eau peptonée (BioRad, France)] pour la recherche des salmonelles et de vibrions [Hektoen, BCP, Mac Conkey, (Bio Rad, France)] pour la recherche des shigelles et d'*Escherichia coli*. En outre, d'autres milieux sélectifs [Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine (CIN), Ryan, géloses Karmali (Oxoid, Allemagne)] étaient inoculés pour la recherche de *Campylobacter sp.* En cas de présence de colonies suspectes des techniques de routine étaient utilisés (recherche de l'uréase pour *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio*, oxydase et catalase pour *Campylobacter sp.*). Une galerie classique composée de Kligler-Hajna et de Citrate (BioRad, France) puis API 20^E était mise en route pour l'identification biochimique.

2.3.3.2 Sérotypage

Le sérotypage était réalisé par agglutination sur lame. Toutes les salmonelles étaient sérotypées avec des antisérums polyvalents et monovalents (Statens serum Institut 5, Artillerivej 2300 Cph.S Denmark).

L'agglutination des antigènes somatiques O (OMA, OMB, OMC, OMD et monovalents) et Vi des souches de salmonelles était faite après isolement des colonies sur gélose Mueller-Hinton (BioRad, France). En pratique, les sérums mélanges OMA et OMB permettent une bonne détermination des souches de *Salmonella* (99 %). L'utilisation des sérums monovalents anti-O permet de préciser le groupe auquel appartient la salmonelle.

L'Ag H peut renfermer jusqu'à trois phases, d'autres n'ont qu'une seule phase. Généralement ces phases n'apparaissent pas de façon simultanée et il faut procéder à une inversion de phase. Cela consiste à bloquer la phase qui a apparu sur de la gélose Sven gard afin de révéler les autres.

Enfin le tableau de Kauffmann-White est utilisé pour la détermination de la formule antigénique.

2.3.3.3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques était réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Mueller Hinton), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Edition de 2012 (**CASFM / www.sfm-microbiologie.org**).

Une lecture automatique des diamètres des zones d'inhibition des disques était obtenue à l'aide d'une caméra (**Osiris, BioRad, France**). Le classement en Sensible/Intermédiaire/Résistant était fait automatiquement par le logiciel Osiris en fonction des critères édictés par le CASFM Edition de 2012.

2.3.3.4 Analyse des données

La saisie des données a été réalisée sur Excel et l'analyse des données statistiques avec le logiciel R.

B. Evaluation du niveau de contamination par les salmonelles des poulets vendus à Dakar

1. Introduction

Il s'agit d'évaluer la prévalence des salmonelles chez les poulets commercialisés dans les différents marchés de Dakar.

Les risques de contamination se situent à tous les niveaux, de l'abattage à la vente en passant par le plumage et l'éviscération.

2. Recherche des salmonelles au niveau des poulets vendus à Dakar

2.1 Méthode d'échantillonnage

Le matériel biologique était constitué de carcasses de poulets plumés, éviscérés, conservés dans un sachet stérile (poulets de chair) et vendus en étalage dans les marchés polyvalents de Dakar ou des poulets vivants qui étaient abattus sur demande (poulets de ponte ou poulets du pays) (**Figure 6**) .



Figure 6 : Vente de poulets au Sénégal

Les prélèvements étaient réalisés par un technicien du Laboratoire de (LSAHE) de l'Institut Pasteur de Dakar. Plusieurs poulets entiers (20 à 30) étaient achetés par marchés, puis acheminés au laboratoire pour les examens microbiologiques ultérieurs, en respectant les meilleures conditions de conservation (0 à 4°C). Les marchés ciblés ont été : Sandaga, Tilène, Fass, Castors, Colobane, Grand Dakar, Grand Yoff et Parcelles assainies. Les prélèvements ne se faisaient pas au quotidien mais sur des périodes de 15 à 20 jours.

2.2 Méthodologie au laboratoire d'analyse

On recherchait *Salmonella* selon la norme ISO 6579 (2002), Amendement 1: 2007 méthodes horizontales pour la recherche des salmonelles.

La recherche des salmonelles chez le poulet se fait en quatre phases :

2.2.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide (eau peptonée)

- Ensemencer 25 g de chair de poulet dans 250ml d'eau peptonée à température ambiante.
- Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 h +/- 2h.

2.2.2 Enrichissement en milieu sélectif

Premier milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Rappaport-Vassiliadis-Soja (RVS)

- Transférer 0,1 ml d'eau peptonée dans 10ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis-Soja (RVS).
- Incuber à $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h \pm 3h.

- Les tubes où la culture s'est avérée négative après 24h, ont été ré-incubés pendant 24h supplémentaires.

* Deuxième milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Mueller-Kauffman au tétrationate-novobiocine (bouillon MKTTn)

- Transférer 0,1 ml d'eau peptonée dans 10ml de bouillon MKTTn

- Incuber à $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

- Les tubes où la culture s'est avérée négative après 24h, ont été ré-incubés pendant 24h supplémentaires.

2.2.3 Isolement et identification

A partir de la culture obtenue en bouillon ont été ensemencé deux milieux sélectifs solides : XLD et Hektoen.

2.2.4 Confirmation

Les colonies suspectes précédemment obtenues sont confirmées par des essais biochimiques (galerie classique ou galerie API 20E et sérologiques).

2.2.5 Sérotypage, détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Le sérotypage et la sensibilité des souches aux antibiotiques étaient réalisés au laboratoire de Bactériologie Expérimentale selon les mêmes conditions que les souches d'origine humaine.

2.3 Recueil et validation des données

La saisie des données a été réalisée sur Excel et l'analyse des données statistiques avec le logiciel R.

C. Évaluation du niveau de contamination des élevages de poulet de chair par les salmonelles

1. Méthode d'échantillonnage

La recherche des salmonelles se faisait au niveau des fermes localisées dans les zones de Sangalkam et de Keur Massar (figure 7).

Au début des travaux, 10 fermes avicoles dont 6 à Sangalkam et 4 à Keur Massar (figure 7) ont été sélectionnées sur la base du type de production, de l'effectif des élevages, de la fréquence de production et du consentement des propriétaires. Ainsi, les fermes choisies devraient produire régulièrement des poulets de chair et avoir un effectif minimum de 200 sujets par bâtiment.



A= Keur massar B= Sangalkam, source : google map

Figure 7 : Emplacement de Sangalkam et de Keur massar et une photo d'une ferme à Sangalkam

Les prélèvements étaient réalisés par un thésard du Laboratoire de Microbiologie de l'EISMV. Au niveau des fermes des sachets étaient utilisés comme sur chaussures pour éviter les contaminations d'une ferme à une autre. Les prélèvements étaient conservés au frais avant d'être acheminé au laboratoire.

Chaque échantillon correspondait à 5 pools de fientes prélevées dans un bâtiment. Le choix des bâtiments était fonction de la présence de bande de poulets et chacune des 10 fermes était visitée une fois par mois.

Mais, au cours des 5 derniers mois (février à juin), d'autres fermes supplémentaires ont été incluses dans l'étude, et les prélèvements ont été effectués à raison de 2 passages (espacés de 15 jours minimum). Au total, 268 échantillons ont été collectés, durant la période d'étude.

Une fiche était remplie sur la base d'un questionnaire standardisé (annexe 1).

2. Méthodes bactériologiques

La recherche des salmonelles sur les fientes de poulet était faite au laboratoire de microbiologie de l'EISMV.

On recherchait *Salmonella* selon la norme ISO 6579 (2002) : méthode horizontale pour la matière fécales des animaux et dans des échantillons environnementaux au stade de la production primaire (ISO 6579: 2002/Amd 1: 2007).

La recherche des salmonelles dans les fientes et litière des poulets nécessitait quatre phases :

2.1 Préenrichissement en milieu non sélectif liquide

- Ensemencer 25 g de fientes et / ou la litière des poulets dans 250 ml d'eau peptonnée à température ambiante.
- Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 18 h +/- 2h.

2.2 Enrichissement en milieu sélectif

- * Premier milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Rappaport-Vassiliadis - Soja (RVS).
- Transférer 0,1 ml d'eau peptonnée dans 10ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (RVS).
- Incuber à $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h \pm 3h.
- Les tubes où la culture s'est avérée négative après 24h, ont été ré-incubés pendant 24h supplémentaires.
- * Deuxième milieu d'enrichissement sélectif : bouillon Mueller-Kauffman au tétrationate-novobiocine (bouillon MKTTn).
- Transférer 0,1 ml d'eau peptonnée dans 10ml de Rappaport-Vassiliadis (RV).
- Incuber à $41,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h \pm 3h.
- Les tubes où la culture s'est avérée négative après 24h, ont été ré-incubés pendant 24h supplémentaires.

2.3 Isolement et identification

A partir de la culture obtenue ensemencer deux milieux sélectifs solides : XLD et Hektoen

2.4 Confirmation

- Repiquage des colonies présumées être des salmonelles isolées.
- Confirmation au moyen des essais biochimiques et sérologiques.

2.5 Sérotypage, détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques

Le sérotypage et la sensibilité des souches aux antibiotiques étaient réalisés à l'Unité de Bactériologie Expérimentale selon les mêmes conditions que les souches d'origine humaine.

3. Recueil et validation des données

La saisie des données a été réalisée sur Excel et l'analyse des données statistiques avec le logiciel R.

D. Détermination des CMI et conjugaison bactérienne

Les CMI ont été déterminées pour les souches qui présentaient des résistances aux quinolones. La conjugaison bactérienne a été faite pour vérifier la transférabilité des résistances aux différents antibiotiques utilisés.

1. Détermination des CMI

La CMI est la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'interrompre, dans un milieu, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée.

La détermination des CMI pour les souches résistantes aux quinolones a été faite par la méthode E-Test. L'acide nalidixique et la ciprofloxacine ont été testés. Le mode opératoire est mis en annexe 7.

2. Conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne est un transfert d'élément génétique d'une bactérie à une autre par contact. Le mode opératoire qui décrit les différentes étapes de réalisation d'une conjugaison bactérienne est mis en annexe 8.

III. Résultats, discussion et conclusion

1. Résultats globaux

Au total, **186** prélèvements de selles de patients ont été collectées au niveau du Dispensaire Saint Martin et du centre de santé Baye Talla Diop de Pikine. Les salmonelles étaient retrouvées sur **10** selles de patients, soit une prévalence de **5%**. 21 souches de salmonelles isolées de patients diarrhéiques ont été également recueillies pendant la même période au laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Pasteur de Dakar.

300 poulets étaient achetés en étalages dans les principaux marchés de Dakar et de sa banlieue ; plus de la moitié de ces poulets (**n=160**) étaient contaminés par un ou plusieurs salmonelles, soit une prévalence de **53%**.

Au niveau des fermes avicoles **268** prélèvements de fientes de poulets ont été réalisés, **47** étaient positifs avec une ou plusieurs salmonelles ce qui donne un total de **84** souches de salmonelles soit une prévalence de **18%**.

1.1 Recherche des étiologies des diarrhées

1.1.1 Population d'étude

Données épidémiologiques

Parmi les 27 prélèvements effectués au centre de santé Baye Talla Diop de Pikine, aucune souche de salmonelles n'avait été isolée. Par contre au dispensaire St Martin de Rebeuss, **159** prélèvements ont été effectuées, 10 selles étaient positives à *Salmonella* (soit une prévalence

de 6%). Ces salmonelles ont été prélevées en majorité chez des patients âgés de moins de cinq ans (72%), qui constituait la majeure partie de la population d'étude (**tableau I**).

Onze patients avaient pris un antibiotique et **39** autres étaient en contact avec des animaux domestiques tels que les chats, les chiens, les poules, les chèvres, les moutons, les ânes. **Un** seul patient avait mangé un aliment suspect, **41** étaient déshydratés. Les selles étaient le plus souvent liquides (35%) et/ou glaireuses (54%). La présence de sang dans les selles était notée dans 5% des cas. Cependant, dans certains cas de diarrhées, les selles pouvaient être molles (4%), molles et glaireuses (1%) ou pâteuses (1%).

La majorité des patients était constituée d'enfants âgés de moins de cinq (72%).

Tableau I : Répartition des patients par tranche d'âge au Dispensaire St Martin de Rebeuss

Tranche D'âge	Nombre	(%)	Positifs/ Salmonelles	(%)
[0-5[114	72%	7	70%
[5-10[10	6%	0	0%
[10-15[3	2%	0	0%
[15-20[3	2%	0	0%
[20-25[1	1%	1	10%
≥ 25	28	17%	2	20%
Total	159	100	10	100%

1.1.2 Résultats microbiologiques

- Résultats parasitologiques

Les parasites retrouvés sont consignés dans le tableau II.

Tableau II : Répartition des parasites retrouvés dans les selles

Parasites	Nombre
Formes Végétatives d' <i>Entamoeba histolytica histolytica</i>	5
Œuf d' <i>Ascaris</i>	4
Formes Végétatives de <i>Giardia lamblia</i>	1
Œufs de <i>trichocéphale</i>	1

- Résultats virologiques

La prévalence des virus entériques au Dispensaire St Martin de Rebeuss était de 38% (n=61/159) avec une légère prédominance des adénovirus (n=49/159) sur les Rotavirus (n=45/159) (tableau III).

Tableau III : Répartition des adénovirus et des rotavirus identifiés au Dispensaire St Martin de Rebeuss

Virus Entériques	Nombre	(%)
Rotavirus	12	12/159(8)
Adénovirus	16	16/159(10)
Adéno+Rota	33+33	33/159(21)
total	94	61/159(39%)

La prévalence des virus entériques au centre de santé Baye Talla Diop de Pikine était de (26%) avec une légère prédominance des rotavirus (4) sur les adénovirus (3).

- Résultats bactériologiques

La coproculture a été faite sur l'ensemble des échantillons du centre de santé Dominique de Pikine mais aucune salmonelle n'a pu être identifiée. Toutefois, d'autres bactéries entéropathogènes ont pu être isolées, dominées par *Shigella* et *Escherichia coli*. Les sérogroupes des shigelles ont été *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii* C1 (figure 8).

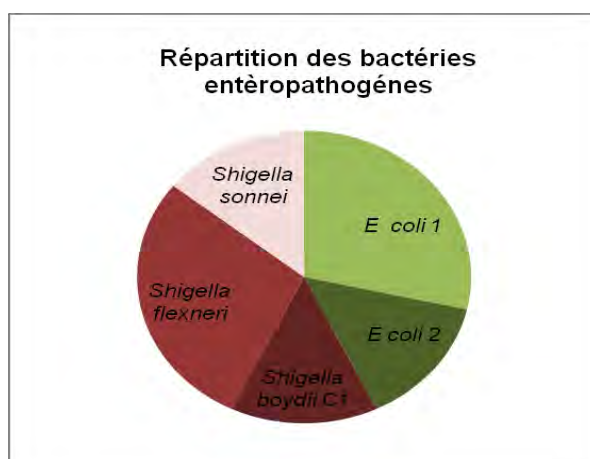


Figure 8 : Répartition des bactéries entéropathogènes isolées des selles au centre de santé Baye Talla Diop de Pikine

Campylobacter, *Shigella* et *Escherichia coli* étaient les autres bactéries entéropathogènes isolées au niveau des selles (Figure 9).

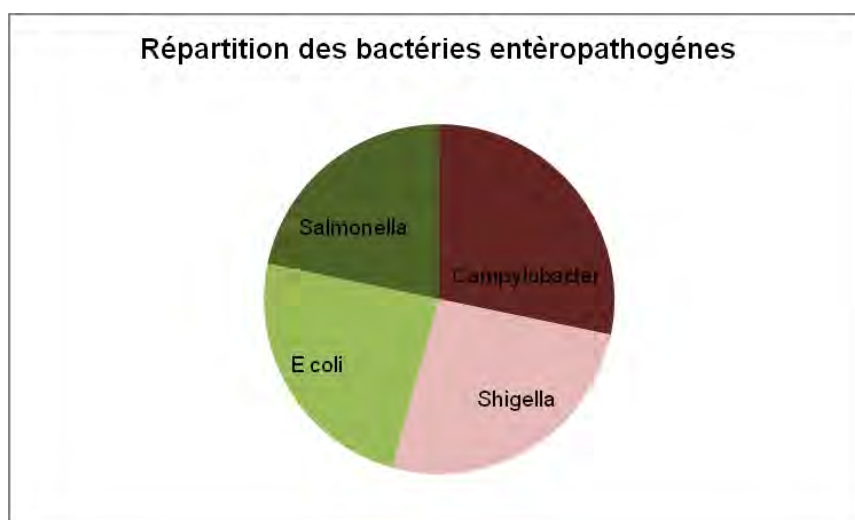


Figure 9 : Répartition des bactéries entéro-pathogènes isolées des selles de patients au Dispensaire S^t Martin de Rebeuss

Au total sept sérovars de salmonelles étaient retrouvés au niveau des selles de patients du Dispensaire S^t Martin de Rebeuss. Le sérovar Enteritidis était majoritaire suivi d'Agona (tableau IV). Quant au laboratoire de Biologie Médicale 16 sérovars ont été retrouvés (tableau V).

Tableau IV : Distribution des sérotypes de *Salmonella* isolées au Dispensaire S^t Martin de Rebeuss

Sérotypes	Nombre
Salmonelles	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	3
<i>Salmonella</i> Agona	2
<i>Salmonella</i> Lockleaze	1
<i>Salmonella</i> Waycross	1
<i>Salmonella</i> Suberu	1
<i>Salmonella</i> Washington	1
<i>Salmonella</i> Angoda	1

Tableau V : Répartition des sérotypes de salmonelles isolées des selles de patients au Laboratoire de Biologie Médicale

Sérotypes	Nombre
<i>Salmonella</i> Brancaster	2
<i>Salmonella</i> Enteritidis	2
<i>Salmonella</i> Kentucky	2
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	2
<i>Salmonella</i> Senftenberg	2
<i>Salmonella</i> Istanbul	1
<i>Salmonella</i> Sandiego	1
<i>Salmonella</i> Baildon	1
<i>Salmonella</i> Caen	1
<i>Salmonella</i> Chester	1
<i>Salmonella</i> Corvallis	1
<i>Salmonella</i> Marseille	1
<i>Salmonella</i> Nyborg	1
<i>Salmonella</i> Poona	1
<i>Salmonella</i> Isangi	1
<i>Salmonella</i> Somone	1
Total	21

1.1.3 Distribution des sérovars de salmonelles

Les **31** souches de salmonelles collectées appartenaient à 22 sérovars. Le sérovar Enteritidis était majoritaire, suivi des sérovars Senftenberg, Schwarzengrund, Agona, Brancaster, Kentucky (figure 10).

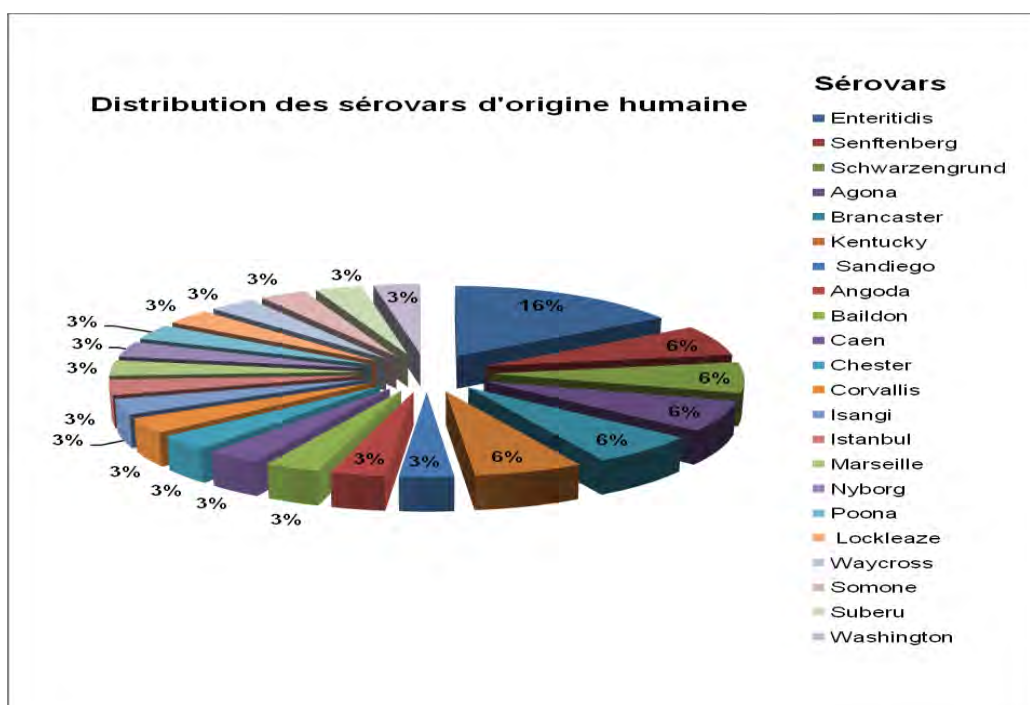


Figure 10 : Distribution des sérovars de *Salmonella* d'origine humaine

Les salmonelles d'origine humaine étaient retrouvées avec un pic à la période de chaleur telle que le mois d'Août, septembre, octobre, juin et juillet. Une baisse était notée de décembre à avril (figure 11).

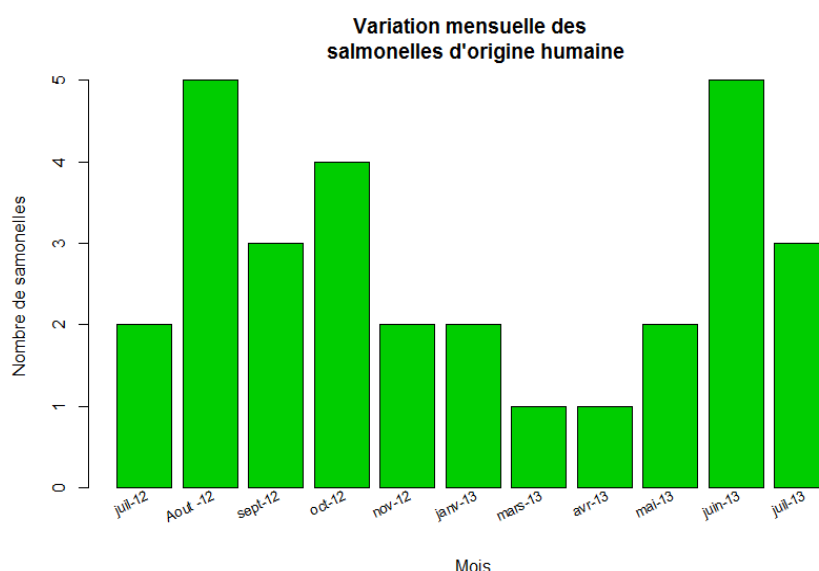


Figure 11 : Répartition mensuelle des salmonelles d'origine humaine

1.1.4 Antibiorésistance des souches de salmonelles

L'antibiogramme a été réalisé et la lecture était faite selon les recommandations du CASFM 2012. Selon le CASFM l'acide nalidixique étant le marqueur de résistance des quinolones chez *Salmonella*, toute souche résistante à l'acide nalidixique résiste aux autres quinolones, y compris les fluoroquinolones. La majorité des souches d'origine humaine étaient des souches sauvages (65%). Parmi ces salmonelles 35%, étaient résistantes à au moins un antibiotique, 6% de ces salmonelles étaient résistantes aux quinolones. Les sérovars Enteritidis et Poona étaient les plus résistants avec une résistance à plus de quatre antibiotiques. Seul le sérovar Enteritidis présentait une résistance aux quinolones et fluoroquinolones. Par contre, le sérovar Poona présentait des résistances aux céphalosporines de 3^{ème} génération, à la gentamicine et au chloramphénicol (tableau VI). Aucune souche n'était résistante à l'imipénème et à l'amikacine (figure 12).

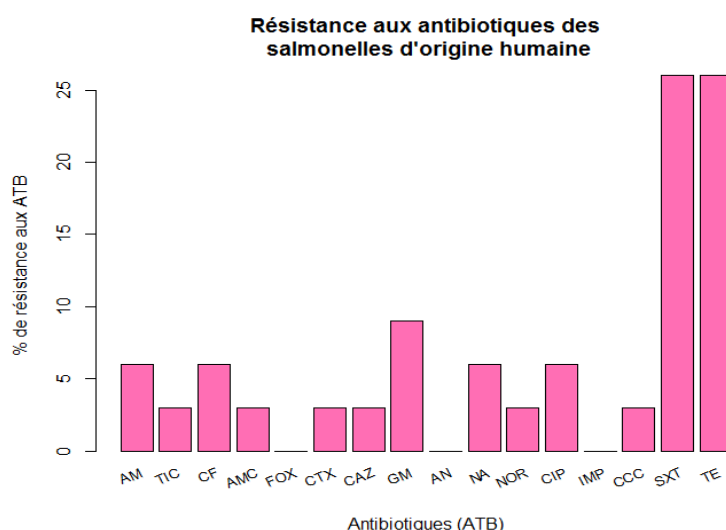


Figure 12 : Pourcentage de résistance des salmonelles d'origine humaine

AM : amoxicilline, TIC : ticarcilline, FOX : céfoxitine, CF : céfalotine, CTX : céfotaxime, AMC : amoxicilline + acide clavulanique, CAZ : céftazidime, IMP : imipénème, GM : gentamicine, AN : amikacine, NA : acide nalidixique, TE : tétracycline, NOR : norfloxacine, CIP : ciprofloxacine, SXT : triméthoprim + sulfaméthoxazole C : chloramphénicol

Tableau VI : Profils de résistance des souches de *Salmonella* isolées des selles humaines.

Sérovars	Profils de résistance	Nombre d'isolats
Poona	AM-CF-TIC-CTX-AMC-CAZ-GM-SXT-CCC	1
Enteritidis	AM-NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	GM-NOR-NA-CIP	1
Kentucky	GM-SXT-TE	1
Brancaster	SXT-TE	2
Somone	SXT-TE	1
Baildon	SXT-TE	1
Chester	CF-TE	1
Corvallis	SXT	1
Senftenberg	SXT	1

1.2. Evaluation du niveau de contamination par les salmonelles des poulets vendus en étalage

1.2.1 Description des sites de vente et d'élevage des poulets à Dakar

Les résultats des fiches d'enquête ont permis de décrire les sites de vente des poulets à Dakar. Dans cette étude, les carcasses de poulets étaient achetées au niveau des marchés de Dakar. Les poulets étaient élevés au niveau des élevages industriels ou traditionnels en zone rurale ou urbaine. Les sites de vente des carcasses de poulets étaient satisfaisants dans l'ensemble, sauf au marché Tilène où l'hygiène était non satisfaisante à 40%. Les carcasses de poulets étaient à 78% contaminés par les salmonelles. La majorité des carcasses de poulets étaient vendue en étalage et en sachet individuelle (tableau VII).

Tableau VII : Les sites de vente et la provenance des poulets à Dakar

		Hygiène & Environnement			Provenance			Zone d'élevage		Nombre salmonelles
		NS	A	S	EI	ET	ESI	U	R	
Sandaga	PC	2	5	6	-	13	-	1	12	13
	PP	-	-	2	-	2	-	-	2	2
	PPR	2	-	-	-	-	2	2	-	2
Tilène	PC	7	14	-	16	-	5	5	15	21
	PP	8	13	-	17	-	4	13	8	21
Fass	PC	-	-	5	5	-	-	-	-	5
	PPR	-	5	-	-	-	5	-	5	5
Castor	PC	-	4	-	4	-	-	4	-	4
	PP	-	8	2	2	-	8	-	10	10
Colobane	PC	-	5	-	3	2	-	-	5	5
	PP	-	4	-	1	3	-	-	4	4
	PPR	-	7	-	7	-	-	4	3	7
Grand	PC	-	8	-	8	-	-	-	8	8
Dakar	PP	-	10	-	10	-	-	-	10	10
	PPR	-	5	-	5	-	-	4	1	5
Grand Yoff	PC	-	4	5	9	-	-	7	2	9
	PP	-	8	-	8	-	-	4	4	8
	PPR	-	1	-	1	-	-	1	-	1
Parcelles	PC	3	4	9	13	3		16	-	16
Assainies	PP	-	5	-	5	-	-	3	2	5

NS : Non satisfaisant, A : Acceptable, S : Satisfaisant, EI : Elevage industriel, ET : Elevage traditionnel, ESI : Elevage semi industriel, U : Urbaine, R : Rurale

PP : Poulet du pays ; PC : Poulet de chair ; PPR : Poule pondeuse réformée

Etude de la présence de salmonelles en fonction du type de poulet, de la provenance, zone d'élevage, l'hygiène de l'environnement et du conditionnement.

Seuls trois paramètres influent sur la présence et l'absence de salmonelles, il s'agit de la provenance, le conditionnement et la zone d'élevage ($P < 0.002$).

L'élevage semi industriel a 3,105 fois moins de chance d'avoir des salmonelles que l'élevage traditionnel. L'élevage en zone urbaine a 1,999 fois moins de chance d'avoir des salmonelles que l'élevage en zone rurale. Le conditionnement des poulets en sachet individuel a 0,33 fois moins de chance d'avoir des salmonelles que le conditionnement à l'air libre.

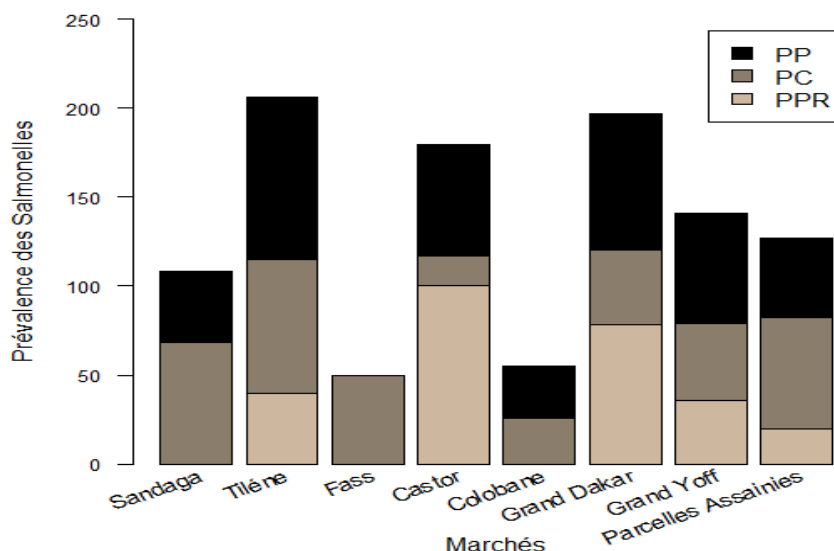
1.2.2 Type de poulets vendus et niveau de contamination

Un prélèvement a été effectué sur les **300** poulets, achetés en étalages dans les principaux marchés de Dakar et de sa banlieue. Plus de la moitié de ces poulets ($n=160$) étaient contaminés par une ou plusieurs salmonelles, soit une prévalence de **53%**. Au total, **273** souches de salmonelles ont été isolées des carcasses de poulets.

Trois types de poulets ont été achetés dans cette étude :

- Poulet de chair (PC), ou poulets provenant généralement de l'aviculture moderne.
- Poulet du pays (PP), poulet local, ou poulets provenant de l'aviculture traditionnelle.
- Poule pondeuse réformée (PPR) ou poulets destinés à la ponte des œufs.

La prévalence des salmonelles était élevée pour les poulets de chair vendus au marché Tilène (75%), Sandaga (68%), Parcelles Assainies (62%), Fass (50%), Grand Yoff (43%) et Grand Dakar (42%). De même que pour les poulets du pays la prévalence des salmonelles était élevée au marché Tilène (91%), Grand Dakar (77%), Castor (62,5%), Grand Yoff (62%), Parcelles Assainies (45%) et Sandaga (40%). Quant aux poules pondeuses réformées la prévalence des salmonelles était élevée au niveau des marchés de Castors (100%), Grand Dakar (78%) et de Tilène (40%) (**figure 13**).



PP : Poulet du pays

PC : Poulet de chair

PPR : Poule pondeuse Réformée

Figure 13 : Prévalence des salmonelles isolées au niveau des poulets en fonction des marchés de Dakar

1.2.3 Distribution des sérovars

Le serotypage effectué sur l'ensemble des souches collectées nous ont permis d'identifier 20 sérovars différents. Seulement, 2 souches n'ont pu être identifiées, puisque ne correspondant à aucun profil sur le schéma de Kauffman-White. Les sérovars Istanbul (70/273, 26%), Brancaster (51/273, 19%) et Kentucky (33/273, 12%) étaient prédominants. Les sérovars Senftenberg, Give, Llandoff, Sandiego, Indiana, Swarzenrund, Chester, Newlands, Hadar, Havana, Typhimurium, Massembe, Ouakam et autres étaient aussi isolés (**figure 14**).

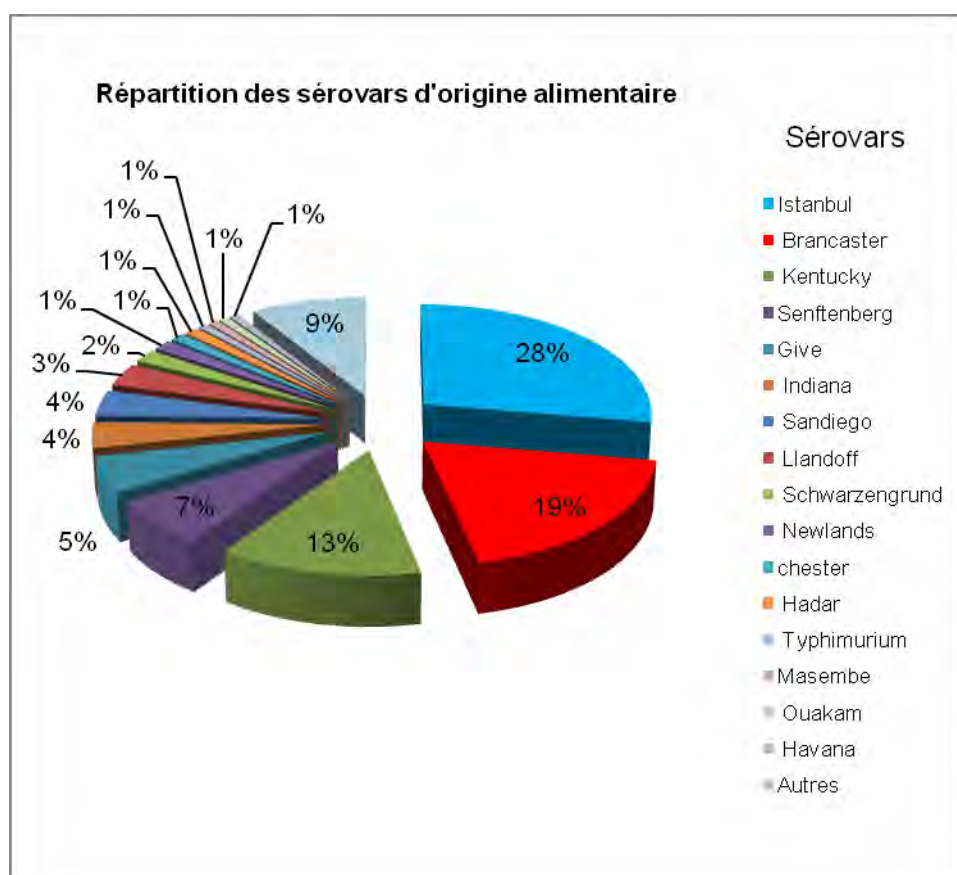


Figure 14 : Variation des sérovars d'origine alimentaire

Avec la prévalence des salmonelles en fonction des mois un pic a été relevé pendant les périodes de fortes canicules (Juin-Juillet 2013). Toutefois, un artefact a été noté en Décembre 2012 (**figure 15**).

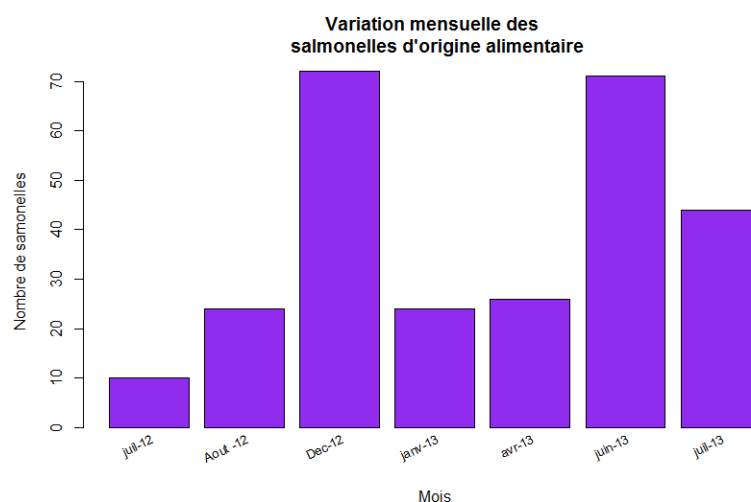


Figure 15: Variations mensuelle des salmonelles isolées des carcasses de poulets

1.2.4 Antibiorésistance

L'antibiogramme a été réalisé, la lecture et l'interprétation étaient faites selon les recommandations du CASFM 2012. **25%** des 273 souches de salmonelles isolées étaient des souches sauvages. Au total **21%** soit **57** souches étaient résistantes aux quinolones ou fluoroquinolones. **75%** soit 204 souches présentaient une résistance à un ou plusieurs antibiotiques.

Le premier profil est le NATeS montrant une résistance aux quinolones et aux fluoroquinolones, à la tétracycline et à la streptomycine qui sont des antibiotiques couramment utilisées en médecine vétérinaire.

Le deuxième profil est le CFGNA qui montre une résistance à la gentamicine, aux quinolones, et aux céphalosporines de 1, 2 et 3 générations qui sont des antibiotiques couramment utilisées en médecine vétérinaire et humaine. Le troisième profil est CFNAGT montrant une résistance aux céphalosporines de 1, 2 et 3 générations aux quinolones, aux fluoroquinolones et à la tétracycline. Le quatrième profil est le CFNAGT montrant une résistance aux céphalosporines de 1, 2 et 3 générations aux quinolones et aux fluoroquinolones, à la tétracycline et à l'imipénème (**tableau VIII**).

Tableau VIII : Profils de résistance des salmonelles d'origine alimentaire

Sérovars	Profils de résistance	Nombre d'isolats
Istanbul	TE	13
	SXT-TE	35
	SXT-TE-C	1
	GM-SXT-TE	1
	GM-NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Brancaster	NOR-CIP-NA-SXT-TE	14
	TE	21
	SXT-TE	19
	NOR-CIP-NA-TE	7
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	2
Kentucky	AMX-AMC-CF-SXT-FOX-TE	1
	AMX-NOR-CIP-CF-NA-SXT-FOX-TE	1
	SXT	6
	SXT-TE	2
	SXT	1
Senftenberg	GM-SXT-TE	12
	NOR-CIP-NA-TE	1
	AMX-AMC-CF-FOX	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	4
	CTX-NOR-TIC-CIP-NA	1
Sandiego	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-TE	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-TE	1
	C	1
	TE	1
Hadar	TIC-CAZ-C	1
	CTX-NOR-CAZ	1
	CTX-NOR-CAZ-C	1
	AMX-NOR-CAZ-C	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Indiana	CTX-NOR-CIP-CAZ-IMP-C	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-IMP-TE	1
	SXT-TE	2
	NOR-CIP-NA	2
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	3
Masembe	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	AMX-NOR-TIC-CIP-NA-TE	1
	AMX-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-SXT-IMP-TE-C	1
	SXT-TE	5
	GM-SXT-TE	2
Give	SXT-TE	1
	SXT	1
	SXT-FOX-TE	2
	TE	2
	SXT-TE	6
Llandoff	GM	1
Schwarzengrund	TE	2
Typhimurium	TE	1
Tsevie	NOR-CIP-NA-TE	1
Johannesburg	SXT-TE	1
Llobregat	NOR-CIP-NA-TE	1
Farsta	NOR-CIP-NA-TE	1
Benfica	NOR-CIP-NA-TE	1
Abony	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Ruzizi	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Phaliron	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Gera	AMX-NOR-AMC-CIP-NA-FOX-TE	1
Yeerongpilly	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-TE	1

L'étude des pourcentages de résistance montrait des résistances très élevées à la tétracycline (66%) et à la streptomycine (47%). Une résistance était notée pour les quinolones (18%) et fluoroquinolones (18%). La résistance était plus faible pour les céphalosporines (2 à 5%), au chloramphénicol (2%) et à la gentamicine (8%) (**Figure 16**).

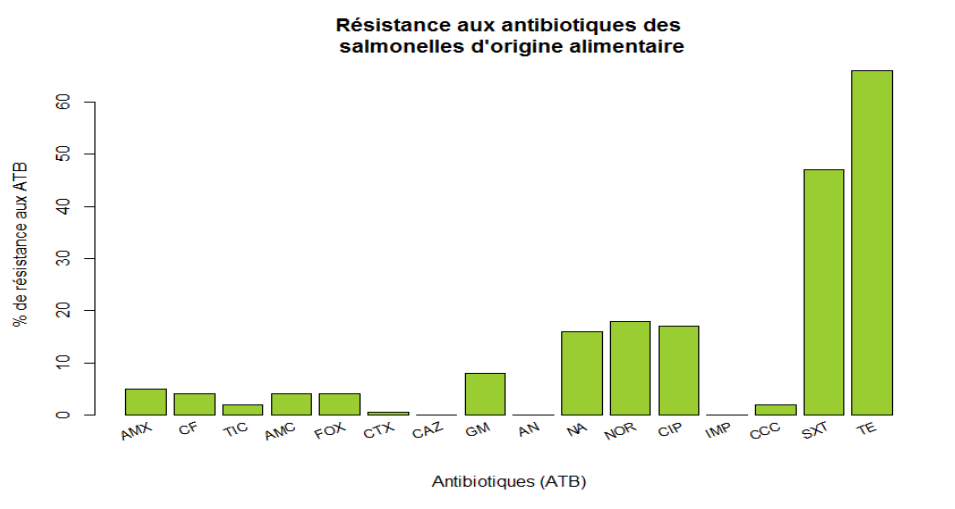


Figure 16: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des salmonelles d'origine alimentaire

AM : amoxicilline, **TIC** : ticarcilline, **CF** : céfalotine, **FOX** : céfoxitine, **CTX** : céfotaxime, **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique, **CAZ** : céftazidime, **IMP** : imipénème, **GM** : gentamicine, **AN** : amikacine, **NA** : acide nalidixique, **TE** : tétracycline, **NOR** : norfloxacin, **CIP** : ciprofloxacine, **SXT** : triméthoprim + sulfaméthoxazole, **C** : chloramphénicol

1.3. Evaluation du niveau de contamination des élevages de poulet de chair par les salmonelles

1.3.1 Description des élevages de poulets

Les résultats des fiches d'enquête ont permis de faire la description des élevages de poulets voir tableau IX. Tous les poulets étaient de race inconnue par les éleveurs. L'étude a été faite au niveau des élevages de poulets de Sangalkam et de Keur massar. L'hygiène était acceptable dans l'ensemble (figure 17), le pédiluve absent dans la majorité des cas. L'eau de la SDE, l'eau de puits en majorité et le forage étaient utilisés. Tous les éleveurs utilisaient les facteurs de croissance contenant des antibiotiques.

Tableau IX: Descriptions des élevages de poulet de chair visités dans la zone périurbaine de Dakar.

Capacité de production	200-750 sujets	1000-2500 sujets	Total
Nombre d'élevage	14	6	20
Localité			
SangalKam	11	3	14
Keur Massar	3	3	6
Condition d'hygiène			
Acceptable	7	4	11
Non satisfaisante	7	2	9
Pédiluve			
Présente	0	2	2
Absente	14	4	18
Abreuvement			
SDE	3	3	6
Eau de puits	9	2	11
Forage	2	1	3
Utilisation de facteurs de croissance contenant des antibiotiques			
Oui	14	6	20
Non	0	0	0

**Figure 17 :** Photo de ferme à hygiène acceptable



Figure 18: Photo de ferme à hygiène non satisfaisante

Prévalence de contamination par *Salmonella*

Les salmonelles étaient retrouvées au moins une fois dans les 14 fermes sur les 20 visités, soit un pourcentage de contamination de 70%. Sur les 14 fermes contaminées par les salmonelles, 9 sont localisées à Sangalkam et les 5 autres à Keur Massar.

268 prélèvements de fientes de poulets ont été réalisés, 47 étaient positifs avec une ou plusieurs salmonelles ce qui donne un total de 84 souches de salmonelles.

Nous avons ainsi obtenu un taux d'isolement de 17,53% à partir des 268 échantillons. Dans les 2 localités, les taux d'isolement ne diffèrent pas de façon significative et sont respectivement de 17,8% et 17,1%.

La localité, la phase de croissance ou l'âge des animaux, l'état de la litière, l'aliment et l'eau distribués n'influençaient pas de façon significative sur la présence des salmonelles dans les élevages ($p > 0,05$). Les analyses statistiques, réalisées à partir des données obtenues des fiches de prélèvement, ont montré que seules les conditions d'hygiène avaient un impact significativement sur la présence des salmonelles ($p \leq 0,05$). Lorsque les conditions d'hygiène sont acceptables, la prévalence est de 12,5% alors qu'elle est de 26,15% lorsque les conditions sont non satisfaisantes.

1.3.2 Distribution des sérovars

Le sérotypage a été fait selon le schéma de Kauffman-White. Au total 17 sérovars ont été identifiés. Les sérovars Kentucky, Brancaster, San Diego, Urbana étaient majoritaires (figure 19).

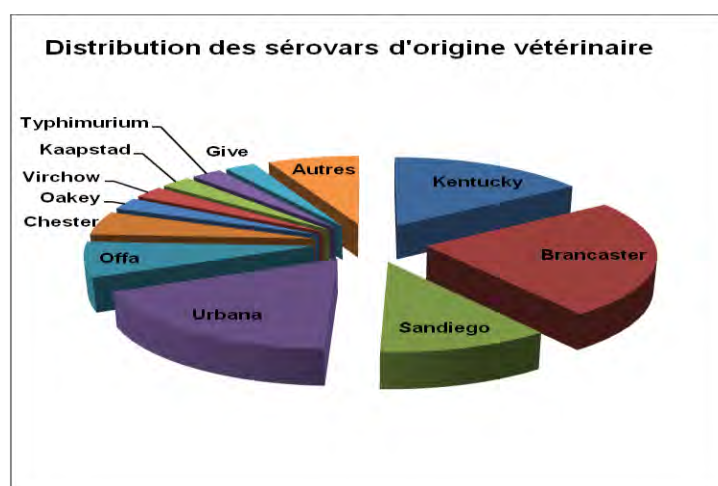


Figure 19 : Répartition des sérovars de *Salmonella* dans les élevages de poulet de chair de la zone péri-urbaine de Dakar

Pendant la durée de l'étude, la prévalence des salmonelles ne variait pas significativement selon les mois. En décembre 2012, une baisse de la prévalence était observée et qui persiste jusqu'au mois de février. Puis une hausse au mois de mars et avril et connaissait un pic au mois de juin (figure 20).

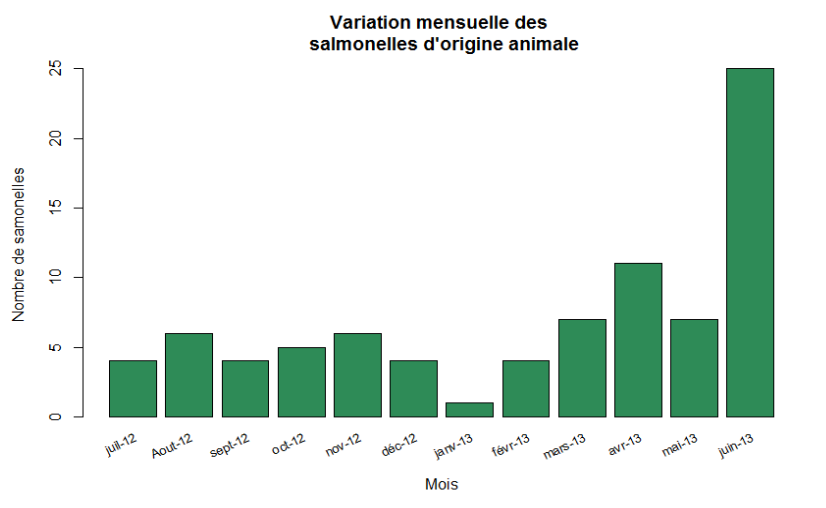


Figure 20 : Variations mensuelle des salmonelles d'origine animale (2012-2013)

1.3.3 Antibiorésistance

Au total 56% soit 47 souches étaient résistantes à un ou plusieurs antibiotiques et 30% soit 29 souches étaient résistantes aux quinolones et aux fluoroquinolones.

Ainsi, le premier profil de résistance a été le NATeS avec une résistance, aux quinolones et fluoroquinolone, à la tétracycline et à la streptomycine, en raison de leur forte utilisation en médecine vétérinaire, suivi du profil GNAC qui montre une résistance à la gentamicine, aux quinolones et aux céphalosporines de 1, 2 et 3 génération qui sont également couramment utilisées en médecine vétérinaire et humaine (tableau X).

Tableau X : Profils de résistance des souches de *Salmonella* isolées des fientes de poulets

Sérovars	Profils	Nombre
Brancaster	TE	7
	SXT	4
	NA-NOR-CIP-TE-SXT	3
	NA-NOR-CIP-SXT	1
	NA-NOR-CIP	1
	AM-CF-GM-TE-NOR-SXT	1
	SXT	1
Kentucky	TE-SXT-C	1
	AM-TIC-FOX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CIP	3
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CIP	3
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP	3
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP-SXT-C	2
Urbana	NA-NOR-CIP	1
Sandiego	GM-TE	1
	TE-SXT	1
	NA-NOR-CIP-TE-SXT	7
Chester	NA-NOR-CIP-TE-SXT	2
	TIC-AMC-TE-SXT	1
Kaapstad	AMC-TIC-NA-TE-SXT	1
Give	TE	1
	AMC-TIC-SXT	1
Rissen	AMC-TIC-GM-TE	1
Total		47

L'étude de la résistance aux antibiotiques montrait des pourcentages très élevés, à la tétracycline (48%) et aux quinolones et aux fluoroquinolones (23%). Par contre, la résistance n'était pas observée avec le chloramphénicol et l'amikacine qui n'étaient pas très utilisés en médecine vétérinaire (figure 21).

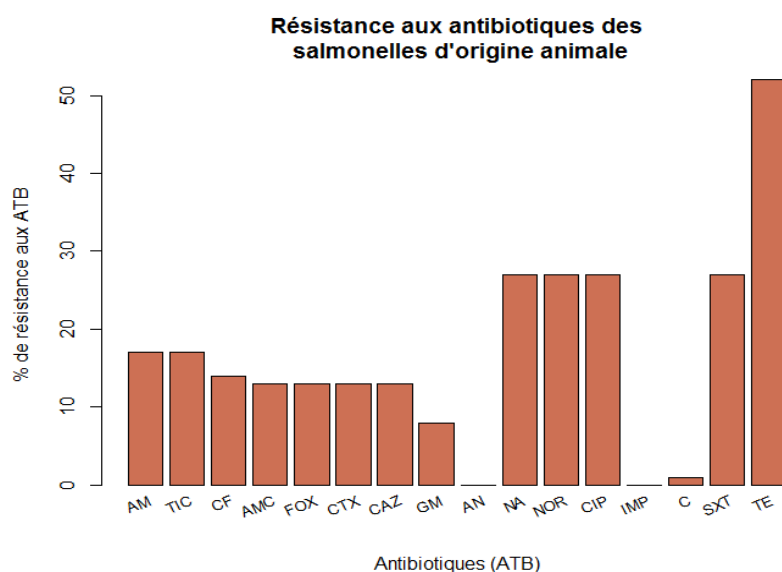


Figure 21 : Pourcentage de résistance des salmonelles aux antibiotiques

AM : amoxicilline, **TIC** : ticarcilline, **CF** : céfalotine, **FOX** : céfoxitine, **CTX** : céfotaxime, **AMC** : amoxicilline + acide clavulanique, **CAZ** : céftazidime, **IMP** : imipénème, **GM** : gentamicine, **AN** : amikacine, **NA** : acide nalidixique, **TE** : tétracycline, **NOR** : norfloxacine, **CIP** : ciprofloxacine, **SXT** : triméthoprime + sulfaméthoxazole **C** : chloramphénicol

1.4. Résultats des CMI et de la conjugaison bactérienne

- Détermination des CMI

Les résultats des CMI étaient $>32\mu\text{g/ml}$ et $>256\mu\text{g/ml}$ sur toutes les souches respectivement pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique voir tableau XI. Ce résultat prouvait un niveau de résistance très élevé des souches surtout celles d'origine alimentaire.

Tableau XI : Détermination des CMI de salmonelles NA^R et CIP^R

Origine / Sérovars	Phénotypes de résistance (mm)		CMI (µg/ml)	
	NA	CIP	NA	CIP
Humaine				
435 Enteritidis	6	27	>256	>32
B 17 Enteritidis	6	30	>256	= 32
Animale				
V20 Brancaster	14	27	>256	>32
V35 Sandiego	14	27	>256	= 0,38
V39 Sandiego	12	28	>256	>32
V40 Chester	12	28	>256	>32
V44 Urbana	0	30	= 192	= 0,19
V45 Kentucky	0	8	>256	>32
V54 Kentucky	0	8	>256	>32
V71 Sandiego	13	26	= 48	>32
V75 Kentucky	0	9	>256	>32
V82 Urbana	0	22	>256	= 0,125
Alimentaire				
L1 Kentucky	0	10	>256	>32
L2 Ruzizi	0	11	>256	>32
L8 Hadar	12	24	>256	>32
L20 Kentucky	0	10	>256	>32
L22 Kentucky	0	8	>256	>32
L24 Senftenberg	0	12	>256	>32
L26 Kentucky	0	8	>256	>32
L28 Kentucky	0	0	>256	>32
L30 Benfica	0	24	>256	>32
L32 Abony	0	20	>256	>32
L33 Kentucky	0	0	>256	>32
L39 Kentucky	0	25	= 48	= 0,125
L51 Brancaster	14	27	>256	>32
L55 Brancaster	14	25	>256	>32
L58 Brancaster	19	19	>256	>32
L70 Kentucky	14	8	>256	>32
L74 Farsta	18	26	>256	= 1,5
L83 Istanbul	13	24	>256	>32
L115 Sandiego	13	26	>256	>32
L138 Hadar	17	28	>256	>32
L141 Gera	16	20	>256	>32
L204 Kentucky	0	9	>256	>32
L261 Istanbul	10	25	>256	= 1
L271 Istanbul	8	25	>256	>32
L275 Istanbul	12	22	>256	>32

La figure 22 est une photo du test de CMI de la CIP et de NA.

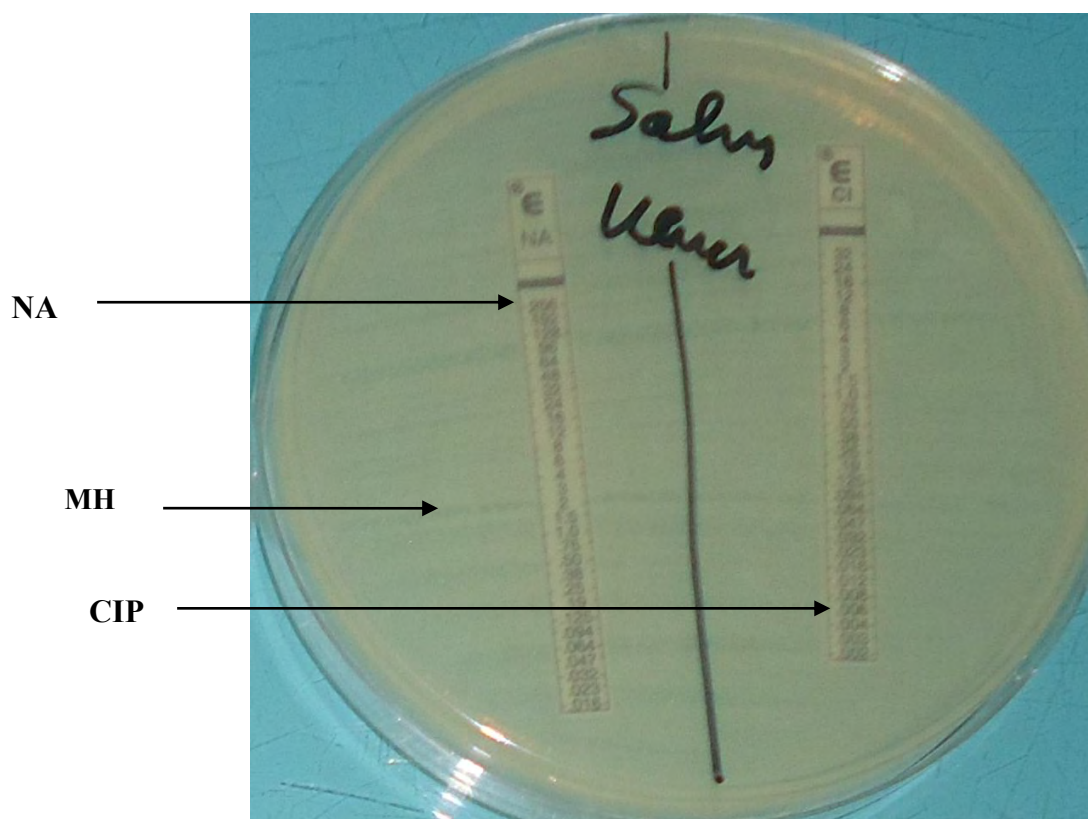


Figure 22 : Photo de CMI de la CIP et de NA des souches de *salmonella* Nal^R

- Conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne a été faite sur les souches porteuses des intégrons de classes 1. L'antibiogramme réalisé sur les transconjugants a montré le transfert en bloc de la résistance des souches d'études donatrices vers la souche réceptrice. Ce qui montre que les gènes de résistance sont portés par des plasmides (tableau XII).

Tableau XII: Résultats de l'antibiogramme des transconjugants de 10 souches de salmonelles

Antibiotiques testés	<i>E. coli</i> NalR	Sal9D	Sal9T	Sal19D	Sal19T	Sal75D	Sal75T	L20D	L20T	L27D	L27T
AM	24[S]	26[S]	24[S]	27[S]	22[S]	0[R]	0[R]	26[S]	24[S]	0[R]	0[R]
TIC	28[S]	26[S]	27[S]	30[S]	25[S]	0[R]	0[R]	28[S]	25[S]	0[R]	0[R]
AMC	31[S]	28[S]	28[S]	32[S]	24[S]	10[R]	0[R]	26[S]	24[S]	19[I]	20[I]
CF	28[S]	25[S]	20[S]	27[S]	23[S]	0[R]	0[R]	27[S]	23[S]	16[I]	19[S]
FOX	40[S]	29[S]	30[S]	25[S]	29[S]	9[R]	0[R]	28[S]	29[S]	26[S]	22[S]
CTX	44[S]	30[S]	29[S]	33[S]	30[S]	14[R]	0[R]	33[S]	30[S]	30[S]	28[S]
IMP	30[S]	31[S]	34[S]	34[S]	32[S]	24[S]	25[S]	28[S]	32[S]	23[S]	30[S]
NA	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]
NOR	29[S]	34[S]	27[S]	30[S]	26[S]	7[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]
CIP	30[S]	35[S]	32[S]	34[S]	30[S]	9[R]	0[R]	0[R]	0[R]	9[R]	0[R]
GM	20[S]	25[S]	29[S]	24[S]	24[S]	10[R]	0[R]	20[S]	24[S]	11[R]	20[S]
C	30[S]	25[S]	28[S]	12[R]	0[R]	25[S]	23[S]	27[S]	26[S]	27[S]	26[S]
TE	29[S]	23[S]	25[S]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]
SXT	33[S]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	22[S]	21[S]	0[R]	0[R]	23[S]	22[S]

Antibiotiques testés	<i>E. coli</i> NalR	L28D	L28T	L30D	L30T	L32D	L32T	L34D	L34T	L204D	L204T
AM	24[S]	0[R]	0[R]	26[S]	24[S]	28[S]	22[S]	24[S]	23[S]	0[R]	0[R]
TIC	28[S]	0[R]	0[R]	28[S]	25[S]	30[S]	23[S]	25[S]	24[S]	0[R]	0[R]
AMC	31[S]	20[S]	21[I]	28[S]	24[S]	30[S]	24[S]	29[S]	24[S]	20[I]	20[I]
CF	28[S]	15[R]	0[R]	28[S]	23[S]	29[S]	24[S]	27 [S]	23[S]	16[I]	19[S]
FOX	40[S]	25[S]	30[S]	26[S]	29[S]	22[S]	36[S]	28[S]	29[S]	23[S]	22[S]
CTX	44[S]	33[S]	29[S]	32[S]	30[S]	28[S]	38[S]	37[S]	30[S]	34[S]	28[S]
IMP	30[S]	31[S]	34[S]	26[S]	32[S]	29[S]	42[S]	34[S]	32[S]	26 [S]	30[S]
NA	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]
NOR	29[S]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	8[R]	0[R]
CIP	30[S]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	9[R]	0[R]
GM	20[S]	11[R]	29[S]	23[S]	24[S]	23[S]	28[S]	36[S]	24[S]	11[R]	20[S]
C	30[S]	28[S]	25[S]	30[S]	27[S]	29[S]	27[S]	26[S]	26[S]	24[S]	23[S]
TE	29[S]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]	0[R]
SXT	33[S]	25[S]	24[S]	24[S]	18[S]	0[R]	0[R]	27[S]	23[S]	23[S]	25[S]

S=sensible ; R=résistant ; I=intermédiaire, chiffres correspondant aux diamètres d'inhibition

Sal9D, Sal19D, Sal75D, L20D, L27D, L28D, L30D, L32D, L34D, L204D= Codes des souches avant transconjugaison

Sal9T, Sal19T, Sal75T, L20T, L27T, L28T, L30T, L32T, L34T, L204T= Codes des transconjugants

E. coli NalR : profil phénotypique souche réceptrice

2. Discussion

Dans cette étude, nous avons cherché à développer et à pré-tester un système de surveillance intégré et efficace pour les pathogènes d'origine alimentaire à Dakar. Ce système a été testé pour les salmonelles ; il devrait pouvoir être reconduit pour les autres pathogènes zoonotiques.

Dans cette étude nous n'avons pas pu avoir le même nombre d'échantillon pour chaque secteur. Dans le secteur humain les prélèvements étaient faits en fonction des patients qui présentaient des signes de diarrhées.

Nous n'avons pas pu prélever le même nombre d'échantillons (alimentaire et animale) par mois. Ce qui fait que l'analyse au cours du temps présente des limites. La prévalence de *Salmonella* était de **5%** et est conforme aux résultats d'études antérieures faites au Sénégal telles que celles de (Sambe-Ba et *al.*, 2013) où la prévalence des salmonelles était de **4,7%**. Au Dispensaire St Martin, 7 sérovars de salmonelles étaient retrouvées et le sérovar Enteritidis était majoritaire. Au laboratoire de Biologie Médicale 16 sérovars ont été identifiés, avec une légère prédominance des sérovars Brancaster, Enteritidis, Kentucky, Schwarzengrund, Senftenberg. Le sérovar Enteritidis est un sérovar fréquemment impliqué dans les diarrhées aussi bien au Sénégal qu'ailleurs (Sambe-Ba et *al.*, 2013; Kariuki et *al.*, 2006, Maraki et *al.*, 2014). Les sérovars Brancaster, Kentucky, Senftenberg et Istanbul quant à eux sont les premières causent de toxi-infection alimentaire causée par des salmonelles (Dione et *al.*, 2011).

Les salmonelles étaient beaucoup plus fréquentes en période de chaleur et peut s'expliquer par le fait que cette période est propice au développement des salmonelles puisque leur température de croissance est de 40 à 42°C.

Dans ce travail la sensibilité des salmonelles vis-à-vis des antibiotiques a été étudiée. La majorité des souches étaient des souches sauvages. Mais, **35%** des souches testées étaient résistants à au moins un antibiotique et **6%** présentaient des résistances aux quinolones. Ce qui atteste une émergence des souches de salmonelles résistantes aux quinolones. De plus, toutes les autres classes d'antibiotiques (tétracycline, triméthoprim-sulfaméthoxazole) testées sont concernées par la résistance par les salmonelles, sauf pour les carbapénèmes (imipénème) et les aminosides (amikacine). Ce qui laisse encore aux cliniciens une alternative pour la prise en charge des infections à *Salmonella*. Cependant l'imipénème est un antibiotique qui doit être utilisé en dernier recours dans le traitement des diarrhées. La résistance des salmonelles aux antibiotiques de première intention recommandés par l'OMS (Sack et *al.*, 1997) s'étend progressivement dans de nombreux pays en voie de développement (Kariuki et *al.*, 2006,

Timbine LG et *al.*, 2013) et est confirmée par les travaux de Sire et *al.* (2013), Fall-Niang et *al.*, (2013) au Sénégal. Le sérovar *Salmonella* Poona a été isolée chez un enfant de 4 mois et présentait des résistances aux céphalosporines de 1, 2 et 3 générations, à la gentamicine, au chloramphénicol et au triméthoprime-sulfaméthoxazole. Pourtant, c'est un sérovar très rare chez l'homme mais avait été la cause d'une épidémie entre 2000 et 2001 au Canada et aux Etats Unis, suite à la consommation d'une variété de melon le *cantaloup* (*Cucumis melo var. cantalupensis*) provenant de Mexique (Brideau, 2008). Des conditions de stockage et les mauvaises pratiques agricoles étaient les principales causes. En plus du sérovar Poona, deux souches de *Salmonella* Enteritidis présentaient aussi une multirésistance. Par ailleurs, elles étaient les seules à être résistantes aux quinolones et fluoroquinolones. Le sérovar Enteritidis est très fréquent des prélèvements de selles (Kariuki et *al.*, 2006) mais aussi au niveau des aliments (Fofana, 2004) et des fientes de poulets (Makaya et *al.*, 2012). En Afrique, comme ailleurs dans le monde, *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* sont les causes les plus courantes de salmonellose humaine (Hendriksen et *al.*, 2011). Les quinolones sont des antibiotiques très fréquemment utilisés en élevage de volaille. Ce qui, de facto contribue à l'émergence de souches résistantes. Cette résistance de *Salmonella* Enteritidis aux quinolones a été confirmée par plusieurs études faites au Sénégal (Fall-Niang et *al.*, 2013, Sambe-Ba et *al.*, 2013), au Mali (Timbiné et *al.*, 2013) et dans le monde telle que les Etats Unis d'Amérique (Forsythe et *al.*, 2007 ; Crump et *al.*, 2011).

Dans cette étude les salmonelles ont été aussi recherchées au niveau des carcasses de poulets achetés au niveau des marchés de Dakar et sa banlieue. Dans l'ensemble, les sites de vente des poulets étaient satisfaisants, sauf au marché de Tilène où l'hygiène était très précaire. Ainsi, 40% des poulets acquis de ce marché étaient contaminés par des germes dont 78% de salmonelles. Trois types de poulets étaient achetés (poulet de chair, poulet de ponte réformée et poulet du pays) pour la recherche des salmonelles. Ces derniers ont pu être isolés sur ces trois catégories de poulets et sur tous les marchés sélectionnés. Ce qui attestait une large répartition des salmonelles au niveau de la capitale et sa banlieue. La prévalence des salmonelles au niveau des poulets était de 53%, montrant un haut niveau de contamination des poulets et les risques de TIAC si la chaîne de froid n'est pas respectée. Ce taux de contamination (53%) est très élevé par rapport à la prévalence des salmonelles au niveau des selles de patients (4%). D'où la nécessité de suivre les recommandations de l'OMS en 2015 sur la sécurité sanitaire des aliments «**de la ferme à l'assiette**» (OMS, 2015). Nous devons prendre conscience de ce qui se trouve dans notre assiette pour éviter les TIAC.

Au total, 20 sérovars ont pu être identifiés et les plus fréquents étaient Istanbul, Brancaster, Kentucky et Senftenberg. Ces mêmes sérovars ont été par ailleurs précédemment décrits au Sénégal sur les carcasses de poulets et des selles de patients (Dione et *al.*, 2011). Il est possible que ce soit les mêmes clones qui circulent entre les deux secteurs. Un nombre plus important de ces sérovars a été relevé pendant les périodes de fortes canicules (Juin-Juillet 2013), très propices au développement des salmonelles. Toutefois, un artefact a été noté en Décembre 2012, qui pourrait s'expliquer par le nombre plus important de prélèvements qui y était opéré.

L'antibiogramme a été réalisé sur les souches isolées des carcasses de poulets. Des **273** souches de salmonelles testées, les **25%** étaient de types sauvages et **21%** étaient des souches résistantes aux quinolones et fluoroquinolones. Ce qui montrait que les souches alimentaires étaient plus résistantes que les souches humaines et une émergence de souches résistantes aux quinolones et fluoroquinolones était notée dans ce secteur. Ce résultat a été obtenu ailleurs par Le Hello et *al.*, 2013 et Barua et *al.*, 2012 avec l'émergence de *Salmonella* Kentucky ST198 résistantes à la ciprofloxacine. Le sérovar Istanbul était le plus fréquemment isolé mais la majorité des souches était résistante à (SXT-TE), seules deux souches présentaient une résistance aux quinolones. Ce sérovar a été retrouvé dans d'autres études faites au Sénégal (Dione et *al.*, 2012). C'est un sérovar émergent et n'est pas encore en contact avec beaucoup d'antibiotiques. Après le sérovar Istanbul, le sérovar Brancaster était aussi retrouvé au niveau des carcasses de poulets. C'est un sérovar très fréquemment isolé au Sénégal au niveau des carcasses de poulets (Dione et *al.*, 2012 ; Dione et *al.*, 2009 ; Cardinale et *al.*, 2005). Le sérovar Brancaster présentait des résistances aux quinolones (22%). Plus de 90% des isolats de *Salmonella* Brancaster et de Kentucky étaient résistants à la tétracycline et au triméthoprim-sulfaméthoxazole alors que 30% des souches de *Salmonella* Kentucky étaient résistantes aux quinolones. La résistance à ces antibiotiques peut s'expliquer par leur utilisation comme facteurs de croissance en médecine vétérinaire. Différentes études ont démontré que la sélection des souches résistantes était consécutive à l'utilisation des différentes familles d'antibiotiques chez l'animal, notamment comme promoteurs de croissance (Sanders et *al.*, 2005). Au Sénégal et à travers le monde la résistance de *Salmonella* Kentucky aux quinolones a été observée par plusieurs études telles que celle de (Dione et *al.*, 2012 ; Le Hello et *al.*, 2013 et Barua et *al.*, 2012). Les isolats de *Salmonella* Senftenberg étaient résistants aux tétracyclines, aux céphalosporines de 3^{ème} génération et aux quinolones. Une souche de *Salmonella* Senftenberg isolée au marché de Fass en Aout 2012 présentait des résistances aux céphalosporines de 1 et 2^{ème} génération, à la tétracycline, aux

quinolones et fluoroquinolones et même à l'imipénème. Ce qui constitue un haut risque qui peut être lié à la consommation de poulet si la chaîne de froid n'est pas respectée, car l'imipénème est un antibiotique de dernier recours dans le traitement des entérites. L'étude de Boumart a montré une émergence de *Salmonella* Senftenberg dans le secteur avicole (Boumart et al., 2012). Ce qui constitue un risque pour la santé humaine car cette bactérie peut être présente chez les animaux lors de l'abattage et de la transformation des aliments. Les sérovars Hadar, Gera, Yeerongpilly n'étaient pas très fréquents. Les quelques rares souches isolées étaient multirésistantes, notamment aux céphalosporines de 1 et 2^e génération voir même de 3^e génération pour le sérovar Yeerongpilly ; aux quinolones et fluoroquinolones, à la tétracycline, à la gentamicine et à l'imipénème avec le sérovar Hadar. La présence de ces souches multirésistantes constitue un risque majeur de santé publique.

Les salmonelles ont été aussi recherchées au niveau des fientes de poulets. Le choix des localités (Sangalkam et de Keur Massar) se justifiait par le fait que la majorité des élevages de poulet de chair sont concentrés dans ces localités. Elles sont situées dans la zone périurbaine de Dakar au niveau des Niayes. Cette zone offre un climat particulièrement doux favorable à l'élevage des animaux de race exotique (Toure et al., 2005). Dans cette étude plus de la moitié des élevages présentaient des conditions acceptables d'élevage. Tous les élevages utilisaient des facteurs de croissance contenant des antibiotiques ; soit comme antistress, soit comme vitamines, ou à titre préventif. Au total 70% des élevages de poulets de chair étaient contaminés. Ce résultat représente un taux élevé de contamination et peut être lié aux mauvaises conditions d'élevage. Ce résultat est supérieur à celui trouvé par Cardinale et al., (2004) qui a trouvé que 28,6% des élevages est contaminé par les salmonelles.

La prévalence des salmonelles était de **18%** sur les **268** prélèvements de fèces de poulets. Une étude similaire a été faite au Burkina Faso, sur 350 échantillons de fèces de volailles, 54,85% étaient contaminés (Kagambega et al., 2013). Ce taux de contamination est très élevé ce qui nécessite de faire preuve de vigilance aussi bien au niveau de l'aviculture moderne et traditionnelle. Mais aussi de suivre les recommandations de l'OMS en 2015 «de la ferme à l'assiette» (OMS, 2015). Au total **17** sérovars ont été identifiés, dont Kentucky, Brancaster, Sandiego, Urbana qui étaient majoritaires. Ces sérovars sont très fréquemment isolés au niveau des élevages de poulets au Sénégal (Cardinale et al., 2005 ; Dione et al., 2009) et chez les selles humaines ; ils peuvent être à l'origine de toxi-infection alimentaire. L'étude de la variation des sérovars en fonction des mois a montré un pic au mois de juin 2013 (période de chaleur) qui est propice au développement des salmonelles. Ce même pic a été obtenu avec les salmonelles d'origine alimentaire et humaine. *Salmonella* Brancaster a été retrouvé à Keur

Massar et à Sangalkam et presque tout l'année. C'est un sérovar émergent. *Salmonella* Typhimurium était retrouvé au niveau des deux zones. Ce sérovar a toujours été la principale étiologie de toxi-infections alimentaires (Hendriksen et *al.*, 2011 ; Gordon et *al.*, 2008).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles d'origine animale a montré que 30 % des souches présentaient une résistance aux quinolones. Ce pourcentage de résistance aux quinolones est supérieur à celui retrouvé au niveau humain et en alimentaire. Ce qui montre que l'utilisation des facteurs de croissance associé aux antibiotiques a un impact majeur sur la multirésistance des salmonelles. D'où l'intérêt de rationaliser l'utilisation des antibiotiques en élevage. Les salmonelles étaient plus résistantes, à la tétracycline et au triméthoprim-sulfaméthoxazole. Une résistance aux céphalosporines de 1, 2, 3 générations a été notée avec des pourcentages de moins de 20%. Le sérovar Brancaster était résistant aux quinolones et fluoroquinolones. Quant aux isolats de *Salmonella* Kentucky, ils étaient multirésistants notamment aux céphalosporines de 1, 2, 3 génération, quinolones et fluoroquinolones, à la tétracycline et au triméthoprim-sulfaméthoxazole et au chloramphénicol. Cette multirésistance des salmonelles est très inquiétante, car ce sont des molécules d'antibiotiques utilisées en derniers recours lors du traitement des salmonelloses humaines sévères (Weill, 2008).

Les salmonelles étaient plus prévalentes au niveau alimentaire (53%) et animal (18%) de même que la résistance aux quinolones. Ce haut niveau de prévalence des salmonelles en alimentaire est dû à un manque de respect des règles d'hygiène lors de l'abattage, la transformation et de vente des poulets. Actuellement au Sénégal l'aviculture constitue une source d'économie très importante. D'où la nécessité de valoriser ce secteur pour mieux commercialiser les produits. Il est aussi important de disposer d'abattoirs modernes, des plumeuses mécaniques et que les acteurs de la commercialisation respectent les chaînes de froid pour éviter la prolifération des salmonelles.

Les sérovars *S. Kentucky*, *S. Senftenberg*, *S. Brancaster*, *S. Sandiego*, *S. Istanbul* étaient les plus fréquemment isolées au niveau des trois secteurs. Au Sénégal *Salmonella* Brancaster a été isolée aussi bien dans les selles que chez le poulet (Dione et *al.*, 2009) de même que le sérotype Kentucky (Dione et *al.*, 2012).

Actuellement un peu partout dans le monde des salmonelles multirésistantes aux antibiotiques sont isolées chez les humains et en alimentaire par exemple en France *Salmonella* Kentucky ST198 qui présentait une résistance à la ciprofloxacine (Le Hello et *al.*, 2013 ; Barua et *al.*, 2012). En Ethiopie, Nigéria et au Maroc *Salmonella* Kentucky ST198 a été isolée chez les

poulets et les dindes domestiques et des épices importées en France ou aux USA à partir du Maroc.

Les professionnels vétérinaires doivent faire preuve de vigilance dans la prescription des antibiotiques. La prévention et la communication doivent être prioritairement axées dans les secteurs en amont des stades de distribution pour assurer la santé des populations.

Pour confirmer cette situation une comparaison génotypique et une étude de la diversité génétique des salmonelles isolées au niveau des trois secteurs étaient faites.

3. Conclusion

La prévalence des salmonelles était de **5%** au niveau selles de patients, **53%** pour les carcasses de poulets et de **18%** avec les fientes de poulets. Ce qui atteste un haut niveau de contamination des salmonelles sur le secteur alimentaire et vétérinaire et un grand risque lié à la consommation de poulets. Les sérovars les plus fréquents au niveau vétérinaire étaient *S. Kentucky*, *Brancaster*, *Sandiego*, *Urbana*. Au niveau des carcasses de poulets *Istanbul*, *Brancaster*, *Kentucky*, *Senftenberg*, *Give*, *Llandoff*, *Sandiego* étaient les sérovars les plus prévalent. Au niveau humain *Senftenberg*, *Brancaster*, *Kentucky*, *Sandiego* étaient aussi retrouvés bien qu'on notait sur ce secteur une prédominance de *Salmonella Enteritidis*. La prévalence des souches résistantes était de **35%** au niveau humain, **75%** au niveau alimentaire et de **56%** au niveau vétérinaire attestant un haut niveau de résistance des salmonelles vis-à-vis des antibiotiques avec les secteurs alimentaire et vétérinaire. La prévalence de la résistance aux quinolones était de **6%** avec les souches d'origine humaine, **21%** avec les carcasses de poulets et de **30%** au niveau des fèces de poulets montrant une résistance très élevée des salmonelles vis-à-vis des quinolones et fluoroquinolones au niveau alimentaire et animal.

Les résultats des CMI étaient **>32µg/ml** et **>256µg/ml** sur toutes les souches respectivement pour la ciprofloxacine et l'acide nalidixique. Ce résultat prouvait un haut niveau de résistance des salmonelles vis-à-vis des quinolones.

La conjugaison bactérienne faite sur les souches porteuses des intégrons de classes 1 montrait que les gènes de résistance sont portés par des plasmides.

Etude 2 :

Caractérisation moléculaire de souches de salmonelles isolées des aliments, animaux et humains

I. Matériel biologique

Au total 80 souches de salmonelles isolées des trois secteurs (alimentaire, animal et humain) ont été sélectionnées en fonction de leurs sérotypes (les plus fréquents) et de leur profil de résistance (résistance aux quinolones) (annexe 10). Parmi ces 80 souches 14 étaient des souches d'origine humaine, 32 souches d'origine animale et 34 souches d'origine alimentaire.

II. Méthodologie

1. Introduction

Dans cette partie du travail, il s'est agi d'étudier les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques et de la virulence de souches de salmonelles sélectionnées, isolées des trois secteurs.

2. Méthodes

2.1 Extraction d'ADN

L'ADN total a été extrait par la méthode chimique QIAamp DNA minikit (QIAGEN, SA, Courtaboeuf) ou par thermolyse (**annexe 3**).

2.2 Détection des déterminants génétiques de la résistance

La détection des éléments génétiques de la résistance a été réalisée par PCR. La composition du mélange réactionnel ainsi que le protocole utilisé sont mis en **annexe 4**.

La liste des primers et les températures d'hybridation sont précisées ci-dessous en fonction du gène recherché.

2.2.1 Détection des gènes de résistance aux quinolones

Les gènes qui caractérisent la résistance chromosomique QRDR et plasmidique PMQR des quinolones ont été recherchée par PCR (**tableau XIII**). Les amplicons des gènes *gyr* et *par* ont été envoyées à Beckman Coulter Genomics (Hope End, Takeley Essex CM226TA, United Kingdom) pour le séquençage. Le logiciel ChromasPro a été utilisé pour la lecture des séquences. La recherche d'homologies des séquences était réalisée grâce au programme de recherche BLASTN et BLASTX au National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences ont été alignées avec le logiciel CLUSTALW pour voir les mutations.

Tableau XIII : Liste des amorces pour la recherche des gènes de résistance aux quinolones

Primers	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
<i>gyrA</i>	F: TACACCGGTCAACATTGAGG R: TTAATGATTGCCGCCGTCGG	62°C	647 pb
<i>gyrB</i>	F: TGAAATGACCCGCCGTAAAGG R: GCTGTGATAACGCAGTTTGTCCGGG	59°C	309 pb
<i>parC</i>	F: GTCTGAACTGGGCCTGAATGC R: AGCAGCTCGGAATATTTTCGACAA	59°C	248 pb
<i>parE</i>	F: ATGCGTGCGGCTAAAAAAGTG R: TCGTCGCTGTCAGGATCGATAC	59°C	289 pb
<i>qnrA</i>	F: TCAGCAAGAGGATTTCTA R: GGCAGCACTATTACTCCC	55°C	657 pb
<i>qnrB</i>	F: GATCGTGAAAGCCAGAAAGG R: ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	55°C	469 pb
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCAACCTGTAGGC	55°C	417 pb
<i>qnrC</i>	F: GGGTTGTACATTTATTGAATCG R: CACCTACCCATTTATTTTCA	55°C	307 pb
<i>qnrD</i>	F: TGTGATTTTTCAGGGGTTGA R: CCTGCTCTCCATCCAACCTC	55°C	520 pb
<i>aac(6')-Ib</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	55°C	482 pb
<i>qepA</i>	F: AACTGCTTGAGCCCGTAGAT R: GTCTACGCCATGGACCTCAC	55°C	596 pb

2.2.2 Détection des intégrons et des cassettes

Tous les isolats sélectionnés ont été examinés pour la présence du gène de l'intégrase associé à une classe d'intégron. Ils ont été testés pour la présence des intégrases de classe 1 (*intI1*), 2 (*intI2*) et 3 (*intI3*) en utilisant spécifiquement les paires d'amorces *intI1F/intI1R*, *intI2F/intI2R* et *intI3F/intI3R* (Tableau XIV).

Tableau XIV : Liste des amorces pour la recherche des intégrons dans les isolats de *Salmonella*

Amorces	Séquence nucléotidique (5' → 3')	Température d'hybridation	Taille attendue
<i>intI1</i>	F: ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA R: ACATGTGATGGCGACGCACGA	58°C	580 pb
<i>intI2</i>	F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GATGCAAACGACTGACGAAATG	62°C	806 pb
<i>intI3</i>	F: GCCCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGCTCTGCCAAACCTGACT	62°C	1200 pb

F : forward (sens); R : reverse (anti-sens)

La détection de la région 3' des intégrons de classe 1 a été réalisée avec les couples d'amorces *ofr4/sul1* et *orf6/sul3*. Ensuite, les amorces 36854/36855, 36854/*sul1* et 36854/36856 ont été utilisées pour détecter la région variable des intégrons de la classe 1. D'autres amorces ont été utilisées pour caractériser la région 3' (*Int7S/sat1*) et les cassettes (*Hep51/df1* ; *Hep74/Sat2* ; *aadA1-F/aadA1-R*) de la région variable des intégrons de classe 2 (**tableau XV**). Les produits de PCR de la région variable des intégrons de classe 1 étaient séquencés afin de déterminer l'agencement des cassettes au sein de l'intégron (**tableau XV**). L'agencement des cassettes au sein de l'intégron était déterminé grâce au programme de recherche BLASTN et BLASTX au National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tableau XV: Liste des amorces pour la caractérisation des intégrons de classes 1 et 2

Amorces	Séquence nucléotidique (5'→3')	Température d'hybridation
ORF4	CAAACATATCAGGTCAAGTCTGCTT	58°C
Sul1	GTCCGACATCCACGACGTCTGATC	
ORF6	GTCGCTGCAACTCGCGACT	
Sul3	CCTGGAGATCTGCGAAGCGCAATC	
36854	GGCATGCAAGCAGCAAGCGCGTTA	
36855	AACCGAACTTGACCTGATAGTTTG	
36856	GAGCAATTATGTGCTTAGTGCA	
INT7S	TGCCCTGCGTAAGCGGGTGTGGGCGGACA	62°C
Sat1	AGTCGCGCACAGTCTCATCGA	
Hep74	CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA	
Hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	
df1	TGAATCAATGGGAGCATTAC	
Sat2	TCGATGAGACTGTGCGCGACT	
AadA1-F	TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT	
AadA1-R	GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT	

2.3 Détection des déterminants génétiques de la virulence des salmonelles

2.3.1 Introduction

Dans cette étude les différents facteurs de virulence étaient recherchés chez les salmonelles issues des trois secteurs. Une comparaison des souches au niveau des trois secteurs était faite pour déterminer les souches les plus virulentes.

2.3.2 Détection des gènes de virulence

Les gènes de virulence des salmonelles sélectionnées étaient recherchés par PCR en point final (tableau XVI).

Protocole

La composition du mélange réactionnel ou Mix est la même qu'avec les gènes de résistance voir chapitre I.

L'amplification génique est faite dans un thermocycleur (2720 thermal Cyber Applied Biosystems), avec les paramètres suivants : 5 mn de pré dénaturation à 94°C suivie de 30 cycles de [1 mn à 94°C ; 1 mn (température d'hybridation varie en fonction des gènes (tableau XIX) ; 1 mn à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 10 mn.

Les conditions de migrations et de lecture sont les mêmes que pour les gènes de résistances.

Tableau XVI: Liste des amorces utilisées pour la recherche des gènes de virulence

Amorces	Séquence nucléotidique (5'→3')	Taille attendue	Îlot de pathogénicité	T _m
<i>invA</i>	1-TGCCTACAAGCATGAAATGG 2-AAACTGGACCACGGTGACAA	450pb	Gène Invasif	58°C
<i>sopB</i>	F-CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG R-TAGTGATGCCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220 pb	SPI-1	55°C
<i>spiC</i>	1-CCTGGATAATGACTATTGAT 2-AGTTTATGGTGATTGCGTAT	301 pb	SPI-2	54°C
<i>misL</i>	1-GTCGGCGAATGCCGCGAATA 2-GCGCTGTAAACGCTAATAGT	561 pb	SPI-3	60°C
<i>orfL</i>	1-GGAGTATCGATAAAGATGTT 2-GCGCGTAACGTCAGAATCAA	332 pb	SPI-4	60°C
<i>pipD</i>	1-CGGCGATTCATGACTTTGAT 2-CGTTATCATTCGGATCGTAA	399 pb	SPI-5	56°C
<i>SpvR</i>	1-CCCCGGGAATTCGCTGCATAAGGTCAGAAGG 2-CCCCGGGATCCATGGATTTCTTGATTAATAAA	890 pb	Facteur de pathogénicité	47°C

T_m : température d'hybridation

III. Résultats, discussion et conclusion

A. Résultats

1. Caractérisation des intégrons

- Intégrons de classe 1

Tous les isolats de la collection ont été examinés par PCR pour la présence des intégrases associées aux intégrons de classe 1, 2 et 3. Les PCR ont identifié 26 isolats portant des intégrons de classe 1 (33%, 26/80), parmi ces 26 isolats, 6 étaient des souches d'origine humaine, 8 d'origine animale et 13 d'origine alimentaire. 18 souches sur ces 26 isolats étaient positives à la détection de la région 3' (*orf4/sulI*, *sulI* (F/R)) (figure 28) dont 2 souches humaines, 8 alimentaires et 8 animales ; 11 souches avaient la région variable (36854/36855) dont 3 souches animales et 8 souches alimentaires (figure 25). Le séquençage a permis de déterminer l'agencement des cassettes présentes au sein de la région variable (tableau XVII).

Tableau XVII : Profil de résistance des souches et cassettes au niveau des intégrons de classe 1

Origine	Sérovars	Profils	Cassettes int1
Animal			
Sal9	Brancaster	TE	<i>dfrA15</i>
Sal19	Kentucky	SXT-TE-C	<i>dfrA15</i>
Sal75	Kentucky	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP	<i>aacCA5</i> , <i>aadA7</i>
Alimentaire			
L20	Kentucky	NOR-CIP-NA-SXT-TE	<i>dfrA15</i>
L27	Senftenberg	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE	<i>aacCA5</i> , <i>aadA7</i>
L28	Kentucky	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE	<i>aacCA5</i> , <i>aadA7</i>
L30	Benfica	NOR-CIP-NA-TE	<i>dfrA7</i>
L32	Abony	NOR-CIP-NA-SXT-TE	<i>dfrA7</i>
L34	Brancaster	NOR-CIP-NA-TE	<i>dfrA7</i>
L39	Kentucky	NOR-CIP-NA-TE	<i>dfrA7</i>
L204	Kentucky	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE	<i>aacCA5</i> , <i>aadA7</i>

aacCA5 : code la résistance à la gentamicine

aadA7 : code la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine

dfrA15 : code la résistance au triméthoprim

dfrA7 : code la résistance au triméthoprim

- Intégrons de classe 2 :

L'intégron de classe 2 a été retrouvé dans deux isolats d'origine animale (3%), sérovar. Kentucky et Kaapstad. Nous avons retrouvé l'organisation classique des intégrons de classe 2 (*dfrA1-sat-aadA1*).

- Intégrons de classe 3 :

Aucun intégrons de classe 3 n'a été détecté dans les 80 isolats.

2. Détection des gènes de résistances aux quinolones

Les gènes de résistance aux quinolones ont été détectés par PCR. Les isolats ont été positifs à la détection des gènes de :

- Résistance chromosomique QRDR *gyrA* (78%), *gyrB* (58%), *parE* (95%), *parC* (4%),
- Résistance plasmidique PMQR, *qnrB* (57%), *qnrS* (4%), *qnrC* (1%), *qnrD* (1%), *aac(6')-Ib* (1%).

Le gène *gyrA* a été détecté sur 12 souches humaines, 20 souches animales et 30 souches alimentaires. Quant au gène *gyrB*, il a été retrouvé chez 13 souches animales et 33 souches alimentaires. Les PCR pour la détection du gène *parE* ont été négatifs que pour 3 souches humaines. Par contre, le gène *parC* n'a été retrouvé que chez trois souches de *Salmonella* sérovars Istanbul, ces souches étaient d'origine alimentaire (**figure 23**). Le gène *qnrB* a été retrouvé chez une souche humaine (*Salmonella* Poona) qui présentait une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération mais pas aux quinolones, 17 souches vétérinaires et 27 souches alimentaires. Le gène *qnrS* a été détecté sur deux souches d'origine alimentaire, ces souches étaient des sérovars pas très fréquents (Gera, Farsta). *qnrC* a été détecté chez une souche de *Salmonella* Enteritidis d'origine humaine qui présentait une résistance aux quinolones et fluoroquinolones. Quant à l'*aac(6')-Ib* il a été détecté chez une souche de *Salmonella* Ruzizi d'origine alimentaire résistante aux quinolones et fluoroquinolones (**figure 24**). Le *qnrD* a été retrouvé chez une souche alimentaire (**figure 25**).

Aucun isolat n'était positif pour le *qnrA* et le *qepA*.

Les *gyr* et *par* ont été séquencés pour rechercher les mutations. Les mutations ont été retrouvées au niveau du gène *gyrB* (**figure 26, tableau XVIII**) et du gène *parE* (**figure 23**). Les mutations les plus fréquentes sur le gène *gyrB* étaient la substitution du (Leu-Phe n=11), (Pro-Ser n=4), (Ala-Thr n=2), (Agr-Gly n=2), (Asn-Asp n=2). Les résistances vis à vis des quinolones et fluoroquinolones ont été observées sur les souches d'origine animale et alimentaire avec des CMI de >32µg/ml et de >256µg/ml, respectivement pour la ciprofloxaïne

et l'acide nalidixique confirmant le haut niveau de résistance de ces souches aux quinolones. Les sérovars Brancaster et Gera d'origine alimentaire présentaient des mutations à la fois au niveau du gène *gyrB* et du gène *parE*. Les deux sérovars avaient plus de quinze points de mutations. Ces sérovars étaient intermédiaires à NA et résistants à la CIP avec des CMI de CIP > 32 µg/ml et de NA > 256 µg/ml ce qui prouvait un haut niveau de résistance de ces salmonelles aux quinolones et aux fluoroquinolones. Ces souches méritent d'être étudiées ultérieurement pour mieux comprendre la cause de ces mutations et les conséquences du point de vue épidémiologique (**tableau XIX**).

Tableau XVIII : Mutations du gène *gyrB*

Origine	Numéro	Sérovars	Mutations du gène <i>gyrB</i>	CMI		Phénotypes	
				NAL	CIP	NAL	CIP
Animal	Sal39	Sandiego	Pro-25-149-235-Ser	>256	>32	R	R
			Lys-91-Glu, Ser-220-Arg, Ala-265-Thr,	=192	=0,19	R	R
	Sal44	Urbana	Gln-34-Stop				
	Sal45	Kentucky	Leu-256-Phe	>256	>32	R	R
	Sal 54	Kentucky	Leu-250-Phe, Ala-244-Thr, Ser-191-Ala	>256	>32	R	R
	Sal82	Urbana	Leu-250-Phe	>256	=0,125	R	R
	Sal20	Brancaster	Agr-33-Gly	>32	>32	R	R
			Pro-25-Ser, Ile-23-Val, Val-210-Ile,			R	R
Alimentaire	Sal40	Chester	Ala-207-Thr	>256	>32		
	L2	Ruzizi	Leu-264-Phe,	>256	>32	R	R
	L8	Hadar	Leu-250-Phe	>256	>32	R	R
	L28	Kentucky	Tyr-261-Ile	>256	>32	R	R
	L30	Benfica	Leu-260-Phe	>256	>32	R	R
	L51	Brancaster	Arg-31-Ser, Asn-25-Asp, Lys-85-Glu	>256	>32	R	R
	L55	Brancaster	Leu-264-Phe	>256	>32	R	R
	L58	Brancaster	Leu-264-Phe	>256	>32	I	R
			Leu-258-Phe, Arg-16-Gly, Asn-172-196-Asp Stop-	>256	>32	R	R
	L70	Kentucky	46-31-Arg				
			Leu-162-Phe, Asn-171-196-Asp, Tyr-260-Ile Stop-	>256	>32	I	R
	L141	Gera	45-30-Leu, Stop-105-Gln				
	L204	Kentucky	Leu-263-Phe, Thr-257-Ala	>256	>32	R	R
	L271	Istanbul	Leu-258-Phe, Ser-463-Tyr	>256	>32	R	R

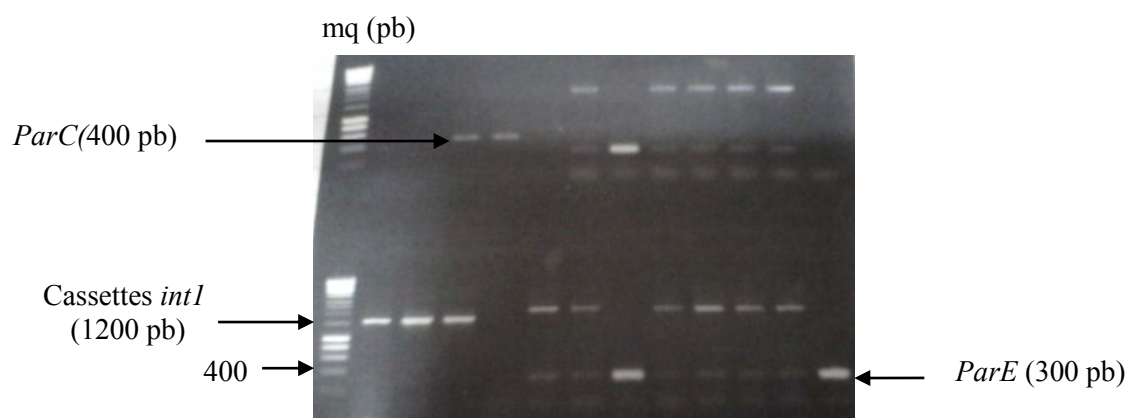
Tableau XIX : Mutations du gène *parE*

Origine	Numéro	Sérovars	Mutations du gène <i>parE</i>	CMI		Phénotypes	
				NAL	CIP	NAL	CIP
Alimentaire	L141	Gera	Ala -28- Thr, Gly-104-206-224-Arg, Stop-86-245-Gly ; Agr-215-Stop, Pro-131-Ser, Leu-89-Phe, Ser-212- Ala, Cys-92-Gly, Ser-209- Gly, Stop-125-Arg, Tyr-167-His, Val-128-Ile, Ile-101-Phe, Asn-51-Ile, Leu-18	>256	>32	I	R
	L58	Brancaster	Ala -35-56-98-Thr, Arg-92-212-194-Gly, Gly-74-233-Stop, Tyr-28-Leu, Thr-17-Ala, Leu-6, Stop-45-151-Gln, Stop-203-Arg, Gly-68-Arg, Gly-80-Cys, Ile-40-Asn, Phe-89-Ile, Phe-77-Leu, Asp-51-His, Ser-119-Pro, Ile-116-Val, His-154-Tyr, Arg-113- Stop, Ala-200-Ser, Gly-197-Ser	>256	>32	I	R

CIP : ciprofloxacine, **NAL** : acide nalidixique, **R** : Résistant, **I** : intermédiaire

CMI : concentration minimale d'inhibition

Lys : Lysine ; **Pro** : Proline ; **Ser** : Serine ; **Glu** : Acide glutamique ; **Arg** : Arginine ; **Ala** : Alanine ; **Thr** : Threonine ; **Gln** : Glutamine ; **Leu** : Leucine ; **Phe** : Phenylalanine ; **Gly** : Glycine ; **Pro** : Proline ; **Ile** : Isoleucine ; **Val** : Valine ; **Asn** : Asparagine ; **Tyr** : Tyrosine ; **Asp** : acide aspartique ; **His** : histidine ; **Cys** : Cytosine

**Figure 23** : Bande des gènes *ParC*, *ParE*, *intI1*

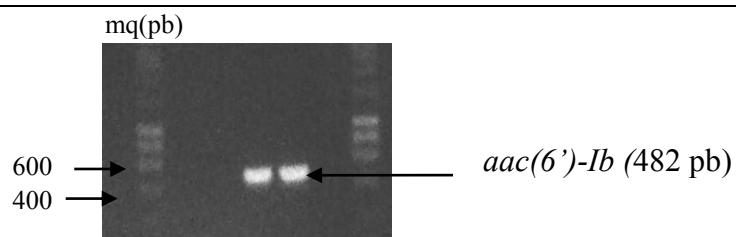


Figure 24 : Bande du gène *aac(6')-Ib*

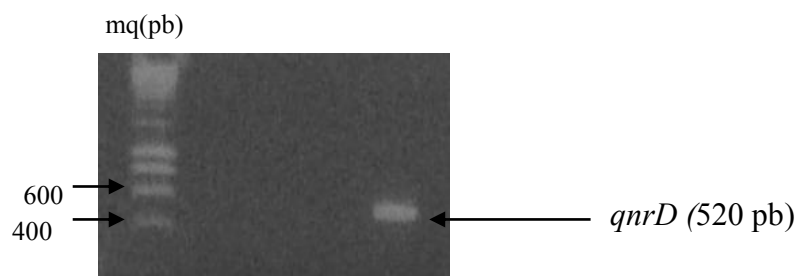


Figure 25: Bande du gène *qnrD*

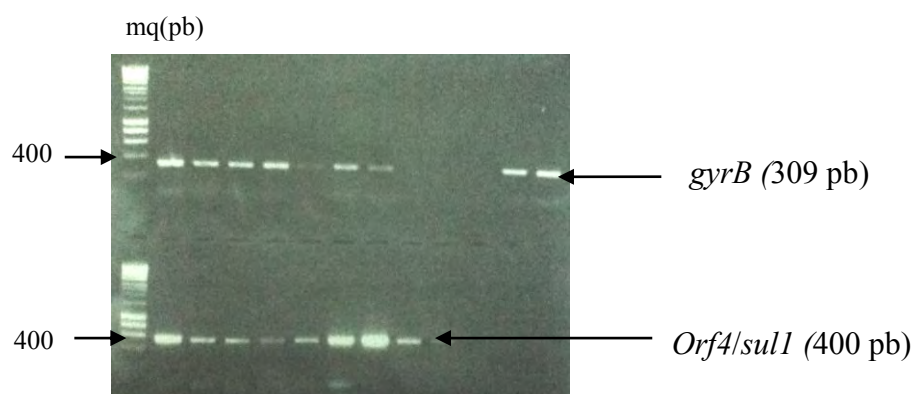


Figure 26 : Bande des gènes *gyrB* et *orf4/sul1*

Mq=marqueur de taille ; pb= paire de base

3. Détection des gènes de virulence

Les facteurs de virulence ont été recherchés par PCR sur les 80 souches sélectionnées. Les gènes de virulence *invA*, *pipD*, *orfL*, *misL*, *sopB* ont été détectés sur toutes les souches à l'exception de trois souches alimentaires et de deux souches animales qui n'avaient pas les gènes *misL*, *sopB*. Le gène *spiC* a été retrouvé sur toutes les souches animales et quatre souches alimentaires. Le gène *spvR* a été retrouvé sur trois souches de *Salmonella* Enteritidis d'origine humaine et une souche de *Salmonella* Nitra d'origine vétérinaire (figure 27).

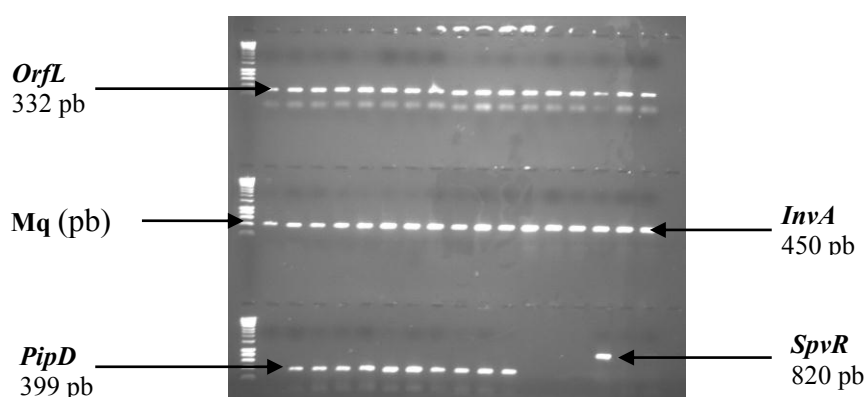


Figure 27: Résultats des PCR positives pour les facteurs de virulence *OrfL*, *invA*, *pipD*, *spvR*

Mq=marqueur de taille des fragments d'ADN (200pb) ; pb= paire de base

4. Comparaison des gènes de résistance et de virulence des salmonelles au niveau des trois secteurs

Les salmonelles d'origine humaine avaient les intégrons de classe 1, les gènes *gyrA* et *parE*. Seule une souche de *Salmonella* Enteritidis présentant une résistance aux quinolones avait le gène *qnrC*. Les facteurs de virulence *invA*, *spvR*, *orfL*, *pipD*, *misL*, *sopB* étaient retrouvés surtout chez les souches sauvages. Ce qui montrait que les salmonelles d'origine humaine étaient très virulentes mais peu résistantes. Par contre, les salmonelles d'origine animale possédaient les intégrons de classe 1 et 2 ainsi que les gènes de résistance aux quinolones, de même que les facteurs de virulence *invA*, *spiC*, *orfL*, *pipD*, *sopB*, *misL*. Ce qui attestait que les salmonelles d'origine animale étaient aussi bien résistantes que virulentes. Ceci suggère un risque réel pour la santé publique en cas de transmission de ces souches à l'homme.

Concernant les salmonelles d'origine alimentaire nous avons retrouvé des *intégrons* de classe I, les gènes *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. On a noté une absence de certains gènes de virulence *spiC* ; prouvant que ces salmonelles étaient plus résistantes mais moins virulentes que les salmonelles d'origine animales (**tableau XX**).

L'analyse de la variance avec le logiciel R a montré une différence significative entre le nombre moyen de gène de résistance présent selon l'origine ($P = 1.67e-12$).

La comparaison entre l'origine humaine et animale n'est pas significative.

Avec les gènes de virulence l'analyse de la variance a montré une différence significative entre le nombre moyen de gène de virulence présent selon l'origine ($P = 5.52e-13$).

Seule la comparaison entre l'origine humaine et animale n'est pas significative.

Tableau XX: Répartition des déterminants génétiques de la résistance et de la virulence des salmonelles au niveau humaine, animale et alimentaire

Origine	Phénotypes de résistance	Déterminants génétique de la résistance	Déterminants génétique de la virulence	Sérovars
Humaine/ selles de patients	SXT n=2	<i>int1</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Senftenberg, Corvallis
	CF-TE n=1	<i>int1</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Chester
	GM-SXT-TE= 1	<i>int1</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Kentucky
	GM-NOR-CIP-NA=1	<i>parE, qnrC</i> ,	<i>invA, spvR,orfL,pipD, sopB, misL</i>	Enteritidis
	NOR-CIP-NA-SXT-TE n=1	<i>gyrA, parE</i>	<i>invA, spvR,orfL,pipD, sopB, misL</i>	Enteritidis
Animale/ Fientes de poulets	SXT-TE n=4	<i>C</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Brancaster, Somone, Baildon
	AMX-CTX-GM-TIC-AMC-CF-CAZ-SXT-C n=1	<i>int1, qnrB</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Poona,
	TE n=7	<i>Int1, qnrB</i> ,	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Brancaster,Kentucky
	SXT n=2	<i>qnrB</i> ,	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Brancaster, Chester
	SXT-TE n=2	<i>Int1, qnrB</i> ,	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Brancaster
	SXT-TE-C n=1	<i>Int1</i> ,	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Kentucky
	AM-TIC-TE-SXT=1	<i>Int1, qnrB</i> ,	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Kaapstad
	NA-TE-NOR-CIP-SXT n=8	<i>int2, qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Sandiego,Urbana, Brancaster, Chester
	NOR-CIP-NA n=2	<i>qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Urbana, Offa
	AM-FOX-NA-NOR-CIP-C n=1	<i>gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB</i>	Offa
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CIP n=1	<i>qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Kentucky
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP-SXT n=1	<i>int1, int2, qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Kentucky
	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP n=1	<i>Int1, qnrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Kentucky
Alimentaire / Carcasses de poulets	TE n=1	<i>qnrB, gyrB</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Hadar
	SXT-TE n=1	<i>qnrB</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Kentucky
	NOR-CIP-Na n=1	<i>qnrB, gyrB</i> ,	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Kentucky
		<i>qnrB, gyrB, ParC, ParE</i>		Istanbul, Ruzizi, Yeerongpilly,Kentucky,
	NOR-CIP-NA-SXT-TE n=15	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB,misL</i>	Abony, Benfica, Sandiego, Hadar,
	NOR-CIP-NA-TE n=1	<i>qnrB, qnrS, gyrB, parE</i>	<i>invA, orfL, spic, pipD,sopB, misL</i>	Farsta
	NOR-CIP-NA-TE n=5	<i>int1, qnrB, gyrB, qnrD, ParE</i>	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Kentucky, Brancaster
	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE n=4	<i>int1, qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Senftenberg, Kentucky, Brancaster
	AMX-NOR-AMC-CIP-NA-FOX-TE n=1	<i>int1, qnrB,qnrS, gyrB, ParE</i>	<i>invA, orfL, pipD</i>	Gera
	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE n=1	<i>int1, qnrB,, gyrB, ParE</i>	<i>invA, spiC, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Kentucky
	AMX-NOR-CIP-CF-SXT-FOX-TE n=1	<i>int1,qnrB,gyrA, gyrB, ParE</i>	<i>invA, orfL, pipD</i>	Ouakam
	NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-SXT-TE-C n=1	<i>qnrB, gyrB, ParE</i>	<i>invA, orfL, pipD, sopB, misL</i>	Senftenberg

B. Discussion

Les intégrons de classe 1, 2, 3 ont été recherchés sur tous les isolats sélectionnés pour la caractérisation moléculaire. L'intégron de classe 1 était détecté en majorité (33%) suivi des intégrons de classe 2 (%) et les intégrons de classe 3 ne sont pas représentés. Ces résultats viennent alors confirmer ceux d'études antérieures qui stipulent que les intégrons de classe 1 sont majoritairement représentés chez les entérobactéries suivi des intégrons de classe 2 (Barlow, 2004). L'intégron de classe 1 et les cassettes *dfr* et *aad* ont été caractérisés au Japon chez des souches de *Salmonella* non typhiques (Ashraf et al., 2004).

Le séquençage de la région variable des intégrons de classe 1 a permis de détecter trois types de cassettes *dfr* (*dfrA7*, *dfrA15*), *aacCA5*, *aadA7* ; ces gènes codent respectivement pour la résistance à la triméthoprine, à la gentamicine, streptomycine et spectinomycine. Les salmonelles d'origine humaine n'avaient que le gène de l'intégrase qui n'avait pas de cassettes.

La résistance aux sulfaméthoxazole-triméthoprine est associée aux intégrons de classe 1 en raison de la présence fréquente d'une cassette *dfr* et du gène *sulI* de la région 3' retrouvé au niveau de l'étude. Ce lien a été souligné par une étude sur les entérobactéries (Dahmen et al., 2010).

Les intégrons de classe 2 sont associés au transposon Tn7 et ses dérivés (Ahmed et al., 2012 ; Gassama-Sow et al., 2006). Dans notre étude, des intégrons de classe 2 (gènes *dfrA1-sat-aadA1*) ont été identifiés dans deux isolats d'origine animale et l'un d'eux contenait également un intégron de classe 1. Il a été décrit que la coexistence de ces deux classes d'intégrons laisse supposer qu'ils ont intégré un même gène et confère à ces souches un niveau de résistance élevé (Gassama-Sow et al., 2010). Des intégrons de classe 2 ont également été identifiés chez des salmonelles isolées de volailles au Japon (Ahmed et al., 2009), des *Salmonella* isolées d'animaux aux Pays-Bas (van Essen-Zandbergen et al., 2007) et dans une souche de *Salmonella* isolée d'un poulet malade en Egypte (Ahmed et al., 2012). Par ailleurs en Brasil, un intégron de classe 2 a été identifié dans un isolat de *Salmonella* qui contenait également un intégron de classe 1 (Peirano et al., 2006).

En effet, au-delà de l'antibiorésistance, les intégrons seraient des structures permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement par l'acquisition de gènes indispensables à leur survie (Ploy et al., 2005 ; Cambray et al., 2010).

En plus des intégrons les supports génétique de la résistance des salmonelles aux quinolones ont été recherchés. La résistance aux quinolones était due à une mutation des gènes au niveau

chromosomique (QRDR) mais actuellement on note une émergence des gènes *qnr* responsable de la résistance plasmidique aux quinolones (PMQR). Dans cette étude les souches présentaient des résistances à l'acide nalidixique (CMI >256 µg/ml ; n=20) et à la ciprofloxacine (CMI >32 µg/ml ; n=18). Cette résistance des salmonelles aux quinolones a été observée au niveau national (Sambe-Ba et al., 2013 ; Fall-Niang et al., 2013) et international (Angulo et al., 2000). Les isolats ont été positifs à la détection des gènes de la résistance plasmidique. Le *qnrB* (57%) était détecté en majorité quand au *qnrS* (4%), *qnrC* (1%), *qnrD* (1%) et l'aac (6')-Ib (1%) ils n'étaient pas très fréquemment détectés. Les *qnrA* et le *qepA* n'ont pas été détectés chez les isolats. Ce pourcentage élevé de souches portant le gène *qnrB* pose un problème majeur de santé publique car c'est un gène transférable. Le gène *qnrB* était le plus fréquemment détecté. Contrairement à une étude faite en Iran où *qnrA* (25,8%) était majoritaire suivi de *qnrB* (1,7%) et de *qnrS* (1,7%) (Saboochi et al., 2012).

Au Danemark il a été rapporté que la résistance de salmonelles telle que *Salmonella* Enteritidis aux quinolones a augmenté près de dix fois en cinq ans. Ces résultats indiquaient que l'utilisation des quinolones en médecine vétérinaire était la cause (Molbak et al., 2002).

En Turquie une étude était faite sur le niveau de la résistance plasmidique des quinolones des souches de salmonelles isolées des carcasses de poulets. Tous les isolats étaient négatifs à la détection des gènes *qnrA*, *qnrB* et *aac(6')-Ib-cr*, seulement deux souches étaient positives au *qnrS* (Zafer et al., 2014). *qnrD* et *qnrC* ne sont pas très fréquents. *qnrD* a été mis en évidence récemment en Chine à Henan en 2008 chez une souche de *Salmonella* Kentucky d'origine humaine (Cavaco et al., 2009).

Le mécanisme de résistance chromosomique aux quinolones (QRDR) a été mis en évidence par le séquençage des *gyr* et *par* pour détecter les mutations. Les mutations ont été observées au niveau du gène *gyrB* et du gène *parE* et avec pour conséquence une résistance aux quinolones et fluoroquinolones. Ces résultats sont différents de ceux observés par Liebana et al., (2002) qui avaient rapporté des mutations au niveau du *gyrA* et du *parC*. Cette différence pourrait être d'ordre géographique. La variation peut être due aux quinolones et les fluoroquinolones utilisés en médecine humaine et vétérinaire et aussi au mécanisme d'adaptation due à la pression de sélection de certains fluoroquinolones. Les mutations du gène *gyrB* avec substitution du Leu-258-Phe et Ser-463-Tyr ont été observées chez *Salmonella* Typhimurium par Gensberg K et al., (1996). Une diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine des souches de salmonelles non typhiques isolées des humains a été révélée par une étude multicentrique faite à Taiwan (48,1%), à la Thaïlande (46,2%), au Corée (36,5%), à Singapour (24,5%), aux Philippines (14,9%), au Sri Lanka (8,0%) et à Hong Kong (7,1%)

(Lee et *al.*, 2009). Au niveau national, la résistance des salmonelles aux quinolones a été observée par Dione et *al.*, 2012. Les fluoroquinolones sont des antibiotiques de dernière recours pour le traitement des salmonelloses notamment avec les souches productrices de BLSE. Trois sérovars de *Salmonella* Istanbul d'origine alimentaire avaient le gène *parC* et étaient résistantes aux quinolones. Une émergence de souches multirésistantes aux quinolones et fluoroquinolones telle que *Salmonella* Gera et *Salmonella* Brancaster a été observée. Ces souches émergentes méritent d'être étudiées ultérieurement pour mieux comprendre leur cause et la conséquence de leur présence dans le secteur alimentaire. Ces résistances sont très préoccupantes d'où la nécessité de continuer la surveillance de l'antibiorésistance des salmonelles au niveau humain, alimentaire et animal et une modération de la prescription des antibiotiques au niveau vétérinaire.

Les facteurs de virulence ont été mis en évidence. Les gènes de virulence *invA*, *pipD*, *orfL*, *misL*, *sopB* ont été détectés sur 95% des souches. La détection du gène *invA* concorde avec le résultat d'autres auteurs (Gassama et *al.*, 2004, Oliveira et *al.*, 2003) qui ont constaté que ce gène est une bonne cible pour détecter les salmonelles. Peterson et *al* ont aussi indiqué que ce gène a été utilisé en tant que marqueur génétique pour les *Salmonella* pathogènes. Alors que la plupart des souches de *Salmonella* contiennent le gène *invA*, le gène de virulence associé au plasmide *spv* a une distribution limitée (Fluit, 2005). De plus, Oliveira et *al* ont précisé que les gènes *spv* ne sont pas présents dans tous les isolats et ne sont donc pas des cibles appropriées pour la détection spécifique du sérotype Enteritidis. Toutefois, dans notre étude, le *spvR* a été caractérisé sur trois souches *S. Enteritidis* d'origine humaine et une souche de *S. Nitra* d'origine aviaire.

En 2013, une étude a déterminé une gamme de gènes de virulence parmi des souches non typhiques isolées à partir de différentes régions géographiques (Malaysie, Indonésie, Papouasie, Nouvelles Guinée et Chili) entre 1983 et 2007. Quinze gènes dont *invA*, *spiC*, *orfL* et *pipD* ont été trouvés dans toutes les souches. Le typage de la virulence est une méthode de criblage rapide pour identifier le profil des gènes de virulence dans les souches de *Salmonella*, permettant ainsi d'améliorer la compréhension des risques potentiels pour les infections humaines et animales (Elemfareji et *al.*, 2013). Au Sénégal et en Gambie, des associations significatives ont été trouvées entre la présence des gènes de virulence (*orfL* ; *pipD*) et la résistance à des antibiotiques couramment utilisés. Ces associations pourraient être expliquées par les mécanismes impliqués dans la pathogénicité et l'acquisition de gènes de résistance par *Salmonella* (Martínez et *al.*, 2002, Dione et *al.*, 2011). Les déterminants génétiques des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence peuvent être hébergés par le même élément

transférable (Carattoli, 2003) comme le SGI1 (Targant, 2010) ce qu'implique qu'il existe une association entre la résistance aux antibiotiques et la virulence. Cette association pourrait avoir un impact sur la propagation de souches résistantes. Par conséquent, la recherche de gènes de virulence et de résistances serait utile pour mieux comprendre la pathogénicité de *Salmonella*.

La comparaison des gènes de virulence et de résistance au niveau des trois secteurs montre que les souches d'origine humaine étaient virulentes et non résistantes. Par contre les souches alimentaire et animale étaient résistantes et virulentes. Ce qui peut être due par une utilisation abusive des antibiotiques en médecine vétérinaire favorisant l'émergence de souches multirésistantes. Ces souches multirésistantes peuvent parvenir à l'homme par la consommation d'aliments contaminés par les salmonelles ; c'est le cas de *Salmonella enterica* sérovar Keur Massar (Gassama et al., 2004) retrouvé en même temps chez l'homme et le poulet, *Salmonella* Kentucky ST198 CIP^R isolées chez les humains et en alimentaire (Le Hello et al., 2013). Actuellement la plupart des salmonelles comme le *Salmonella* Typhimurium DT104 (Mather, 2013) ont l'élément génétique SGI1 ce qui leur confère un haut niveau de résistance. Une des questions principales qui se pose concernant SGI1 et les éléments génétiques de la résistance est de savoir s'ils possèdent la capacité à conférer un phénotype d'hyper virulence aux souches qui le portent. Une étude menée par Varma et al. en 2005 montre que les infections causées par des souches *Salmonella* multirésistantes sont associées à une augmentation du taux d'hospitalisation en comparaison avec les infections causées par les souches *Salmonella* sensibles (Varma et al., 2005). Ceci confirme les résultats d'autres études qui avaient montré que les infections causées par les souches *Salmonella* résistantes étaient plus souvent associées à des hospitalisations, des septicémies et parfois même à la mortalité (Mather, 2013). Cependant, il n'est pas encore prouvé que cette augmentation du taux de mortalité soit liée à une hypervirulence des souches contenant SGI1. Elle peut simplement être causée par les échecs thérapeutiques engendrés par l'utilisation d'antibiotiques inadéquats. Ainsi, d'autres études semblent nécessaires afin de conclure sur le rôle de la résistance dans la virulence des souches.

Comme la majorité des souches de salmonelles résistantes aux antibiotiques sont toujours associées à des infections plus graves (septicémiques) et à un taux d'hospitalisations plus élevé, il serait capital d'accentuer la surveillance de l'utilisation des antibiotiques, notamment en médecine vétérinaire, dans le but de prévenir l'augmentation des résistances aux molécules récentes. Il est important de mener une enquête formelle sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages avicoles.

C. Conclusion

Les 80 souches de salmonelles sélectionnées présentaient des résistances aux quinolones. Cette résistance était codée par les gènes *qnr*, l'*aac(6')-Ib-cr* et des mutations au niveau du gène *gyrB* et le gène *parE*. Les intégrons de classe 1 et 2 ont été détectés sur les isolats. La présence des gènes transférables et les intégrons qui sont des systèmes de capture et d'insertion de cassettes favorisent la diffusion des éléments génétiques de la résistance au niveau des salmonelles voir même aux autres bactéries entéropathogènes. Les isolats possédaient des supports génétiques de la virulence surtout avec les souches d'origine humains.

1:

Fall-Niang NK, Sire JM, Tall A, Samb B, Breurec S, Ndour MM, Faye N, Garin B, Gassama-Sow A. (2013). "Etiology of acute diarrhoea childhood and antimicrobial resistance of enteropathogenic bacteria in Dakar" Dakar Médical 8(1) p1-10

2:

Sire Jean-Marie; Benoit Garin ; Loic Chartier; Ndeye Khota Fall ; Adama Tall; Abdoulaye Seck; François-Xavier Weill; Sébastien Breurec; Muriel Vray (2013). "Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal". Pediatrics and International Child Health 33(3) p139-144 (ISSN: 20469047) DOI: 10.1179/2046905512Y.0000000046

3:

Fall-Niang Nk, Sitraka A, Seck A, Deme T, Combari A, Wane AA, Timbine LG, Bercion R, Faye N, Mbow M, Gassama-Sow A. Evaluation of the level of *Salmonella* contamination in chicken carcasses in Dakar, Senegal. Journal of Food: Microbiology, safety and Hygiene

4:

Fall-Niang Nk, Sitraka A, Seck A, Deme T, Combari A, Wane AA, Mbow M, Timbine LG, Bercion R, Faye N, Gassama-Sow A. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from poultry and humans in Dakar Senegal. Foodborne Pathogens And Disease

Poster:

Fall-Niang Nk, Sitraka A, Seck A, Deme T, Combari A, Wane A, Mbow M, Timbine L, Samb-Ba B, Niang A, Bercion R., Gassama-Sow A Caractérisation moléculaire de souches de salmonelles isolées des aliments, des animaux et des humains.

Ce poster a été présenté aux journées scientifiques organisé par l'Institut Pasteur de Dakar du 18 au 20 juin 2014 à l'Hôtel SAVANA de Dakar. Réunion régionale Afrique du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP).

RECOMMANDATIONS

Il faut lutter contre la contamination par les salmonelles par l'hygiène à tous les maillons de la chaîne (ferme-marché).

Au niveau vétérinaire, il est important que les éleveurs suivent le guide de l'élevage pour éviter la prolifération des salmonelles.

Il serait capital d'accentuer la surveillance de l'utilisation des antibiotiques, notamment en médecine vétérinaire, dans le but de prévenir l'augmentation des résistances aux molécules récentes. Il est important de mener une enquête formelle sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages avicoles.

Il faut avoir une étude de traçabilité des fermes au marché.

Il est important de mettre en place des abattoirs de volailles répondant aux normes d'hygiène.

Il faut une prise de conscience très importante des autorités (services vétérinaires, ministère de l'élevage et du commerce), des éleveurs et de même que les consommateurs des réalisations sont en cours pour prendre en charge la problématique des salmonelles.

Pour leur contrôle, il est important de mettre en place :

- Un plan de surveillance des salmonelles «**de la ferme à l'assiette**».
- Un réseau de surveillance de la résistance aux antibiotiques;
- Une réglementation adaptée et applicable;
- Une pression de contrôle suffisante des services vétérinaires;
- Une information, éducation et sensibilisation des acteurs de la filière sur les risques sanitaires.

En 2015 l'OMS a recommandé cinq conseils pratiques (5 clefs pour des aliments plus sûrs), simples mais essentiels pour se prévenir des maladies d'origine alimentaire.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude a permis de mettre en place un système de surveillance intégrée et efficace permettant le recueil de données sur les salmonelles à toutes les étapes de la chaîne de production aviaire mais aussi à partir de patients présentant des signes de diarrhée.

A notre connaissance, il s'agit de la première étude réalisée dans la même période dans les secteurs humain, animal et alimentaire.

La prévalence des salmonelles était extrêmement élevée au niveau des carcasses de poulets (**53%**) et des fèces de poulets (**18%**), mais reste encore faible au niveau humaine (**5%**). Cette situation pourrait résulter des conditions précaires d'élevage et d'abattage, liées le plus souvent au non respect des normes d'aviculture mais aussi aux mauvaises pratiques d'hygiène lors de la vente des poulets à Dakar où la chaîne de froid fait parfois défaut. Ce qui nous ramène à faire preuve de vigilance au stade de la production et de la vente de poulets. Il est important de suivre les recommandations de l'OMS en 2015 sur la sécurité sanitaire des aliments «de la ferme à l'assiette». Actuellement au Sénégal l'aviculture constitue une source d'emplois très importante. D'où la nécessité de valoriser ce secteur pour mieux commercialiser les produits.

L'étude de l'antibiorésistance et de la diversité génétique des salmonelles ont permis d'avoir une vue d'ensemble sur la distribution des sérovars au niveau des trois secteurs et leur profil de résistance. Ainsi, *S. Kentucky*, *S. Brancaster*, *S. Senftenberg*, *S. Sandiego*, *S. Istanbul* étaient majoritaires avec un pic d'apparition en période de chaleur (Juin-Juillet) qui est propice à leur croissance. Les salmonelles d'origine alimentaire étaient plus résistantes avec en particulier un fort taux de souches résistantes aux quinolones et aux fluoroquinolones.

Cette multirésistance peut être due à la présence d'éléments génétiques telle que SGII qui est un élément mobile intégratif. Il est possible que l'on retrouve ces éléments génétiques dans l'avenir dans d'autres espèces bactériennes pathogènes. La présence de plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques sur un support commun augmentant ainsi la probabilité d'échec thérapeutique.

Les professionnels vétérinaires doivent faire preuve de vigilance aussi bien dans la prescription que dans l'utilisation de ces antibiotiques. La prévention et la communication doivent être prioritairement axées dans les secteurs en amont des stades de distribution pour assurer la santé des populations.

Ces résultats ont été confirmés par la caractérisation moléculaire de 80 souches sélectionnées au niveau des trois secteurs. Les salmonelles présentaient des résistances aux quinolones avec des CMI de NA CMI >256 µg/ml et de la CIP CMI >32 µg/ml. Cette résistance était codée

par les gènes *qnr*, l'*aac(6')-Ib-cr* et des mutations au niveau du gène *gyrB* et le gène *parE*. Les intégrons de classe 1 et 2 ont été détectés sur les isolats. La présence des gènes *qnr* et l'*aac(6')-Ib-cr* qui sont des gènes transférables et les intégrons qui sont des systèmes de capture et d'insertion de cassettes favorisent la diffusion des éléments génétiques de la résistance au niveau des salmonelles voir même aux autres bactéries entéropathogènes. Les isolats possédaient des supports génétiques de la virulence surtout avec les souches d'origine humaines, indiquant une pathogénicité réelle des souches circulantes. D'où la nécessité d'élargir la surveillance pour mieux comprendre le cycle de diffusion des salmonelles au Sénégal et à mieux les combattre.

Comme la majorité des souches de salmonelles résistantes aux antibiotiques sont le plus souvent associées à des infections graves (comme les septicémies) et à une hospitalisation plus longue, il serait capital d'accentuer la surveillance sur l'utilisation des antibiotiques, notamment en médecine vétérinaire, dans le but de prévenir l'augmentation des résistances aux molécules récentes.

Actuellement le défi pour les pays en voie de développement, est de parvenir à l'autosuffisance alimentaire. Mais au regard de ces résultats, il est important que la sécurité sanitaire des aliments devienne aussi une préoccupation majeure pour les autorités étatiques. Ainsi, les institutions privées, publiques et les organisations des consommateurs sont interpellées pour que soient mis en place des systèmes officiels de surveillance intégrée des zoonoses, des autres agents zoonotiques (*E. coli* et *Campylobacter*) et de la résistance au antimicrobien.

Il est aussi important d'avoir des abattoirs moderne, des plumeuses mécaniques et que les acteurs de la commercialisation maintiennent les chaînes de froid pour éviter la prolifération des salmonelles.

Références Bibliographiques

Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S; S. Enterica MLST Study Group (2012) "Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*". PLoS Pathog. 8(6):e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776. Epub 2012 Jun 21.

Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. (2002). "Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000". Gut 51(6):832-41.

Agbaje M., Begum R.H., Oyekunle M. A., Ojo Oe., Adenubi Ot. (2011). "Evolution of *Salmonella* nomenclature". Folia Microbiol (Praha). 56(6):497-503.

Ahmed A.M., Shimamoto T. (2012). "Genetic analysis of multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased broilers in Egypt". Microbiol Immunol, 56(4): p. 254-61.

Ahmed, A.M., Ishida Y., Shimamoto T. (2009). "Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan". J Appl Microbiol. 106(2): p. 402-9.

Alambédi RB, Cardinal E., Biagui C., Akakpo AJ. (2004) « Recherche de résidus de substances à activité antibactérienne dans la chair de poulet consommée dans la région de Dakar (Sénégal) ». Bull. Acad. Vét. France — 2004 - Tome 157 - N°2 www.academie-veterinaire-france.fr

Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML (2000). "Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals". Microb Drug Resist 6: 77-83

Ashraf M. Ahmed, Hiroyuki Nakano Tadashi Shimamoto. (2004). "Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron". J Antimicrob Chemother 55, 371–374 doi:10.1093/jac/dkh534

Aubry. P. (2012). "Les salmonelloses" actualités 2012. Médecine Tropicale. p6

Barlow R, Pemberton JM, Desmarchelier Patricia M et al (2004). "Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection." Antimicrob Agents Chemother 48 (3): 838-842.

Barua, H., Biswas, P. K., Olsen, K. E. P., & Christensen, J. P. (2012). "Prevalence and characterization of motile *Salmonella* in commercial layer poultry farms in Bangladesh". PLoS One 7 (4). 10.1371/journal.pone.0035914

Berends B., Urlings H., Snijders J., Van Knapen F. (1996). "Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella spp.* in pigs". Int. J. Food Microbiol. 30: 37-53.

Biagui C., (2002) «Utilisation des médicaments vétérinaires en élevages avicoles dans la région de Dakar ; qualité de la viande à travers la recherche de résidus de substances à activité antimicrobienne (antibiotique) ». Thèse : Méd.Vét : Dakar ; 8.

Boumart Zineb, Sylvie M. Roche, Françoise Lalande, Isabelle Virlogeux-Payant, Christelle Hennequet-Antier, Pierrette Menanteau, Irene Gabriel, François-Xavier Weill, Philippe Velge, Marianne Chemaly(2012). "Heterogeneity of persistence of *Salmonella enterica* serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks". PLoS ONE 7(4): e35782. doi:10.1371/journal.pone.0035782.

Buldgen A, Detilvimerman F, Sall B, Compere R (1992) « Etude des paramètres démographiques et zootechniques de la poule locale du bassin arachidier sénégalais ». Rév. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 45 (3-4) : 341-347.

Cambray, G., A.M. Guerout, D. Mazel, (2010). “Integrans”. Annu Rev Genet. **44**: 141-66.

Campioni, F., A.M., Moratto Bergamini, Falcão J.P. (2012). “Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil”. Food Microbiol. **32**(2): p. 254-64.

Carattoli A. (2003). “Plasmid-mediated Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica*”. Curr Issues Biol **5**(4): 113-22.

Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead GC, Salvat G. (2005). “Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility”. J Appl Microbiol **99**(4):968-77.

Cardinale, E., Tall F., Gueye E.F., Cisse M. Et Salvat G. (2004). “Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in Senegalese broiler-chicken flocks”. Prev Vet Med **63**: 151–161.

Cavaco L. M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F. M. (2009). “*qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin”. Antimicrob Agents Chemother **53**(2) 603–608.

Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, Barzilay EJ. (2011). “Emerging Infections Program NARMS Working Group. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007”. Antimicrob Agents Chemother **55**:1148–1154.

Dahmen, S., Mansour W., Boujaafar N., Arlet G., Bouallégue O. (2010). “Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia”. Microb Drug Resist. **16** (1): 43-7.

Diagne MM (2008). « Analyse de la compétitivité de la filière avicole semi-industrielle dans la zone des Niayes ». Mémoire de fin d'études à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences Agronomiques et Développement Rural, Département Economie et Sociologie Rurales, Université de Thiès.

Dione MM, Stanny Geerts, Martin Antonio. (2012). “Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant *Salmonella* recovered from poultry in Southern Senegal”. J Infect Dev Ctries **6**(5):436-442.

Dione M.M., Ikumapayi U, Saha D, Mohammed NI, Adegbola RA, Geerts S, Ieven M, Antonio M. (2011). “Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal”. J Infect Dev Ctries. **5**(11): 765-75.

Dione MM, Ieven M, Garin B, Marcotty T, Geerts S (2009), “Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from broiler farms, chicken carcasses, and street-vended restaurants in Casamance, Senegal”. J Food Prot. **72**(11):2423-7.

Doublet, B., Boyd DA., Mulvey M.R., Cloeckaert A., (2005) “The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element”. Mol Microbiol. **55**(6) : p. 1911-24.

Duteurtre G, Dièye PN, Dia D (2005) « L'impact des importations de volailles et de produits laitiers sur la production locale au Sénégal ». Etudes et documents-ISRA, Vol. 8, N°1. 70 p

Elemfareji, O.I. and K.L. Thong. (2013). "Comparative Virulotyping of *Salmonella* typhi and *Salmonella* enteritidis". Indian J Microbiol 53(4): 410-7.

Fabre L, Zhang J, Guigon G, Le Hello S, Guibert V, Accou-Demartin M, de Romans S, Lim C, Roux C, Passet V, Diancourt L, Guibourdenche M, Issenhuth-Jeanjean S, Achtman M, Brisse S, Sola C, Weill FX. (2012). "CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections". PLoS One, 7:e36995

Fàbrega A., J. Vila (2013). "*Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation". Clin Microbiol Rev. 26(2): 308-41.

Fall-Niang NK, Sire JM, Tall A, Samb B, Breurec S, Ndour MM, Faye N, Garin B, Gassama-Sow A. (2013). "Etiology of acute diarrhoea childhood and antimicrobial resistance of enteropathogenic bacteria in Dakar". Dakar Med 8(1) p1-10

Fluit, A.C. (2005). "Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?" FEMS Immunol Med Microbiol 43(1): p. 1-11.

Fofana A. (2004). « Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella spp* et *Escherichia coli* isolées dans la viande de poulet de chair au Sénégal ». Mémoire: productions animales, Dakar (EISMV):6.

Forsythe CT, Ernst ME. (2007). "Do fluoroquinolones commonly cause arthropathy in children?" CJEM 9:459-462.

Freney J., Renaud, F., Hansen, W., Bollet, C. (2000). "*Salmonella*". **Grimont, P.A.D., Grimont, F., Bouvet, P.J.M.** In précis de bactériologie clinique. Editions Alexandre Lacassagne: 1137-1156.

Gassama-Sow A, Diallo MH, Wane AA, Seck A, Samb-Ba B, Sow PS and Aïdara-Kane A (2010). "Genetic determinants of antibiotic resistance in diarrheagenic *Klebsiella pneumoniae* subspecies *ozaenae*: an emerging enteropathogen in Senegal". Clin Infect Dis 50:453-5

Gassama-Sow, A., Diallo MH., Boye CS., Garin B., Sire JM., Sow AI (2006). "Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal". Int J Antimicrob Agents 27(3): 267-70.

Gassama Sow A, Awa Aïdara-Kane, Nabil Raked, François Denis, Marie-Cécile Ploy. (2004). "Integrans in *Salmonella* Keurmassar, Senegal". Emerg. Infect. Dis. 10 (7) : 1339-40

Gaye S. (2004). « Offre en matériels avicoles produits par les artisans locaux dans la zone péri-urbaine de Dakar et dans les Niayes ». Mémoire de fin d'étude d'ingénieur agronome à l'ENSA. 65 p

Gensberg K, Jin YF, Piddock LJ. (1996). "A novel gyrB mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella* typhimurium". Microbiol Lett 137(2-3):293.

Guèye EF (2003) Gender issues in family poultry production systems in low-income food deficit countries, Am. J. Altern. Agric. 18 (4): 185-195

Gordon, M.A., Graham, S.M., Walsh, A.L., Wilson. L., Phiri, A., Molyneux, E., Zijlstra, E.E., Heyderman, R.S., Hart, C.A., Molyneux, M.E. (2008). "Epidemics of Invasive *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection associated with multidrug resistance among adults and children in Malawi." Clin Infect Dis 46: 963-9.

Habyarimana F. (1994). “Elevage de poulet de chair dans la région de Dakar : structure et productivité”. Thèse : Méd. Vét. Dakar N° 28.

Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM (2011). “Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007”. Foodborne Pathog Dis 8:887-900.

Hensel, M. (2004). “Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*”. Int. J. Med. Microbiol. 294(2-3): 95-102.

Infectious Agents Surveillance Center (1996). “Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 infection, 1996, Japan”. Infect. Agents Surveill Rep 17 :180-1

Kagambega A., Lienemann T., Aulu L., Traore A., Barro N., Siitonen A., Et Haukka K. (2013). “Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human *Salmonella* isolates”. BMC Microbiology 13:253

Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Hart CA. (2006). “Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya”. BMC Microbiology 6:101 doi:10.1186/1471-2180-6-101

Kongsoi S, Changkwanyun R, Yokoyama K, Nakajima C, Changkaew K, Suthienkul O, Suzuki Y (2015) “Amino acid substitutions in *GyrA* affect quinolone susceptibility in *Salmonella* typhimurium.” doi: 10.1002/dta.1910. Drug Test Anal.

Lee Hao-Yuan , Lin-Hui Su, Ming-Han Tsai, Shin-Woo Kim, Hyun-Ha Chang,³ Sook-In Jung, Kyung-Hwa Park, Jennifer Perera, Celia Carlos, Ban Hock Tan, Gamini Kumarasinghe, Thomas So, Anan Chongthaleong, Po-Ren Hsueh, Jien-Wei Liu, Jae-Hoon Song, Cheng-Hsun Chiu. (2009). “High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia”. Antimicrob Agents Chemother 53(6): 2696–2699. doi: 10.1128/AAC.01297-08

Le Hello S, Amany Bekhit, Sophie A. Granier, Himel Barua, Janine Beutlich, Magdalena Zajac, Sebastian Münch, Vitali Sintchenko, Brahim Bouchrif, Kayode Fashae, Jean-Louis Pinsard, Lucile Sontag, Laetitia Fabre, Martine Garnier, Véronique Guibert, Peter Howard, Rene S. Hendriksen, Jens P. Christensen, Paritosh K. Biswas, Axel Cloeckaert, Wolfgang Rabsch, Dariusz Wasyl, Benoit Doublet, Weill FX (2013). “The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain” Frontiers in Microbiology Vols. 1 to 5; 2010 to 2014doi: 10.3389/fmicb.2013.00395

Leyral G., Vierling E. (2007) “Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires“ p101-102.

Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E., Threlfall, E.J., McDowell, S.W. Davies, R.H. (2002). “Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland”. J Clin Microbiol (40) 4450–4456.

Magwedere K, Rauff D, De Klerk G, Keddy KH, Dziva F (2015) “Incidence of Nontyphoidal *Salmonella* in Food-Producing Animals, Animal Feed, and the Associated Environment in South Africa, 2012-2014”. Clin Infect Dis. 1;61 Suppl 4:S283-9. doi: 10.1093/cid/civ663.

Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russel J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B. (1998). "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 3140-3145.

Makaya PV, Matope G, Pfukenyi DM. (2012). "Distribution of *Salmonella* serovars and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Enteritidis from poultry in Zimbabwe". Avian Pathol **41**:221-226.

Maraki Sofia Ioannis S. Papadakis. (2014). "Serotypes and antimicrobial resistance of human nontyphoidal isolates of *Salmonella* enterica from Crete, Greece". Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. Volume 2014, Article ID 256181, 5 pages

Martínez J.L., Baquero F. (2002). "Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance". Clin Microbiol Rev. **15**(4):647-79.

Mather AE, Reid SWJ, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomso NR (2013). "Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts" Science Vol. 341 no. 6153 pp. 1514-1517 DOI: 10.1126/science.1240578

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999) "Food-related illness and death in the United States". Emerg Infect Dis. **5**(5):607-25.

Millermann Y. (1998). "Pathogenic power of *Salmonellae*: virulence factors and study models". Vet Res. **29**(5): 385-407.

Molbak Kare, Peter Gerner-Smidt, Henrik C. Wegener. (2002). "Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis". Emerg. Infect. Dis. **8**(5) 514–515. doi: 10.3201/eid0805.010288

Mossel D., Corry J., Struijk C., Baird R. (1995). "Essentials of the microbiology of foods". Londres: John Wiley & Sons. 699p.

Migma Dorji Tamang, Hyang-Mi Nam, Aeran Kim, Hee-Soo Lee, Tae-Sun Kim, Min-Ji Kim, Geum-Chan Jang, Suk-Chan Jung, Suk-Kyung Lim. (2011). "Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea" Foodborne Pathogens and Disease. **8**(11): 1199-1206. doi:10.1089/fpd.2011.0899.

Oliveira, S.D.d., CR. Rodenbusch, GB. Michael, MIR. Cardoso, CW. Canal, A. Brandelli. (2003). "Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources". Braz. J. Microbiol. **34**(1):123-124.

OMS (2007). Salubrité des aliments et maladies d'origine alimentaire. Aide Mémoire N°237.

Pare (2012) « Contribution à l'étude de l'utilisation des médicaments vétérinaires dans les élevages avicoles modernes de la zone périurbaine de Dakar (Sénégal) ». Thèse: Méd. Vét., Dakar; N° 7.

Peirano, G., Agerso Y, Aarestrup FM, Reis EM, Rodrigues DP. (2006). "Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil". J Antimicrob Chemother. **58**(2): p. 305-9.

Peterson, G., Gerdes B., Berges J., Nagaraja T.G., Frye JG. (2010). "Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin". *J Vet Diagn Invest.* 22(4): p. 559-69.

Ploy MC, Gassama A, Chainier D, Denis F. (2005). "Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques." *Immuno-Anal. Biol. Spe.* 20: 343-352.

Ricard C, Mellentin J, Ben Abdallah Chabchoub R, Kingbede P, Heuclin T, Ramdame A, Bouquet A, Couttenier F, Hendricx S (2015). « Méningite à *Salmonelle* chez un nourrisson due à une tortue domestique » *Arch. Pediatr.* Volume 22, Issue 6, p. 605–607 doi:10.1016/j.arcped.2013.09.019

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase". *Nat Med* 12:83–88.

Rodrigue, D.C., Tauxe, R.V., Rowe, B. (1990). "International increase in *Salmonella* Enteritidis: a new pandemic"? *Epidemiol. Infect.* 105: 21-7

Sabooi R., S.D. Siadat, M.R. Aghasadeghi, M.R. Razavi, B. Rajaei, N. Sepehri Rad, A. Moshiri, S.F. Mousavi, S. Javadian, K. Kave, A. Dashtbani-Roozbehani, S.M. Sadat, S. Gerayesh Nejad N. Kashanizadeh (2012). "Molecular detection of *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* resistance genes among *Salmonella* spp. in Iran". *Curr. Res. Bacteriol.* 5: 24-30.

Sack R.B., Rahman M., Yunus M., Khane E. (1997). "Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease." *Clin. Infect. Dis.* 24(1): S102-S105.

Sambe-Ba B, Espié E, Faye ME, Timbiné LG, Sembene M, Gassama-Sow A. (2013). "Community-acquired diarrhea among children and adults in urban settings in Senegal: clinical, epidemiological and microbiological aspects". *BMC Infect Dis* 13:580

Sanders P. (2005). "L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale". *Bull. Acad. Vét. France* 158 (2): 137-143.

Sénégal. Ministère de l'Élevage (2007) « Statistiques d'élevage en 2007 » Dakar : DIREL

Seydi MM, Soumare AI, Sow B, Diop M, Sow PS. (2005). "Current aspects of *Salmonella* bacteremia cases in the Ibrahima Diop Mar Infectious Diseases clinic, Fann National Hospital Center (Senegal)". *Med Mal Infect* 35: 23-27.

Seydi MM, Soumare AI, Sow SA, Diop I, Sow AB, Dieng, ML, Dia BM, Sow PS (2008). "Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia cases in AIDS patients in a Dakar University Hospital (Senegal)". *Med Mal Infect* 38: 25-28.

Sire Jean-Marie, Benoit Garin, Loic Chartier, Ndeye Khota Fall, Adama Tall, Abdoulaye Seck, François-Xavier Weill, Sébastien Breurec, Muriel Vray (2013). "Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal". *Paediatr. Int. Child. Health.* 33 (3) p 139-144 (ISSN: 20469047) DOI: 10.1179/2046905512Y.0000000046

Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009). "Plasmidmediated quinolone resistance: a multifaceted threat". *Clin Microbiol Rev* 22 : 664–689

- Targant H**, (2010) « L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, *Salmonella Genomic Island 1 (SGI1)* : variabilité, diffusion inter-espèces et implication dans la virulence. Thèse de Doctorat, à l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science, Santé. Discipline : Science de la Vie et de la Santé ; Université de Lyon.
- Threlfall, E.J.** (2000). "Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104- a truly multiresistant clone". J. Antimicrob. Chemother. **46**:7-10
- Timbiné LG, Sambe-BA B, Wane AA, Fall NK, Abdou M, Barro N, Sangaré L, Bougoudogo F, Gassama-Sow A.** (2013). "Sensibilité aux antibiotiques des souches de bactéries entéropathogènes isolées en Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Mali, Sénégal)". Dakar Med **58**(2): 80-88.
- Traore El Hadj.** (2006b). Revue du secteur avicole FAO. – 59 p.
- Traoré EH** (2006a) « Première évaluation de la structure et de l'importance du secteur avicole commercial et familial en Afrique de l'Ouest ». Rapport du Sénégal. 52 p
- Toure O. Seck S. M.** (2005). "Exploitations familiales et entreprises agricoles dans la zone des Niayes au Sénégal". Int. Inst. Env. Dev. Programme Zones Arides **133**: 66.
- Uchiya, K., A. Sugita, T. Nikai.** (2009). "Involvement of SPI-2-encoded *SpiC* in flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". BMC Microbiol **9**: p. 179.
- Van Asten, A.J., J.E. van Dijk** (2005). "Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp". FEMS Immunol Med Microbiol. **44**(3): p. 251-9.
- Van Essen-Zandbergen, Hilde Smith, Kees Veldman, Dik Mevius** (2007) "Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands". J Antimicrob Chemother. **59**(4): p. 746-50.
- Varma, J.K., Greene KD, Ovitt J, Barett TJ, Medalla F, Angulo FJ.** (2005) "Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002." Emerg Infect Dis. **11**(6): p. 943-6.
- Villate D.** (2001). "Les maladies des volailles". 2e éd.- Paris : Ed. France Agriculture.399 p.
- Weill F-X.** (2008). "Salmonelles non-typhiques d'origine animale et résistance aux antibiotiques". Bull. Acad. Vét. France, **161**(3)
- Wood, M.W., Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE.** (1998). "Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity". Mol Microbiol. **29**(3): p. 883-91.
- Yamane K, Wachino J-I, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y.** (2007). "New plasmidmediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate". Antimicrob Agents Chemother **51** : 3354–3360.
- Zafer Ata, Artun Yibar, Erdem Arslan, Kaan Mustak, Elcin Gunaydin.** (2014). "Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcasses in Turkey" Acta Vet. Brn, **83**(4): 281-286 doi:10.2754/avb201483040281 83p281
- Zou M.S., Keelara, S. Thakur.** (2012). "Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis". Foodborne Pathog Dis **9**(3): p. 232-8.

Webographie

Aidara-Kane A (2012). « La sécurité alimentaire des aliments, quels défis pour l'Afrique ? » lors du colloque de l'Académie des sciences du Sénégal. <http://www.lesoleil.sn>

ANSES (2011) « Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments ». <https://www.anses.fr/fr/content/fiches-de-dangers-biologiques-transmissibles-par-les-aliments>

Brideau P. (2008). "Écllosion d'infections à *Salmonella* " Agence de la santé publique du Canada, relations avec les médias. (613) 948-7970 www.santepublique.gc.ca

Ministère de l'élevage (CNA-CIMEL de Mbao) Statistiques 2012 de la filière avicole moderne, Juin 2013, Dakar, Sénégal. www.fao.org/docrep/019/i3659f/i3659f.pdf

Ministère de l'élevage (CNA-CIMEL de Mbao) Statistiques 2008 de la filière avicole moderne, Dakar, Sénégal. www.fao.org/docrep/019/i3659f/i3659f.pdf

FAO₁ (2015). «Qualité et sécurité sanitaire des aliments». <http://www.fao.org/worldfoodsummit/french/fsheets/fsafety.pdf> consulté le 02/11/2015

FAO₂ (2015). « L'importance de l'innocuité des fruits et légumes frais». Service de la qualité des aliments et des normes alimentaires (ESNS), Division de l'alimentation et de la nutrition. www.fao.org/ag/agn/CDfruits_fr/b_contenidos/4...4/pres4.1.ppt consulté le 02/11/2015

FAO/OMS (2005). Rapport final, conférence régionale FAO/OMS pour l'Afrique. <http://www.fao.org/docrep/meeting/010/a0215f/A0215F21.htm>

Gueye CK (2011) « Programme de contrôle des salmonelles cas du Sénégal » Hammamet (Tunisie) www.rr-africa.oie.int/docspdf/fr/2011/FS1/10.GUEYE.pdf

INFOSAN Emergency Alert. (Update 2 June 2011). "Outbreak of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections in Germany". http://www.fda.moph.go.th/food_safety/data_center/data_mod/foodsafetynews58.pdf.

INFOSAN «Initiative OMS pour estimer la charge mondiale des maladies d'origine alimentaire» Note d'information INFOSAN n°5/2008 www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_FBD_July08_fr.pdf

Institut de veille sanitaire (2011). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire 2010. <http://www.invs.sante.fr>

Institute of Food Technologists (2015) « Fardeau économique aux Etats-Unis des principales maladies infectieuses d'origine alimentaire », source [IFT News](http://iftnews.com) du 13 mai 2015. Accès Internet: <http://amgar.blog.processalimentaire.com/contaminant-chimique/fardeau-economique-aux-etats-unis-des-principales-maladies-infectieuses-dorigine-alimentaire/>.

OMS (2015a) « la sécurité sanitaire des aliments » Journée mondiale de la Santé 2015. www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/fr/

OMS (2015b) « Sécurité sanitaire des aliments »
http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/fr/

OMS, (2011) Campylobacter Aide-mémoire N°255
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/fr/>

Sylla KSB, Musabyemariya B., Seydi M. (2014). « Leçon inaugurale de la rentrée solennelle à EISMV-UCAD-Dakar ».
http://vet2011.eismv.org/IMG/pdf/Securite_Sanitaire_des_Aliments_en_Afrique_subsahrienne_franco_phone.pdf.

Weill FX, Le Hello S (2013) « Salmonellose », Unité des Bactéries pathogènes entériques, Centre National de Référence des *Salmonella* Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques INSTITUT PASTEUR, PARIS <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/salmonellose>.

Weill FX, Le Hello S (2011) « Rapport d'activité annuel 2011 » Centre National de Référence des *Salmonella* Unité de Recherche et d'Expertise des Bactéries Pathogènes Entériques INSTITUT PASTEUR, PARIS <https://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004r-01c/rapport-cnr-salmonella-2011.pdf>.

Annexes

Annexe 1 : Fiches d'enquêtes au niveau humaine, alimentaire et animale**Fiche alimentaire poulets**

Critères d'inclusion : poulets déplumés, éviscérés et vendus en étalage au niveau des marchés polyvalents de la zone de Dakar

Code Poulet : (3 lettres identifiant le laboratoire+identifiant du lieu d'achat : de 1 à 8

+identifiant du poulet de 1 à n) : |_|_| |_|_| |_|_| |_|_|_|

Date d'achat du poulet |_|_| |_|_| |_|_|

Type de poulet :

☐ Ne sait pas ☐ Poulet de ponte réformé ☐ Poulet de chair ☐ Poulet du pays

Provenance du poulet :

☐ Ne sait pas

☐ Elevage familial (moins de 50 poulets)

☐ Elevage traditionnel (50-100 poulets)

☐ Elevage semi industriel (100-500 poulets)

☐ Elevage industriel (>500 poulets)

Zone d'élevage du poulet :

☐ Ne sait pas

☐ Urbaine ou Semi Urbaine

☐ Rurale

Hygiène et Environnement lieu de vente : Hygiène des locaux

☐ Très satisfaisante

☐ Satisfaisante

☐ Acceptable

☐ Non satisfaisante

Conditionnement des poulets :

☐ En sachet individuel ☐ Regroupé dans un bocal fermé ☐ A l'air libre ☐ Autre :

Laboratoire

Date de réception au laboratoire |_|_| |_|_| |_|_|

Heure |_|_|h|_|_|mn

Température à la réception : °C

Etat de l'échantillon ☐ Bon ☐ Mauvais ☐ Inutilisable

Fiche vétérinaire poulets

Critères d'inclusion : poulets en élevage dans la zone des Niayes à Dakar, élevés en litière, en phase de croissance et de finition

Code Poulet : (3 lettres identifiant le laboratoire+identifiant de la ferme : de 1 à 10+identifiant du poulet de 1 à n) : |_|_|_| |_|_|_| |_|_|_|

Ferme avicole concernée _____

Date visite |_|_| |_|_| |_|_|

Souche de poulet :

Période d'élevage : ☐ Phase croissance ☐ Phase finition

Effectif élevage |_|_|_|_|_|_|_|_|

Date d'entrée de la bande |_|_| |_|_| |_|_| Ou Age poulet |_|_| jours

Conditions d'élevage

☐ Très satisfaisante

☐ Satisfaisante

☐ Acceptable

☐ Non satisfaisante

Prise d'antibiotiques dans les 10 derniers jours ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Nature de l'antibiotique utilisé :

Laboratoire

Date de réception au laboratoire |_|_| |_|_| |_|_| Heure |_|_|h|_|_|

Ecouvillonnages cloacaux ☐ Non ☐ Oui

Etat de l'échantillon ☐ Bon ☐ Mauvais ☐ Inutilisable

Aspect des fientes ☐ Molles ☐ Liquides ☐ Afécales

☐ Verdâtre ☐ Marron

Fiche de recueil épidémio-clinique

Code Patient : (3 lettres identifiant le laboratoire + identifiant le centre de santé : de 1 à 8 + identifiant du patient de 1 à n) :

Type de patient ☐ Ambulatoire ☐ Hospitalisé

Formation sanitaire où l'enfant a été recruté

Date d'inclusion

Numéro d'inclusion

Nom Prénom

Né le Ou Age mois

Sexe ☐ Masculin ☐ Féminin

Date d'apparition de la diarrhée

Lors de l'inclusion

Température de l'enfant (axillaire + 0,5°C ou rectale) °C

Déshydratation ☐ Non ☐ Oui

Altération de l'état général ☐ Non ☐ Oui

Consommation d'aliment suspect ? ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Type d'eau de boisson utilisée

Robinet ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Puits ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Autre ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Contact avec les animaux ? ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Autre cas de diarrhée dans la famille ? ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Prise d'antibiotiques dans les 7 derniers jours ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Autres cas de diarrhée dans le ménage dans les 7 derniers jours ☐ Non ☐ Oui ☐ Inconnu

Heure du recueil des selles h

Laboratoire

Date de réception au laboratoire Heure h

Milieu de transport ☐ Non ☐ Oui

Etat de l'échantillon ☐ Bon ☐ Mauvais ☐ Inutilisable

Aspect des selles ☐ Molles ☐ Liquides ☐ Afécales ☐ Avec glaire ☐ Avec

Annexe 2 : Test Adéno-Rota

La recherche des virus entéropathogènes était faite avec le kit Vikia adéno-rotavirus (bioMérieux) selon le protocole au suivant :

- Distribuer 50 µl de selle dans le flacon contenant le tampon de dilution.
- Vortexer jusqu'à homogénéisation.
- Retirer la cassette du sachet scellé et l'utiliser rapidement.
- Transférer deux gouttes de selle diluée dans le puits échantillon (S) de la cassette.
- Attendre 10 mn.
- Lire. Si une ligne de contrôle « C » et une ligne rouge en « A » apparaissent, l'échantillon est positif pour les Adénovirus.
- Si une ligne de contrôle « C » et une ligne bleue en « R » apparaissent, l'échantillon est positif pour les Rotavirus.
- Si une ligne de contrôle « C », une ligne rouge en « A » et une ligne bleue en « R » apparaissent, l'échantillon est positif à la fois pour les Adénovirus et les Rotavirus.
- Si une ligne de contrôle « C » apparaît seul, l'échantillon est négatif.
- Si la ligne de contrôle « C » n'apparaît pas, le test est ininterprétable.

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN total par la méthode chimique QIAamp et par thermolyse

1. Pour l'obtention du matériel génétique nous avons effectué une extraction de l'ADN génomique avec les réactifs QIAGEN (QIamp DNA Mini Kit Cat. 51304 Qiagen) selon le protocole si après :
2. - Après isolement sur gélose TCS (Tryptocaséine-Soja) 18-24H
3. - Racler les colonies et les diluer dans 180µl de tampon ATL, vortexer
4. - Ajouter 20µl de protéinase K, vortexer, incubé à 56°C, 1 heure
5. - Centrifuger brièvement (15 secondes).
6. - Ajouter 200µl de tampon AL, vortexer, incubé à 70°C, 10 minutes
7. - Centrifuger brièvement (quelques secondes)
8. - Ajouter 200µl d'éthanol absolu (96-100°), vortexer
9. - Centrifuger brièvement (quelques secondes)

10. - Déposer le mélange (600µl, y compris le précipité) dans la colonne Qiagen, centrifuger 6000g, 1 minute
11. - Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection
12. - Ouvrir la colonne doucement et ajouter 500µl de tampon AW1 additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 6000g, 1 minute
13. - Retirer la colonne et la placer dans un nouveau tube de collection.
14. - Ouvrir la colonne et ajouter 500µl de tampon AW2 additionné d'éthanol, refermer la colonne et centrifuger à 20000g, 3 minutes.
15. - Ajouter 200µl de tampon AE, incubé à température ambiante 1 minute, Centrifuger à 6000g, 1 minute
16. - Mettre la colonne dans un tube eppendorf de 1,5ml
17. - Jeter la colonne et conserver l'ADN à -20°C

La méthode d'extraction par thermolyse a été utilisée

Annexe 4 : Protocole de PCR

La détection des éléments génétique de la résistance se faisait par PCR. C'est l'abréviation en anglais de Polymerase Chain réaction (réaction de polymérisation en chaîne) qui consiste en une amplification d'un fragment d'ADN de petite taille (1 million de fois) par action de la Taq polymérase, d'amorces spécifiques et de nucléotides dans un thermocycleur.

Composition du MIX d'ADN

Le mélange réactionnel est composé de :

- Eau bidistillée stérile ppi, nucléotides, tampon de réaction 10x, primers, taq polymérase, lysat voir tableau ci-dessous.

Réactifs utilisés au cours de l'amplification :	Concentration initiale	Quantité en µl pour un essai
10X PCR Buffer sans MgCl ₂ Roche	10X	2,5
MgCl ₂ 25 mM Roche	25mM	2
Amorce III F	20µM	1.5
Amorce IV R	20µM	1,5
dNTP 1.25 mM	1,25mM	0,5
Ampoule eau PPI		11,5
AmpliTaq® polymérase 5 UI/µl:	5UI/µl	0,25

Pour les gènes qui nécessite de faire un séquençage après amplification le mélange réactionnel est composé de :

- Master Mix 10X
- Eau ppi
- Primers1
- Primers 2

Le Master Mix permet d'avoir des bandes très claires et de bons résultats pour le séquençage.

- Un témoin positif et un témoin négatif sont à chaque fois mis dans les séries.
- Le témoin positif permet de vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel et de l'amplification.
- Le témoin négatif permet de vérifier les éventuelles contaminations.
- L'amplification génique est faite dans un thermocycleur (2720 thermal Cyber Applied Biosystems), avec les paramètres suivants : 5 mn de pré dénaturation à 94°C suivie de 30 cycles de [30 sec à 94°C ; 1 mn (**température d'hybridation variait en fonction des gènes**) ; 1 mn à 72°C] et une incubation finale à 72°C pendant 10 mn.
- A la fin du programme, les amplifiats étaient testés immédiatement ou conservés à 4°C pendant 24 heures.
- Les fragments d'ADN étaient séparés par une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (**Annexe 5**), en champ continu à 100 volts pendant 60 mn pour les grands cuves et à 120 volts pendant 30mn pour le mupid One et dans un bain de tampon TBE ou TAE 1X.
- Dans chaque puits du gel étaient déposés, 7µl de produit PCR et 3µl de bleu de dépôt.
- Un marqueur de poids moléculaire était utilisé et placé dans le premier puits.
- La révélation des migrations était faite sur une table à ultra violet.
- Une photo polaroid était réalisée. Les bandes considérées comme positives étaient en fonction du nombre de paire de base du gène recherché si les témoins positifs et négatifs étaient confirmés.

Annexe 5 : Préparation du gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ continu. La concentration du gel d'agarose est de 1,5%.

- Préparer le support gel adéquat dans le système de coulage

- Peser 1,5 g d'agarose dans un flacon stérile de 250 ml
- Ajouter 100 ml de tampon TBE 1 X
- Faire fondre 2 mn dans le four à microondes
- Laisser refroidir à environ 60°C
- Ajouter 2 gouttes de BET
- Mélanger délicatement et couler sur le support gel
- Installer immédiatement les peignes
- Laisser solidifier 30 minutes en fonction de la dimension du gel sur la pailleasse
- Enlever les peignes et poser le gel et son support dans la cuve (conservation du gel à + 4°C maximum 3 j dans papier aluminium)
- Remplir la cuve avec du tampon de migration TBE 1X. Le niveau du tampon doit être de 5 mm au dessus du niveau du gel

Annexe 6 : Protocole du kit de purification d'ADN

La purification d'ADN se faisait par le kit QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit, cat. No 28704).

Ce protocole est pour la purification d'ADN jusqu'à 10µg (**70 bp à 10Kb**). Toutes les étapes de centrifugation sont effectués à 17.900g (13.000rpm) dans une table classique de centrifugeuse.

- Découper le fragment d'ADN du gel d'agarose ave scalpul propre et tranchant.
- Peser la portion de gel dans un tube Ependorf. Ajouter 3 volumes de tampon **QG** dans 1 volume de **gel** (100mg de gel = 100µl).
- Incuber à **50°C** pendant 10 minutes (jusqu'à ce que le gel soit complètement dissout. Vortexer le tube tous les 2 à 3 minutes pour aider la dissolution du gel. Vérifier si la couleur du mélange reste jaune sinon ajouter 10µl à 3M d'acétate de sodium pH 5.0 et mélanger.
- Ajouter 1 volume d'isopropanol à l'échantillon et mélanger.
- Placer un spi colonne QIAquick dans le tube collecteur de 2 ml pour lier l'ADN. Verser l'échantillon sur la colonne et centrifuger pendant 1 minute. jeter le liquide et replacer la colonne dans le même tube.

- Si l'ADN sera ensuite utilisé pour le séquençage, ajouter 500µl de tampon **QG** dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute.
- Pour le lavage, ajouter 750µl de tampon **PE** dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute.

NB : Après l'addition de tampon **PE**, laissé au repos 2-5 min.

- Mettre la colonne dans un tube éppendorf.
- Pour éluer l'ADN, ajouter 50µl de tampon **EB**.

Annexe 7 : Détermination des CMI par la méthode E-Test

- Prélever 5ml d'eau physiologique.
- Mettre en suspension les colonies de salmonelles pour avoir une concentration de 5 MacFard.
- Ensemencer par écouvonnage sur gélose Mueller-Hinton (Bio Rad, France).
- Attendre que la surface de la boîte soit sèche, puis déposer une bandelette E-test® (Biomérieux France).
- Incuber pendant 24H.
- Lecture et interprétation des résultats. La CMI était lue directement à l'intersection du bord d'inhibition et la bandelette Etest®.

-

Annexe 8 : Protocole de conjugaison bactérienne

Souche donatrice : *Shigella flexneri*

Souche réceptrice : *E. coli* NalR

1. Ensemencer une colonie de la souche donatrice et de la souche réceptrice dans 5ml LBB ; incuber une nuit à 37°C
2. Le lendemain, diluer les cultures au 1/50° soit 400µl dans 20ml de LBB ; incuber sous agitation intense à 37°C jusqu'à la phase logarithmique de croissance (DO 600nm=0,6-0,8) (environ 4h).
3. Mélanger différents ratios donneur/ récepteur : 1 : 1 ; 1 : 2 ; 1 : 10. Pour cela, mettre dans un erlenmeyer stérile 30ml de LBB, distribuer :

Ratio 1 : 1

- 10ml de bactéries donatrices
- 10 ml de bactéries réceptrices
- 10 ml de LB stérile

Ratio 1 : 2

- 5 ml de bactéries donatrices
- 5 ml de bactéries réceptrices
- 5 ml de LB stérile

Ratio 1 : 10

- 1 ml de bactéries donatrices
- 1 ml de bactéries réceptrices
- 1 ml de LB stérile

Incuber 2- 3h sans agitation

4. Pendant ce temps, préparer les géloses sélectionnant les transconjugants et les bactéries donatrices :

3 LBA additionnés :

- d'acide nalidixique à 50µg/ml (soit 100µl d'acide nalidixique à 10mg/ml pour 20ml de LBA)
- de streptomycine à 25µg/ml (soit 50µl d'une solution à 10mg/ml pour 20ml de LBA)
- de triméthoprimé à 5µg/ml (soit 100µl d'une solution à 1mg/ml pour 20ml de LBA)
- d'ampicilline à 100µg/ml (soit 20µl d'une solution à 100mg/ml pour 20ml de LBA)

Sélectionnent les transconjugants

3 LBA additionnés :

- de streptomycine à 25µg/ml (soit 50µl d'une solution à 10mg/ml pour 20ml de LBA)
- de triméthoprimé à 5µg/ml (soit 100µl d'une solution à 1mg/ml pour 20ml de LBA)

Sélectionnent les bactéries donatrices

5. Au terme de l'incubation, verser le mélange bactérien dans la chambre supérieure d'une unité de filtration. A l'aide d'une pompe, aspirer le liquide ; rincer la membrane filtrante avec un petit volume de LBB.
6. Récupérer la membrane filtrante et la placer immédiatement sur une gélose LBA non sélective, face filtrante vers le haut. Incuber à 37°C, 30min à 16h
7. Retirer avec précaution la membrane filtrante de la boîte et la placer dans un flacon stérile ; ajouter 5 ml de LBB. Agiter vigoureusement de façon à libérer les bactéries dans le liquide

8. Préparer une série de dilutions de 10 en 10 en LBB stérile (1ml de mélange bactérien dans 9 ml de LBB (jusqu'à 10^{-7})
 9. Déposer 200µl de chaque dilution sur les milieux sélectifs ; ensemencer en rateau et incuber à 37°C pour obtenir des transconjugants
 10. Déterminer la fréquence de transfert : c'est le ratio entre le nombre de transconjugants sur le nombre de donneurs après conjugaison (nombre total de bactéries isolées sur gélose non sélective)
 11. Effectuer des antibiogrammes sur les transconjugants et éventuellement l'extraction plasmidique.
- **NB** : Respecter les quantités de réactifs, d'inoculum, le temps et les températures

Annexe 9: Listes des souches constituant les témoins positifs pour les PCR

Les souches constituant les témoins positifs étaient des souches de référence :

- P1: *Salmonella* Typhimurium 4/74 ATCC
- P2: *Salmonella* Abortusovis
- P3: *Salmonella* Concord 05-5343
- P4: *Salmonella* Havana 07-319
- P5: *Enterobacter cloacae* AME
- P6: *Salmonella* Typhimurium 02-8213
- P7: *Shigella dysenteriae* CAR 10
- P8: *Salmonella* SS- 44, ATTC

Annexe 10 : Listes des souches de salmonelles sélectionnées des trois secteurs

Origine	Número	Sérovars	Antibiorésistance
HUMAINE / BACT	KM	Enteritidis	GM-NOR-CIP-NA
	W0905133	Brancaster	SXT-TE
	W0912222	Brancaster	SXT-TE
	W0924054	Schwarzengrund	souche sauvage
	W1012001	Senftenberg	SXT
	W1017063	Poona	AMX-CTX-GM-TIC-AMC-CF-CAZ-SXT-C
	W1020020	Nyborg	souche sauvage
	W1029149	Corvallis	SXT
	W1128230	Chester	CF-TE
	X0418261	Somone	SXT-TE
	X0506254	Enteritidis	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	X0603096	Baildon	SXT-TE
	X0621108	Enteritidis	souche sauvage
	X0626273	Kentucky	GM-SXT-TE
ANIMALE / VETO	Sal8	Brancaster	TE
	Sal9	Brancaster	TE
	Sal10	Kentucky	TE
	Sal11	Chester	souche sauvage
	Sal12	Kaapstad	AM-TIC-TE-SXT
	Sal13	Brancaster	SXT-TE
	Sal14	Muenster	souche sauvage
	Sal16	Brancaster	SXT-TE
	Sal17	Offa	souche sauvage
	Sal18	Brancaster	TE
	Sal19	Kentucky	SXT-TE-C
	Sal21	Brancaster	TE
	Sal22	Virchow	souche sauvage
	Sal23	Nitra	souche sauvage
	Sal24	Brancaster	TE
	Sal25	Brancaster	TE
	Sal29	Brancaster	SXT
	Sal35	Sandiego	NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal37	Chester	NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal39	Sandiego	NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal44	Urbana	NA-NOR-CIP
	Sal45	Kentucky	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal54	Kentucky	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CIP
	Sal71	Sandiego	NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal75	Kentucky	AM-TIC-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-GM-NA-TE-NOR-CIP
	Sal82	Urbana	NA-TE-NOR-CIP-SXT
	Sal67	Offa	AM-FOX-NA-NOR-CIP-C
	Sal20	Brancaster	NA-TE-NOR-SXT
	Sal30	Brancaster	NA-TE-SXT
	Sal1	Typhimurium	AM-TIC-TE-SXT
	Sal42	Chester	AMC-TIC-TE-SXT
	Sal53	Brancaster	AM-CF-GM-TE-NOR-SXT
ALIMENT AIRE / LSAHE	1	Kentucky	NOR-CIP-NA
	2	Ruzizi	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	5	Hadar	TE
	7	Senftenberg	CTX
	8	Hadar	NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-SXT-TE-C
	10	Yeerongpilly	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE
	20	Kentucky	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	22	Kentucky	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	24	Senftenberg	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	25	Ouakam	souche sauvage
	26	Senftenberg	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE
	27	Senftenberg	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE
	28	Kentucky	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE
	30	Kentucky	NOR-CIP-NA-TE
	32	Benfica	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	33	Abony	NOR-CIP-NA-SXT-TE

	34	Brancaster	NOR-CIP-NA-TE
	39	Kentucky	NOR-CIP-NA-TE
	46	Kentucky	SXT-TE
	51	Istambul	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	55	Brancaster	NOR-CIP-NA-TE
	70	Kentucky	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	74	Farsta	NOR-CIP-TE
	76	Istanbul	TE
	83	Istanbul	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	115	Sandiego	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	121	En cours	NOR-AMC-CIP-CF-NA-FOX-TE
	138	Hadar	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	141	Gera	AMX-NOR-AMC-CIP-NA-FOX-TE
	159	En cours	NOR-CIP-NA-TE
	204	Kentucky	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE
	261	Istanbul	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	271	Istanbul	NOR-CIP-NA-SXT-TE
	275	Istanbul	NOR-CIP-NA-SXT-TE

Annexe 11 : Articles**Article 1:****ARTICLE ORIGINAL**

ETIOLOGIES DES DIARRHEES AIGUES INFANTILES ET ANTIBIORESISTANCE DES BACTERIES ENTEROPATHOGENES A DAKAR

ETIOLOGY OF ACUTE DIARRHOEA CHILDHOOD AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ENTEROPATHOGENIC BACTERIA IN DAKAR

Fall-Niang NK^{1,2}, Sire JM^{1,5}, Tall A³, Samb B², Breurec S¹, Ndour MM⁴, Faye N⁵, Garin B^{1,7}, Gassama-Sow A²

1. Unité de Biologie Médicale, Institut Pasteur, 220, Dakar, Sénégal

2. Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur, 220, Dakar, Sénégal

3. Unité d'Epidémiologie des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur, 220, Dakar, Sénégal

4. Dispensaire St Martin, Rebeuss, Dakar, Sénégal

5. Département de Biologie Animale, Laboratoire de Parasitologie Générale, FST/UCAD, Dakar, Sénégal

6. Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France

7. Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur, Tananarive, Madagascar

Résumé

Introduction : Les diarrhées constituent un problème majeur de santé publique en milieu tropical, en particulier chez les enfants. Les causes infectieuses se répartissent entre des étiologies virales les plus fréquentes, parasitaires et bactériennes avec communément des campylobactérioses, des salmonelloses et des shigelloses. **Méthodologie :** La coproculture, le test virologique vikia rota-adeno et l'examen parasitologique ont été utilisés pour déterminer les étiologies infectieuses des diarrhées chez 100 enfants âgés de moins de 5 ans. Cette étude s'est déroulée du 27 août 2007 au 30 mars 2008 au dispensaire Saint Martin de Rebeuss à Dakar. **Résultats :** Les enfants âgés de moins de 18 mois représentaient 65% de l'échantillonnage. Sur 100 selles examinées, 50% étaient positives pour un ou plusieurs agents entéropathogènes : virus (54%), bactéries (34%) et parasites (12%). Parmi les étiologies virales, les rotavirus étaient majoritaires (80%). Les étiologies bactériennes se répartissaient comme suit : shigelloses (54%), salmonelloses (18%), campylobactérioses (18%) et infections à *Escherichia coli* entéropathogènes (10%). Les parasites étaient représentés par des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* (53%) et de *Giardia lamblia* (27%) ; des œufs d'*Ascaris lumbricoides* (13%) et de *Trichuris trichiura* (7%). Les résistances aux antibiotiques des shigelles et *Campylobacter* sp ne concernaient pas les céphalosporines de 3^{ème} génération ni les fluoroquinolones. Chez *Salmonella* nous notons une émergence de la résistance aux quinolones (20% des souches). En revanche, les souches de shigelles étaient résistantes aux pénicillines, aux cyclines et aux phénicolés. **Conclusion :** Les rotavirus sont les principales étiologies des diarrhées infantiles, suivies des bactéries. Les céphalosporines de 3^{ème} génération restent toujours efficaces pour le traitement des shigelloses, des salmonelloses et des campylobactérioses. L'éducation à la santé et le vaccin contre les rotavirus pourraient avoir un impact important sur la morbidité. **Mots clés :** Etiologies, diarrhées infantiles, antibiorésistance, Dakar

Summary

Background : Diarrhoea is a major public health problem in tropical environments, particularly in children. Infectious causes are divided between the most common viral etiology, with parasitic and bacterial infections commonly campylobacteriosis, salmonellosis and shigellosis.

Methodology: Stool culture, Vikia rota-adeno test and parasitological test were used to determine the infectious etiology of the 100 stools diarrheic children under 5 years old in the Health Center « Dispensaire Saint Martin » in Dakar ; stool samples were collected between 27 august 2007 and 30 march 2008.

Results: Children younger than 18 months accounted for 65% of the sampling. Of the 100 stools examined, 50% were positive for one or more enteric pathogens: virus (54%), bacteria (34%) and parasites (12%). Concerning viral etiology, rotavirus predominated (80%). Bacterial etiology were divided into shigellosis (54%), salmonellosis (18%), campylobacteriosis (18%) and enteropathogenic *Escherichia coli* infections (10%). Parasites were represented by vegetative forms of *Entamoeba histolytica* (53%) and *Giardia* (27%), eggs of *Ascaris lumbricoides* (13%) and *Trichuris trichiura* (7%). *Shigella* sp and *Campylobacter* sp isolates were not resistant to 3rd generation cephalosporins or fluoroquinolones. We noted the emergence of quinolone-resistant *Salmonella* (20% of strains). In addition, *Shigella* isolates were largely resistant to penicillins, cyclin, and phenicol.

Conclusion: Rotavirus is the predominant cause of acute childhood diarrhoea, followed by bacteria. Third generation cephalosporins are still effective for the treatment of shigellosis, salmonellosis and campylobacteriosis. Health education and rotavirus-vaccination could have substantial impact on childhood morbidity.

Keywords: Etiology, diarrhoea childhood, antimicrobial resistance, Dakar

INTRODUCTION

La diarrhée est la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de 5 ans et elle représente chaque année 10% des décès d'enfants [1]. Pourtant, bien que les maladies diarrhéiques soient évitables et puissent être traitées par des moyens peu coûteux, on n'a guère enregistré de progrès dans la réduction de leur incidence chez l'enfant au cours des dernières années [2]. Les agents incriminés peuvent être des virus, des bactéries ou des parasites.

Les principaux agents des diarrhées virales chez les enfants sont les Adénovirus et les Rotavirus. Chaque année, les rotavirus causent plus de 611000 décès, environ 2,4 millions d'hospitalisation et plus de 25 millions de visites cliniques à travers le monde chez les enfants de moins de 5 ans [3]. Parmi les étiologies parasitaires des diarrhées, *Entamoeba histolytica* et *Giardia intestinalis* sont les protozoaires les plus dominants, alors que pour les helminthes *Ascaris lumbricoïdes* et *Trichuris trichiura* sont plus prévalents [4]. Les étiologies bactériennes se répartissent entre les shigelles, les salmonelles, les campylobacter et les souches de *Escherichia coli* entéropathogènes [5-8].

L'utilisation anarchique et inappropriée des antibiotiques aussi bien en Médecine humaine que vétérinaire a favorisé l'émergence de résistance aux antibiotiques chez les bactéries entériques. Au Sénégal, l'utilisation des quinolones dans la filière volaille est de pratique courante depuis

1996. Des souches multirésistantes hébergeant des éléments génétiques de dissémination de la résistance aux antibiotiques sont de plus en plus observées [9-11].

Cette étude, menée au dispensaire Saint-Martin de Dakar entre Aout 2007 et Mars 2008 avait pour objectifs de fournir des données supplémentaires sur les étiologies des diarrhées chez les enfants de moins de 5 ans et sur la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Patients

Les inclusions étaient décidées par les médecins du dispensaire St Martin à la suite des réponses apportées à un questionnaire. Les sujets inclus dans l'étude devaient avoir entre 1 mois et 5 ans et présenter une diarrhée ayant débuté dans les dernières 48 heures. L'aspect des selles devait être aqueux, glaireux, muqueux ou sanglant. Etait exclu de l'étude tout sujet sous traitement antibiotique au moment de la consultation ou ayant eu un traitement antibiotique dans la semaine la précédant.

Au total 190 prélèvements de selles ont été collectés chez des enfants répondant aux critères d'inclusion.

Méthode

Examen parasitologique, virologique et bactériologique des selles

L'examen parasitologique et virologique se faisait au premier jour, alors que l'examen bactériologique des selles se déroulait sur cinq jours au maximum.

L'examen macroscopique et microscopique des selles, leur ensemencement sur les milieux d'isolement et dans les bouillons d'enrichissement étaient effectués au laboratoire du dispensaire S^t Martin, 30 mn au maximum après leur émission. La suite des manipulations était réalisée à l'Institut Pasteur de Dakar.

Examen macroscopique : l'aspect des selles était noté sur la feuille de suivi analytique. L'examen microscopique à l'état frais était réalisé avec une observation au grossissement X 40. La présence de leucocytes, d'hématies, de germes à mobilité caractéristique (*Vibrio cholerae*, *Campylobacter*), de formes parasitaires et de levures filamenteuses était rapportée sur la feuille de paillasse. La recherche des kystes et des œufs de parasites a été réalisée par la technique de coloration des selles après concentration avec une solution de Merthiolate Iode Formol. La coloration de Gram permettait d'évaluer la composition et l'état de la flore intestinale du patient. Examen virologique : La recherche des virus entériques (Adenovirus et Rotavirus) était effectuée au laboratoire de Biologie Médicale de

l'Institut Pasteur de Dakar en utilisant le kit Vikia adéno-rotavirus (BioMérieux) 1 à 2 h après l'émission des selles. Pour le mode d'emploi, la lecture et l'interprétation des résultats suivaient les instructions du fabricant.

Coproculture : Les selles ont été isolées sur des milieux sélectifs et usuels [Hektoen, BCP, Mac Conkey, (Bio Rad, France)] pour la recherche des shigelles et d' *Escherichia coli*. Par contre elles ont été isolées sur des milieux sélectifs [Shigelles-Salmonelles, Hektoen, Xylose Lysine Désoxycholate (XLD), Thiosulfate Citrate Bile Sacharose (TCBS) (Bio Rad, France)], Rambach (Merck, Allemagne) après enrichissement sur différents bouillons [sélénite, Mueller-Kauffman et eau peptonée (Bio Rad, France)] pour la recherche des salmonelles et de vibrio. En outre, d'autres milieux sélectifs [Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine (CIN), Ryan, géloses Karmali (Oxoid, Allemagne)] étaient inoculées pour la recherche de *Yersinia*, d'*Aeromonas* et de *Campylobacter sp.* En cas de présence de colonies suspectes des techniques de routine étaient utilisées (recherche de l'uréase pour *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio* et *Yersinia*, oxydase et catalase pour *Campylobacter sp.*). Une galerie classique puis API était mise en route pour l'identification biochimique.

Le sérotypage était réalisé par agglutination sur lame. Toutes les salmonelles étaient sérotypées avec des antisérums polyvalents et monovalents (Statens serum Institut 5, Artillerivej 2300 Cph.S Denmark). L'agglutination des antigènes

somatiques O et Vi des souches de salmonelles, des shigelles et de *Escherichia coli* était faite après isolement des colonies sur gélose Mueller-Hinton. Par contre l'agglutination H était réalisée après isolement sur Kligler-Hajna. Le sérotypage des salmonelles était fait en se référant au schéma de Kauffman-White.

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques était réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Edition de janvier 2007 (CASFM/www.sfm-microbiologie.org).

Une lecture automatique des diamètres des zones d'inhibition des disques était obtenue à l'aide d'une caméra (Osiris, Bio Rad, France). Le classement en Sensible/Intermédiaire/Résistant était fait automatiquement par le logiciel Osiris en fonction des critères édictés par le CASFM Edition de janvier 2007.

L'analyse des données statistiques a été réalisée avec le logiciel STATA.

RESULTATS

La répartition par sexe montrait une légère prédominance des garçons, avec un Sex Ratio de 1,26. La moyenne d'âge était de 16 mois, les âges extrêmes étaient de 1 et 58 mois, 39% des enfants avaient moins d'un an à l'inclusion (Tableau I).

Tableau I : Répartition des 190 enfants par catégories d'âges

Classes d'âges (mois)	Nombres (%)
[1 – 6[21 (11)
[6 -12[54 (28)
[12-18[48 (25)
[18-24[22 (12)
[24-30[18 (10)
[30-36[14 (7)
[36-58[13 (7)

Une relation statistiquement significative existait entre selles sanglantes et *Shigella* ($p=0.003$). Cet aspect macroscopique était effectivement retrouvé chez 57% des enfants chez qui la bactérie a été isolée contre 9% chez ceux qui n'avaient pas de shigelles à la coproculture.

Répartition des agents entéropathogènes

Cent dix neuf agents entéropathogènes étaient retrouvés (Figure 1). Les étiologies virales prédominaient (54%), suivies des étiologies bactériennes (33%) et parasitaires (13%).

Résultats bactériologiques

La tableau II montrait la répartition des bactéries entéropathogènes.

Variations du nombre de cas dans le temps
Les variations mensuelles de chaque agent entéropathogène avaient montré (Figure 2) un pic de fréquence des rotavirus au mois de janvier qui correspondait à l'épidémie des rotavirus de la saison fraîche.

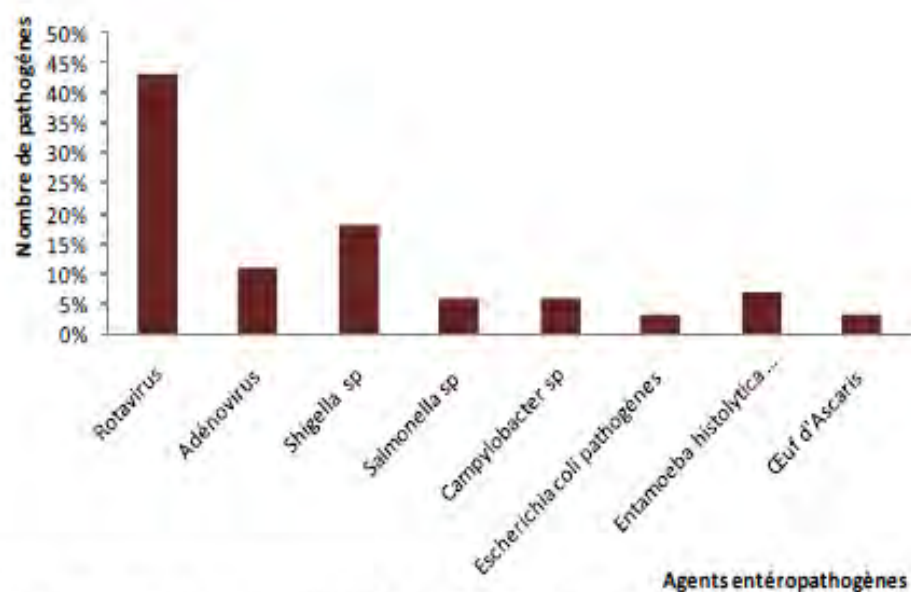


Figure 1 : Répartition des agents entéropathogènes identifiés dans les selles

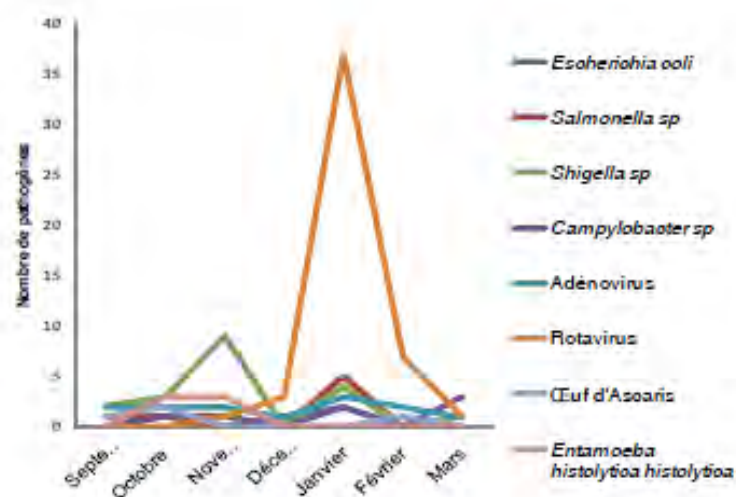


Figure 2 : Variations mensuelles du nombre de cas par pathogène pendant la durée de l'étude

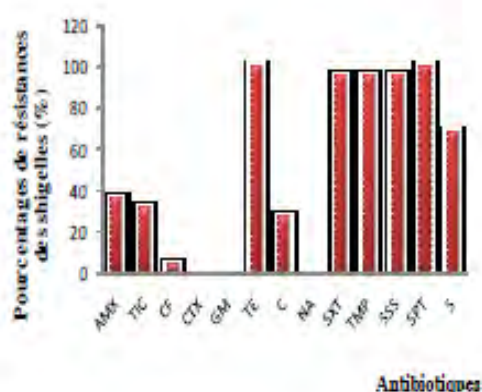


Figure 3 : Résistance des shigelles aux antibiotiques

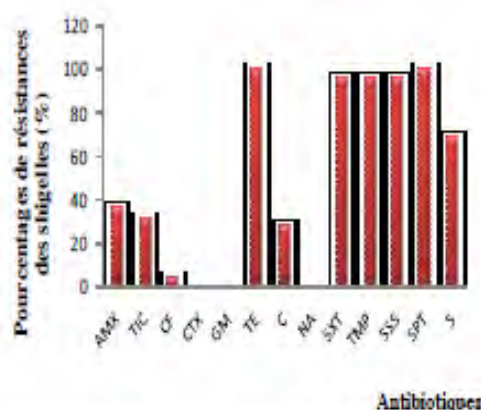


Figure 4 : Résistance des salmonelles aux antibiotiques

Résultats des antibiogrammes

D'après les résultats des antibiogrammes (Figure 3), les souches de shigelles isolées étaient très résistantes aux tétracyclines (100%), aux sulfamides et au triméthoprim (96%), à la spectinomycine (100%) et à la streptomycine (73%). Les souches de *Shigella flexneri* 2a étaient parmi les plus résistantes, notamment à l'amoxicilline (100%), à la ticarcilline (84%), au chloramphénicol (100%). Une souche de *Shigella boydii* a été isolée au cours de l'étude. Cette souche était aussi résistante à la fois à l'amoxicilline, à la ticarcilline et à la céfalotine. En revanche, aucune souche de shigelle n'était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération ni aux fluoroquinolones. Sur les antibiogrammes, les souches de salmonelles étaient résistantes à la plupart des antibiotiques (Figure 4) : *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Waycross qui étaient résistantes à l'amoxicilline, à la ticarcilline, aux tétracyclines, aux sulfamides et à la

streptomycine. Quant aux souches de *Salmonella* Chester, une sur les deux était résistante à la tétracycline, à l'acide nalidixique, aux sulfamides et à la streptomycine ; les deux étaient résistantes à la spectinomycine. *Salmonella* Enteritidis était résistante à l'acide nalidixique. L'acide nalidixique est un marqueur de la résistance aux quinolones chez *Salmonella* : les souches de salmonelles résistantes à l'acide nalidixique, résistent également à l'ensemble des quinolones. Cependant, aucune souche de salmonelle n'était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération, ni aux phénicolés.

DISCUSSION

Dans ce travail les étiologies des diarrées aiguës survenant chez des enfants de moins de 5 ans ont été recherchées et la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques a été testée. La population d'étude était très jeune car 65% des enfants étaient âgés de moins de 18

mois. Les selles les plus fréquemment rencontrées étaient liquides et glaireuses (76%). Les agents entéropathogènes étaient essentiellement représentés par les virus 54% (64/119), les bactéries 34% (40/119) et enfin les parasites 13% (15/119). La répartition des agents pathogènes varie selon le climat et le niveau d'hygiène. La prééminence des étiologies virales dans notre étude, notamment les rotavirus 27% (51/190) concorde avec les travaux de Carraturo [12]. Des résultats similaires ont été rapportés au Nigéria (18%) [13]. Ces infections surviennent sur un mode épidémique et saisonnier, notamment dans les collectivités, et en général pendant la saison fraîche ou sèche des pays chauds et pendant l'hiver dans l'hémisphère nord [3,13]. Vu le fort taux de prévalence des rotavirus chez les enfants de moins de 5 ans au Sénégal, le vaccin contre les Rotavirus devrait être inclus dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV). Le taux relativement faible de parasitoses intestinales relevé dans cette étude pourrait être dû aux différentes campagnes de déparasitage réalisées régulièrement par le Ministère de la Santé. Bien que les protocoles de coproculture ne favorisent pas leur détection, les shigelles sont le pathogène bactérien le plus fréquemment isolé, devant les salmonelles et les *Campylobacter* 12% (22/190). L'espèce la plus fréquente est *Shigella flexneri* (73%), suivie de *Shigella sonnei* (23%) et de *Shigella boydii* (4%). *Shigella dysenteriae* est un sérotype épidémique et c'est aussi pour cette raison que l'espèce la plus fréquemment retrouvée a été *Shigella flexneri* car nous n'étions

pas dans un contexte épidémique. *Shigella flexneri* a un mode de diffusion plus endémique qu'épidémique et apparaît lorsque le niveau d'hygiène s'élève contrairement à *Shigella dysenteriae* [14]. Les sérotypes dominants de *Shigella flexneri* ont été *Shigella flexneri* 1b et *Shigella flexneri* 2a. Ce dernier est le sérotype le plus fréquemment rencontré en Inde et dans beaucoup de pays en voie de développement [15]. En revanche, *Shigella sonnei* prédomine dans les pays développés [15]. Dans cette étude, les résistances aux antibiotiques retrouvées pour les shigelles sont classiques et déjà connues. En effet, de nombreux travaux ont montré le haut niveau de résistance de ces souches aux familles d'antibiotiques que sont les β -lactamines, les cyclines, les sulfamides et les phénicolés. Nous notons cependant une émergence de la résistance aux quinolones chez les souches de salmonelles. Les 6 souches de *Shigella flexneri* 2a étaient plus résistantes que les autres sérotypes du fait qu'elles incluaient des résistances à l'amoxicilline (100%), au chloramphénicol (100%) et à la ticarcilline (84%). Ces taux de résistance des shigelles aux antibiotiques confirment le travail de plusieurs auteurs au Sénégal et en Centrafrique [16,17]. Cette multirésistance observée depuis plusieurs années est due à une forte pression de sélection liée à une utilisation non contrôlée de ces antibiotiques en médecine humaine au Sénégal [18]. Les cinq souches de *Shigella sonnei* étaient sensibles à la plupart des antibiotiques ce qui correspond aux résultats obtenus dans une étude

faite en Centrafrique [17]. La souche de *Shigella boydii* présentait une résistance à la céfalotine indiquant la présence de céphalosporinase de bas niveau. Aucune souche n'était résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération, aux aminosides (excepté streptomycine qui est un antibiotique couramment utilisé au Sénégal) et aux quinolones. Les résistances à ces deux classes d'antibiotiques seraient médiées par des intégrons portés ou aux plasmides, dans lesquels ces gènes de résistance seraient insérés dans des cassettes [10].

Dans cette étude, les salmonelles étaient moins fréquentes que les shigelles 4% (7/190), mais paraissaient plus résistantes que ces dernières. Les souches de salmonelles isolées étaient toutes non typhiques. Les infections à salmonelles étaient liées à la consommation d'aliments. Ce qui implique la nécessité de faire une surveillance microbiologique des aliments destinés à la consommation pour éviter d'éventuelle épidémies et aussi l'émergence de souches résistantes d'origine alimentaire [9, 11]. Le sérotype le plus fréquent était *Salmonella* Chester et compte tenu du faible nombre de souches isolées, la répartition des sérotypes n'avait pas de valeur épidémiologique. Cependant, *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium ont été isolées, sachant que ces sérotypes sont les plus fréquemment retrouvés à travers le monde [19]. Comme les shigelles, la plupart des salmonelles isolées dans cette étude étaient résistantes aux antibiotiques tels que l'amoxicilline, la ticarcilline,

les tétracyclines, les sulfamides et les aminosides. Seule une souche de *Salmonella* Typhimurium montrait des résistances à l'acide nalidixique. Cette résistance des salmonelles aux antibiotiques recommandés par l'OMS s'étend progressivement dans de nombreux pays en voie de développement [11, 20, 21.]. Quant à la prévalence des *Campylobacter*, elle était de 4% (7/190) ce qui correspondait à la situation dans d'autres pays en voie de développement où elle varie entre 5 et 20% [7]. Le pourcentage de *Campylobacter* était similaire à celle des salmonelles confirmant l'émergence des souches d'origine alimentaire et la nécessité de faire une surveillance. Une seule espèce a été isolée, à savoir *Campylobacter jejuni* qui était la plus fréquemment rencontrée. Les outils moléculaires seront d'un apport non négligeable pour mieux évaluer le poids de ce pathogène dans les étiologies des diarrhées [22].

Dans notre étude nous n'avons utilisé que le sérogroupage qui ne donne qu'une indication partielle du pouvoir pathogène des souches de *Escherichia coli*. Les trois sérogroupes identifiés étaient O111, O124 et O126 regroupant au total quatre souches de *Escherichia coli* entéropathogènes. Le sérotype O157:H7 n'a pas été isolé.

CONCLUSION

Dans notre étude la répartition des étiologies virales (54%), bactériennes (34%) et parasitaires (12%) était conforme à la littérature. L'étude de la

dynamique des rotavirus dans le temps montrait leur prédominance en saison fraîche, avec un pic au mois de janvier, ce qui était classique. Cependant on avait noté une émergence de la résistance aux quinolones (29%) chez *Salmonella*. Les céphalosporines de 3^{ème} génération restaient encore efficaces pour le traitement des shigelloses, des salmonelloses et des campylobactérioses.

REFERENCES

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012; 379: 2151-61 doi: 10.1016/S0140-6736(12) 60560-1 PMID: 22579125.
2. Fischer Walker CL, Perin J, Aryee MJ, Boschi-Pinto C, Black RE. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BMC Public Health*. 2012 ; 12: 220- doi: 10.1186/1471-2458-12-220 PMID: 22436130.
3. Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhoea. *Emerg Infect Dis*. 2006 ;12:304-306.
4. Ndir I, Gaye A, Sy M, Gaye O, Ndir O. Prévalence des parasitoses intestinales au centre de santé Roi Baudouin de Guediawaye (Sénégal). *Dakar Méd*. 2002 ;47(2):172-175.
5. Diallo A, Diop MB, Gueye MM, Etard JF. Investigation d'une épidémie de shigellose en zone rurale au Sénégal. *Cahiers d'études et de recherches francophones / santé*. 2001;11:217-219.
6. Enwere G, Biney E, Cheung YB, Zaman SM, Okoko B, Oluwalana C, Vaughan A, Greenwood B, Adegbola R, Cutts FT. Epidemiologic and clinical characteristics of community-acquired invasive bacterial infections in children aged 2-29 months in The Gambia. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(8):700-705.
7. Oberhelman RA, Taylor DN. Campylobacter infections in developing countries. In: Nachamkin I, Blaser M.J., editors. *Campylobacter*, 2nd edition. Washington: Am Soc Microbiol. 2000;139-53.
8. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis*. 1987;155:377-389.
9. Gassama-Sow A, Aidara-Kane A, Raked N, Denis F, Ploy MC. Integrons in *Salmonella* Keurmassar, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1339-1341.
10. Gassama-Sow A, Diallo MH, Boye CS, Garin B, Sire JM, Sow AI, Aidara-Kane A. Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. *Int J Antimicrob Ag*. 2006;27(3):267-270.

11. Cardinale E, Colbachini P, Perrier-Gros-Claude JD, Gassama A, Aïdara-Kane A. Dual Emergence in Food and Humans of a Novel Multiresistant Serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype. J Clin Microbiol. 2001;39(6):2373-2374.
12. Carraturo A, Catalani V, Tega L. Microbiological and epidemiological aspects of Rotavirus and enteric Adenovirus infections in hospitalized children in Italy. The New Microbiol. 2008;31(3):329-336.
13. Aminu M, Ahmad AA, Umoh JU. Rotavirus infection in four states in north-western Nigeria. Niger J Med. 2008;17(3):285-290.
14. Emch M, Ali M, Yunus M. Risk areas and neighborhood-level risk factors for *Shigella dysenteriae* 1 and *Shigella flexneri*. Health Place. 2008;14(1):96-105.
15. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull. WHO. 1999;77:651-666.
16. Sire JM, Macondo EA, Perrier-Gros-Claude JD, Siby T, Bahsoun I, Seck A, Garin B. Antimicrobial resistance in *Shigella* species isolated in Dakar, Senegal (2004-2006). Jpn J Infect Dis. 2008;61:307-309.
17. Bercion R, Njuimo SP, Boudjeka PM, Manirakiza A. Distribution and antibiotic susceptibility of *Shigella* isolates in Bangui, Central African Republic. Trop Med Int Health. 2008;13(4):468-471.
18. Gassama-Sow A, Aïdara-Kane A, Barraud O, Gatet M, Denis F, Ploy MC. High prevalence of trimethoprim resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. J. Infect. Dev. Ctries (JIDC). 2010; 4(4):207-212.
19. Galanis E, Lo Fo Wong DM, Patrick ME, Binsztejn N, Cieslik A, Chalermchikit T, Aïdara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. Emerg Infect Dis. 2006;12:381-388.
20. Kariuki S, Gilks C, Corkill J, Kimari J, Benea A, Waiyaki P, Hart CA. Multi-drug resistant non-typhi salmonellae in Kenya. British Soc Antimicrob Chem. 1996;38:425-434.
21. Sire JM, Garin B, Macondo EA. Low-level resistance to ciprofloxacin in non-Typhi *Salmonella enterica* isolated from human gastroenteritis in Dakar, Senegal (2004-2006). Int J Antimicrob Agents 2008a;31:581-592.
22. Kulkarni SP, Lever S, Logan JMJ, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. J Clin Pathol. 2002;55:749-753.

Article 2:

Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal

Jean-Marie Sire^{1,2}, Benoit Garin^{2,3}, Loïc Chartier⁴, Ndeye Khota Fall², Adama Tall⁵, Abdoulaye Seck², François-Xavier Weill⁶, Sébastien Breurec², Muriel Vray⁴

¹Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, Poissy, France, ²Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur, Dakar, Senegal, ³Laboratoire de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur, Tananarive, Madagascar, ⁴Unité d'Epidémiologie des Maladies Émergentes, Institut Pasteur, Paris, France, ⁵Service d'Epidémiologie, Institut Pasteur de Dakar, Senegal, ⁶Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, Institut Pasteur, Paris, France

Background: In sub-Saharan Africa, infectious diarrhoea is a major cause of childhood morbidity and mortality. A cross-sectional study was undertaken to document the pathogens potentially involved in community-acquired childhood diarrhoea in Dakar, the capital of Senegal.

Methods: Between September 2007 and March 2008, 176 children aged 1 month to 5 years were recruited consecutively from a primary health care institution in an urban area. Clinical data were recorded and stool samples were collected. Bacterial pathogens were identified using conventional methods and/or PCR assays. Rotaviruses and adenoviruses were detected by a rapid immunochromatographic test. Intestinal parasites were diagnosed by microscopy.

Results: Rotavirus was the most common enteric pathogen, detected in 27% of patients, followed by Shigella (12%), diarrhoeagenic *Escherichia coli* (8%), enteric adenovirus (8%), Salmonella (4%), *Campylobacter jejuni* (3%) and *Plesiomonas shigelloides* (2%). Mixed bacterial/viral infections were detected in 6% of cases. Parasites, mostly protozoa, were detected in 14% of children. Using ipaH PCR, 30% of samples were positive for Shigella/entero-invasive *E. coli*. Detection of rotavirus was more frequently associated with younger age groups (<24 months), whereas bacterial diarrhoea was isolated more often in children over 1 year of age. Detection of bacterial pathogens was significantly associated with malnutrition. Antibiotics were prescribed for 77% of children who attended for consultation. No pathogen was found in 36% of them, whereas a virus was detected without any other associated bacterial or parasitic pathogen in 23% of patients.

Conclusion: In developing countries, there is a need to develop reliable, easy-to-use, inexpensive rapid diagnostic tests to guide the management of diarrhoea in infants and children and thereby prevent over-use of antimicrobial agents.

Keywords: Infectious diseases, Community-acquired diarrhoea, Children, Dakar, Senegal

Introduction

Infectious diarrhoea remains a major cause of morbidity and mortality in developing countries, particularly in children. It has been estimated that in 2010 it accounted for 0.801 million deaths worldwide in children under 5 years. Between 2000 and 2010, deaths from childhood diarrhoea decreased by 0.309 million.¹ However, the morbidity has not declined, especially in Africa, probably because risk factors

(poor hygiene, lack of access to potable water, insufficient promotion of breastfeeding and malnutrition) still prevail.² The continued growth of many major African cities with resulting overcrowding may also contribute to outbreaks of diarrhoea to which children are particularly vulnerable. Data are needed in these urban areas to establish the local epidemiology and implement appropriate preventive measures. We report a cross-sectional study undertaken in a dispensary in central Dakar in order to detect the pathogens and clinical characteristics of community-acquired infantile diarrhoea.

Correspondence to: J-M Sire, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Poissy-Saint-Germain-en-Laye, 78300 Poissy, France. Fax: +33 1 39 27 44 15; email: jmsire@chi-poissy-st-germain.fr

Subjects and Methods

Patients

Between September 2007 and March 2008, children aged 1 month to 5 years with acute diarrhoea were enrolled consecutively from the Saint-Martin dispensary, a Catholic mission-run primary health care organisation for maternal/child health in Rebeuss, a poor and densely populated district of central Dakar. Children enrolled had had at least three stools (aqueous, slimy/mucous or bloody) per day, symptoms for <7 days, and had not received any antibiotic treatment during the previous 7 days. Clinical examination was undertaken after taking a history from the parents or guardians. Information recorded included age, weight, duration of diarrhoea, symptoms of dehydration, vomiting, number and consistency of stools, and non-specific medication received within the previous week. Growth status was expressed separately for males and females by weight-for-age Z-scores (WAZ).³ Moderate or severe malnutrition was defined as WAZ ≤ -2 . Treatment received from the dispensary was recorded. Data were collected by nurses using a case research form (CRF).

Ethical considerations

Informed consent was obtained from the children's parents or guardians. The study protocol was approved by the Senegalese Health Research National Council.

Laboratory methods

Stool samples were collected in a sterile plastic vial. A wet smear was microscopically examined for intestinal protozoa trophozoites. Stool samples were delivered within 2 hours to the laboratory of the Institut Pasteur for subsequent processing. A portion of stool was concentrated by the mercuric iodine formaldehyde concentration technique and examined for helminth eggs and protozoa cysts.⁴ A rapid chromatographic immune-assay detecting simultaneously rotaviruses and enteric adenoviruses was performed (VIKIA Rota-Adeno, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Stool specimens were inoculated on to Hektoen Enteric agar (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) to isolate *Salmonella* and *Shigella* species, and bromocresol purple lactose agar (BCP) (Becton-Dickinson) to isolate *E. coli* and other Gram-negative bacteria. Preston broth medium made in the laboratory was inoculated to enrich *Campylobacter* species and subcultured onto Karmali selective agar (Oxoid, Basingstoke, England).⁵ Muller-Kauffmann tetrathionate broth (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used to enrich *Salmonella* and subcultured on to Rambach agar (Merck, Darmstadt, Germany). Serogrouping and serotyping of *Shigella* isolates were conducted with commercial antisera

(Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark and Denka-Seiken, Tokyo, Japan, respectively). *Salmonella* isolates were serotyped according to the Kauffmann-White scheme using commercial antisera (Statens Serum Institut).⁶ Antibigrams were performed by the disc diffusion technique according to the guidelines of the Antibigram Committee of the French Society for Microbiology (CASFM). *E. coli* ATCC 25922 was used as the control strain. *Vibrio cholerae* was not investigated because there were no reported outbreaks during the study duration.

To improve assessment of the real involvement of *Shigella* in diarrhoea, stool samples were stored at -20°C for subsequent testing by PCR assay based on amplifying the invasion plasmid antigen H (*ipaH*) gene, contained in the four *Shigella* species, as well as in enteroinvasive *E. coli* (EIEC).⁷ *Shigella flexneri* serotype 5 wild-type strain M90T was used as control strain for *ipaH* PCR. Prior isolation of bacterial DNA was performed using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Strains previously identified as *E. coli* using the API20E gallery (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) were screened with a single-test multiplex PCR for the presence of 12 genes to differentiate between the six currently recognised diarrhoeagenic *E. coli* pathotypes.⁸ These pathotypes include enteropathogenic *E. coli* (EPEC), atypical EPEC (ATEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and entero-aggregative *E. coli* (EAEC). Atypical EPEC (ATEC) strains harbour the LEE (locus of enterocyte effacement) as EPEC strains, but not the EAF (EPEC adherence factor). Simultaneous detection of the *E. coli*-specific *uidA* gene was used to confirm biochemical identification of the isolate as *E. coli*, and to serve as PCR control.⁸

Statistical analysis

The study population was described as mean (SD) or median [interquartile range] for continuous variables and as percentages for discrete variables. The relationship between clinical variables and pathogens were analysed using Fisher's Exact test. A test for trend across ordered variables was used to assess relationships between the different pathogens and patient age. Statistical analysis was performed using the STATA 11 software.

Results

Population

Between September 2007 and March 2008, 176 children were recruited consecutively to the study (Table 1). Fifty-five per cent were male, and the median age was 13 months [IQR 8, IQR 20]. Thirty-six per cent were malnourished (Z-score ≤ -2). The median number of stools per day was four [IQR 3,

Table 1 Characteristics of the 175 children enrolled in the study

Characteristics	n (%)
Male	97 (55)
Age, mths*	13 (8, 20)
Z-score*	-1.3 [-2.6, -0.4]
≤ -2 (19 missing)	56 (36)
Duration of diarrhoea*, days	3 (3, 6)
Number of stools per day*	4 (3, 5)
Received previous ORS† therapy (13 missing)	33 (20)
Received previous non-specific medication (1 missing)	41 (23)
Received one or more antibiotics in consultation (36 missing)	108 (77)
Body temperature ≥ 38°C (8 missing)	50 (30)
Symptoms of moderate dehydration (14 missing)	96 (59)
Vomiting (19 missing)	96 (61)
Abdominal pain (35 missing)	59 (42)
Blood in stool	20 (11)

* Median [IQR]; † oral rehydration salts.

IQR 5]. Before attending the dispensary, 20% of children had received oral rehydration salts (ORS), and 23% had received non-specific anti-diarrhoeal agents (e.g. smectite), anti-motility agents (e.g. loperamide), anti-helminthic agents (e.g. albendazole) or medicinal plants (e.g. guava leaves). Temperature was ≥ 38°C in 30% of cases, there were clinical signs of moderate dehydration (two or more signs of the following: restlessness, sunken eyes, thirst and positive skin pinch test) in 59%, vomiting in 61%, and abdominal pain in 42%. None had severe dehydration. Blood was detected macroscopically in 11% of stool samples.

Pathogens

At least one of the sought-for pathogens was identified in 105 (60%) children, two pathogens were identified in 25 children, three in two children and four in one child. Bacterial and viral pathogens were detected in 48 (27%) and 55 (31%) stools, respectively, while parasitic elements were detected in 25 (14%) samples. Mixed bacterial/viral infections were detected in 11 (6%) children.

The pathogens identified in stool samples are shown in Table 2. Rotavirus was the most prevalent pathogen, detected in 46 (27%) stools, 33 (72%) of them in January. The presence of rotavirus was significantly related to vomiting (43% of children with rotavirus had vomiting vs 10% of those without rotavirus, $P < 0.001$), absence of blood in stool (0 vs 30%, $P = 0.002$), and normal body temperature (32% vs 8%, $P = 0.001$), but not to clinical signs of dehydration (27% vs 29%, $P = 0.78$). Enteric adenovirus was found in 13 (8%) patients.

Shigella was isolated from 21 stools (12%). Sixteen were identified as *Shigella flexneri*, four as *Shigella sonnei* biotype g, and one as *Shigella boydii* serotype 2. Among the 16 isolates of *S. flexneri*, six belonged to the serotype 2a, six to the serotype 1b, three to the serotype 4a, and one to the serotype 3a. Most of the *Shigella* isolates were resistant to cotrimoxazole

(overall resistance rate 95%). Rates of resistance of *S. flexneri* strains to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, ticarcillin and chloramphenicol were 44%, 44%, 44% and 37%, respectively, whereas all *S. sonnei* strains were susceptible to these antibiotics. All *Shigella* strains were susceptible to third-generation cephalosporins (cefotaxime) and quinolones (nalidixic acid, ciprofloxacin). Non-typhi *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* and *P. shigelloides* were isolated from seven (4%), six (3%) and three (2%) stool specimens, respectively. All *Salmonella* strains were resistant to cotrimoxazole but remained susceptible to aminopenicillins, first- and third-generation cephalosporins, chloramphenicol and quinolones.

The *ipaH* gene was detected in all 21 *Shigella* culture-positive specimens and in 30/148 (20%) culture-negative specimens (DNA amplification failed in seven stools). Since recent advances have confirmed that EIEC and *Shigella* should be considered a single pathotype of *E. coli*, 51/169 (30%) samples could be finally considered positive for the entity *Shigella*/EIEC.⁹ Presence of *Shigella*/EIEC was

Table 2 Enteric pathogens detected in 175 children aged <5 years attending Saint-Martin Dispensary

Cause	Pathogen	n (%)
Bacteria	Diarrhoeagenic <i>E. coli</i>	14 (8)
	EPEC	6
	EAEC	4
	ATEC	2
	ETEC	2
	<i>Shigella</i> spp.	21 (12)
	<i>S. flexneri</i>	16
	<i>S. sonnei</i>	4
	<i>S. boydii</i>	1
	<i>Salmonella</i> spp.	7 (4)
Viruses*	<i>Campylobacter jejuni</i>	6 (3)
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3 (2)
	Rotavirus	46 (27)
	Adenovirus	13 (8)
Parasites	<i>Giardia lamblia</i>	15 (9)
	<i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	8 (5)
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	4 (2)
	<i>Trichuris trichiura</i>	1 (<1)

* Data missing for five patients.

Table 3 Distribution of identified pathogens according to age

Organism	Age group, mths	No. (%) of children infected	P-value
Rotavirus (n=46)	0-12	29/81 (36)	<0.01
	13-24	15/59 (25)	
	25-60	2/31 (6)	
Bacteria* (all species) (n=48)	0-12	18/85 (21)	0.03
	13-24	17/60 (28)	
	25-60	13/31 (42)	
Shigella spp* (n=21)	0-12	4/85 (5)	<0.01
	13-24	10/60 (17)	
	25-60	7/31 (23)	
Shigella/EIEC† (n=51)	0-12	17/80 (21)	<0.01
	13-24	20/58 (34)	
	25-60	14/31 (45)	
Diarrhoeagenic <i>E. coli</i> ‡ (n=14)	0-12	9/85 (11)	0.17
	13-24	4/60 (7)	
	25-60	1/31 (3)	
Parasites (n=25)	0-12	7/85 (8)	0.01
	13-24	10/60 (17)	
	25-60	8/31 (26)	

* Identified by culture; † determined by ipaH PCR; ‡ selected by culture and confirmed by multiplex PCR.

significantly associated with blood in the stool (84% vs 23%, $P<0.001$) and tended to be associated with fever (40% vs 27%, $P=0.10$).

Diarrhoeagenic *E. coli* were detected in 14 children (8%): EPEC (6 isolates), EAEC (4 isolates), ATEC (2 isolates), ETEC (2 isolates). Neither STEC nor EIEC was detected.

Parasitic agents were detected in 25 (14%) children, namely *Giardia lamblia* (15 patients), *Entamoeba histolytica*/Entamoeba dispar (8), *Ascaris lumbricoides* (4) and *Trichuris trichiura* (1). One patient harboured three different parasites.

Factors associated with pathogens

Table 3 shows the distribution of pathogens amongst the three age groups, 0-12, 13-24 and 25-60 months, respectively. The prevalence of rotavirus was significantly higher in children aged 0-24 months than in those over 24 months (31% vs 6%, $P<0.01$). Conversely, bacterial pathogens, when considered all together, were significantly less frequent in those aged 0-24 months than in those over 24 months (24% vs 42%, $P=0.04$). This was particularly so for Shigella. Distribution of diarrhoeagenic *E. coli* strains was not significantly different between the age groups. The prevalence of parasites increased significantly with age. The distribution of pathogens according to nutritional status is shown in Table 4. Moderate or

severe malnutrition was significantly related to detection of bacterial pathogens considered as a whole ($P=0.04$). No significant association was found between rotavirus infection and malnutrition ($P=0.14$), nor between parasitic detection and malnutrition ($P=0.94$).

Therapeutic management

Among the 140 children for whom treatment prescribed in consultation was documented, 108 (77%) had received antibiotics. Fifty-seven (53%) had received one antimicrobial agent, 38 (35%) two, 9 (8%) three and 4 (4%) up to four different antimicrobial agents. One hundred and six (76%) children received metronidazole for presumed intestinal protozooses, 82 of whom (77%) also received one or more antibiotics. The most frequently prescribed antibiotics among documented patients were ceftriaxone (51%) and gentamicin (11%) by the IM route, and oral amoxicillin/clavulanic acid (26%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (16%). Among the 108 children treated with antibiotics, no potential pathogen was found in 39 patients (36%) [in 26 patients (24%) if we consider results for the detection of Shigella/EIEC by PCR]. A virus was detected without any other associated bacterial or parasitic pathogen in 25 cases (23%). ORS was prescribed for only six patients.

Table 4 Distribution of identified pathogens according to nutritional status (n=157, 19 missing values)

Organism	Normal nutritional status, n=101 (%)	Malnourished, n=56 (%)	P-value
Rotavirus (n=42)	31/98 (32)	11/54 (20)	0.14
Bacteria* (all species) (n=41)	21/101 (21)	20/56 (36)	0.04
Shigella spp* (n=17)	8/101 (8)	9/56 (16)	0.12
Shigella/EIEC† (n=42)	24/97 (25)	18/53 (34)	0.23
Diarrhoeagenic <i>E. coli</i> ‡ (n=13)	5/101 (5)	8/56 (14)	0.07
Parasites (n=22)	14/101 (14)	8/56 (14)	0.94

* Identified by culture; † determined by ipaH PCR; ‡ selected by culture and confirmed by multiplex PCR. Normal nutritional status was defined as weight-for-age Z-score >-2 , moderate or severe malnutrition as weight-for-age Z-score ≤ -2 .

Discussion

Since this was not a case-control study, pathogens detected should be considered only as potential pathogens. Nevertheless, it enabled evaluation of the relative importance of different diarrhoeagenic agents in a population of young children living in an urban district of a major West African city.

Rotavirus is a leading cause of severe acute diarrhoea in children under 5 years of age in Africa,¹⁰ and thus, unsurprisingly, rotavirus was the pathogen most commonly found in this population. A peak in frequency, probably an indicator of an epidemic, was observed in January, one of the coolest and driest months in Dakar. This high frequency during the dry season is consistent with previous studies in neighbouring countries.^{11,12} Detection of rotavirus was more frequently associated with younger age (<24 months). There is evidence that the incidence of rotavirus infection decreases with age because effective immunity conferred by repeated infections develops gradually.¹³ Moreover, protection against rotavirus is conferred primarily by secretory IgA antibodies located on the surface of the intestinal mucosa. Therefore, maternal antibodies may confer only limited protection against rotavirus during the first months of life. The presence of caliciviruses (i.e. noroviruses and sapoviruses) was not tested in this study. Nevertheless, it is likely that they were involved in some of the cases. Indeed, a recent study in Dakar children hospitalised for acute gastroenteritis found an 8% prevalence of caliciviruses.¹⁴

Shigella is a major public health concern in developing countries, particularly in children,¹⁵ and was detected by culture in 21 samples (12%). Its prevalence (identified by conventional culture) is comparable with that found in Dakar in 1993–1994 (11%).¹⁶ If, however, we consider the *ipaH* PCR results, 51 samples were positive for Shigella/EIEC, thus increasing the total percentage of positive stools from 12% to 30%. Shigella could therefore be considered the most frequently recovered pathogen, suggesting that the true incidence of Shigella in childhood diarrhoea in developing countries may be largely underestimated in studies using only conventional culture techniques. *S. flexneri* was the most commonly isolated species in our patients, whereas *S. sonnei* was detected less frequently. In contrast with industrialised countries, the predominance of *S. flexneri* over *S. sonnei* is common in developing countries and has been linked to poor hygiene.¹⁷ The low number of Shigella isolates limits the significance of antimicrobial susceptibility data. However, the study confirmed a recent report showing that resistance of Shigella to first-line antimicrobials (amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, chloramphenicol, rimethoprim-sulfamethoxazole) is common in Dakar.¹⁸

In contrast, the latter and this study showed that third-generation cephalosporins and quinolones remained effective.

It is well established that diarrhoeagenic *E. coli* pathotypes are a major cause of diarrhoea in Africa, especially in children.² Nevertheless, this aetiology is largely unrecognised because few laboratories are able to perform the appropriate identification techniques (i.e. molecular techniques and/or adherence assays). In this study, typical EPEC was the most frequently recovered pathotype (six strains). In addition, two strains of atypical EPEC (ATEC) were detected. EAEC and ETEC pathotypes were also detected (four and two strains, respectively), in contrast with STEC and EIEC which were not detected.

Campylobacter is a major cause of childhood diarrhoea in developing countries, especially in children under 2 years of age.¹⁹ We found this pathogen in 3% of cases, a result consistent with prevalences reported in previous studies in West Africa.^{12,20}

Diarrhoea associated with bacteria, particularly Shigella, affected children over 1 year of age more commonly. This might be explained by the protection conferred by maternal antibodies during the 1st year of life. We found no particular association with age for diarrhoeagenic *E. coli*. The relationship between malnutrition and severity of diarrhoea is well recognised, especially because of the immune system deficiency caused by inadequate intake of micronutrients such as zinc.²¹ In this study, the detection of bacterial pathogens was significantly associated with malnutrition but not with the detection of rotavirus and parasites.

Parasitic agents were mainly protozoa (*Giardia lamblia*, *E. histolytica*/*E. dispar*), while helminth eggs were rarely detected. This low prevalence of helminthiasis may be owing to the young age of the children. A study in Senegal in 2002 showed that the rate of helminth infestation was highest in children between 11 and 15 years of age.²² The prevalence of parasites (both protozoa and helminths) in this study also tended to increase with age. Another reason for this low prevalence of helminths in this population might be that a number of children had received anti-helminthics before coming for consultation. It is noteworthy that we did not investigate for *Cryptosporidium* species in our study. This pathogen was significantly associated with childhood diarrhoea in West Africa.²³

The majority of children presented with signs of mild or moderate dehydration. No cases of severe dehydration were recorded, probably because they were directly hospitalised in paediatric wards.

Of those children with documented antibiotic treatment prescribed in consultation, a virus (rotavirus

or adenovirus) was detected without any other associated pathogen in 23% of cases. Moreover, no pathogen was found in 36% of children. Although this rate could be reduced to 24% when the results of PCR *ipaH* for detecting *Shigella* are considered, antibiotic treatment was unnecessary in approximately half of the cases. This over-use of antibiotics is of concern because it promotes the emergence of antibiotic resistance. It also represents a significant cost to families.

This report underscores that accurate evaluation of pathogens in childhood diarrhoea in developing countries requires the integration of advanced methods that complement existing tools. Moreover, it highlights the need for primary health care facilities to perform certain simple tests that assess the appropriateness of antibiotic treatment. Microscopic examination of stools can be undertaken easily if staff are trained in basic parasitology. At the same time, however, simple, reliable and inexpensive diagnostic tools for detecting other pathogens, especially bacteria, are needed. Immunochromatographic tests (dipsticks) are being developed for *S. flexneri* 2a and *S. dysenteriae* 1.^{24,25} These tools, although promising, require further evaluation in routine practice. They also need to be developed for other pathogens, particularly other species of *Shigella* and diarrhoeagenic *E. coli*.

Acknowledgment

The authors thank Natasha Dubois-Cauwelaert, Alice Dufougeray and Fatou Bintou Dièye for technical help.

References

1. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379:2151–61.
2. Okeke IN. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3:417–42.
3. Kuzmarki RJ, Ogden CI, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, Mei Z, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat II*. 2002;246:1–190.
4. Blagg W, Schloegel EI, Maitour NS, Khalaf GI. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg*. 1955;1:23–8.
5. Bolton FJ, Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J Clin Pathol*. 1982;35:462–7.
6. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th edn. Paris: Institut Pasteur; 2007. Available from: <http://www.pasteur.fr/ip/portail/action/WebdriveActionEvent?id01s-000036-089>.
7. Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect Dis*. 1993;167:458–61.
8. Müller D, Giese L, Henss G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:3380–90.
9. Lan R, Allen MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun*. 2004;72:5080–8.
10. Waggle Z, Hawkrig A, Husey GD. Review of rotavirus studies in Africa: 1976–2006. *J Infect Dis*. 2010;202(suppl): 23–33.
11. Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, Byam P, Shenton F, Sanders RC, et al. Epidemiology of rotavirus in a periurban Gambian community. *Ann Trop Paediatr*. 1987;7:238–43.
12. Motbak K, Wested N, Højlyng N, Schentz F, Gotfredsen A, Aaby P, et al. The etiology of early childhood diarrhea: a community study from Guinea-Bissau. *J Infect Dis*. 1994;169:581–7.
13. Velázquez FR, Matava DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med*. 1996;335:1022–8.
14. Ka R, Diop A, Dia ML, Diop D, Sow AI, Cissé MF. Calicivirus gastroenteritis in children hospitalized in Dakar. *Med Mal Infect*. 2011;41:108–9.
15. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull WHO*. 1999;77:651–66.
16. Gassama A, Boye CS, Aidara A, Raphenson G, Sam A, Mhoup S. *Shigella* in Senegal (1993–1994): distribution by serotype, antibiotic sensitivity and virulence. *Med Mal Infect*. 1997;27:267–70.
17. World Health Organization. Antimicrobial Resistance in *Shigellosis*, Cholera and *Campylobacteriosis*, 2001. Available from: http://www.who.int/drugresistance/Antimicrobial_resistance_in_shigellosis_cholera_and_cam.pdf
18. Sire JM, Macondo EA, Perres-Gros-Claude JD, Sily T, Bahaoun I, Seck A, et al. Antimicrobial resistance in *Shigella* species isolated in Dakar, Senegal (2004–2006). *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:307–9.
19. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Ohi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:237–44.
20. Koulla-Shah S, Loe C, Ekoe T. Prevalence of *Campylobacter* enteritis in children from Yaounde (Cameroon). *Cent Afr J Med*. 1995;41:91–4.
21. Podewils LJ, Mintz ED, Nataro JP, Parashar UD. Acute, infectious diarrhea among children in developing countries. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15:155–68.
22. Ndir I, Gaye A, Sy M, Gaye O, Ndir O. Prevalence of intestinal parasites at the King Baudouin health center of Guédiawaye (Senegal). *Dakar Med*. 2002;47:168–71.
23. Oplatan JA, Newman MJ, Ayeh-Kumi PF, Afrim R, Gepi-Atee R, Sevilleja JE, et al. Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:336–43.
24. Naro F, Phalipon A, Nguyen TL, Diop TT, Sansonetti P, Gernani Y. Dipstick for rapid diagnosis of *Shigella flexneri* 2a in stool. *PLoS One*. 2007;2:e361.
25. Taneja N, Naro F, Darveville S, Sire JM, Garin B, Thi Phuong LN, et al. Dipstick test for rapid diagnosis of *Shigella dysenteriae* 1 in bacterial cultures and its potential use on stool samples. *PLoS One*. 2011;6:e24830.

Article 3 : Poster



CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE SOUCHES DE SALMONELLES ISOLÉES Unité de Bactériologie Expérimentale

DES ALIMENTS, ANIMAUX ET HUMAINS

FALL-NIANG NK¹, SITRAKA A¹, SECK A², DEME T³, COMBARI A⁴, WANE AA¹, MBOW M³, TIMBINE L⁶, SAMB-BA B¹, NIANG A¹, BERCION R², GASSAMA-SOW A¹

¹Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, IPD, ²Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale, ³Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène et l'Environnement, IPD, ⁴Laboratoire de Bactériologie, EISMV, UCAD

RÉSUMÉ

INTRODUCTION

Les salmonelles non typhiques (NTS) posent un problème majeur de santé publique en Afrique et dans le monde. Au Sénégal, le rôle de l'alimentation dans la transmission des maladies est mal reconnu et l'incidence des maladies d'origine alimentaire sous-estimée. A cela s'ajoute l'émergence de souches animales multirésistantes aux antibiotiques transmises à l'homme via l'alimentation. Il s'agit donc d'un réel problème de Santé Publique nécessitant la mise en place d'un système de surveillance efficace permettant le recueil de données à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire, mais aussi à partir de maladies humaines transmissibles par les aliments telle que la salmonellose.

MÉTHODOLOGIE

L'objectif de cette étude était de rechercher simultanément des salmonelles chez des patients présentant des diarrhées, chez les carcasses de poulets et au niveau des fèces de poulets. C'était une étude prospective entre juillet 2012 et juillet 2013. La coproculture était utilisée pour la recherche des salmonelles au niveau des selles. *Salmonella* était recherchée selon la norme ISO 6579 (2001), *Salmonella* était recherchée selon la norme (ISO 6579:2002/amendement A 1: 2007) respectivement pour les et fèces de poulets. Les antibiogrammes et le sérotypage étaient effectués selon des techniques standards. Les concentrations minimales d'inhibition (CMI) étaient déterminées par E-test pour les souches résistantes à l'acide nalidixique et à la ciprofloxacine. Au total 100 souches de salmonelles d'origine humaine, alimentaire et animale ont été sélectionnées pour faire la caractérisation des supports génétiques de la résistance et la recherche des facteurs de virulence.

RÉSULTATS

Au total 300 prélèvements de carcasses de poulets, 268 prélèvements de selles ou de fientes de poulets et 200 prélèvements de selles de patients ont été effectués. La prévalence des salmonelles était de 4% chez les humains, 31% avec les fèces de poulets et de 96% avec les carcasses de poulets. *Salmonella* Kentucky était le sérotype majoritaire au sein de la classe 2 n°1 retrouvée chez les souches d'origine animale. Les intégrons de classe 3 n°1 ont pas été détectés. Le gène *qnrA* n'a pas été retrouvé, par contre le *qnrB* et le *qnrS* avaient été retrouvés au niveau des trois secteurs. Les gènes *gyrA* et *parE* étaient retrouvés au niveau des trois secteurs. Par contre le gène *gyrB* n'a pas été retrouvé chez les souches humaines de même que le *parC* chez les souches animales. Les facteurs de virulence *invA*, *orfL*, et *pipD* ont été retrouvés chez toutes les souches animales et humaines. Par contre le *spvR* était retrouvé chez trois souches humaines et une souche animale. Les souches alimentaires avaient les gènes *invA*, *orfL*, et *pipD* mais avec des pourcentages de 86%, elles étaient donc moins virulentes. Le gène *spvC* était retrouvé chez toutes les souches animales et trois souches alimentaires. Les gènes *gyr* et *par* feront l'objet de séquençage pour déterminer les mutations.

CONCLUSIONS

Les salmonelles étaient plus prévalentes au niveau alimentaire et étaient plus résistantes aux quinolones et fluoroquinolones. Les professionnels vétérinaires doivent faire preuve de vigilance dans la prescription des antibiotiques. La prévention et la communication doivent être prioritairement axées dans les secteurs en amont des études de distribution pour assurer la santé des populations.

INTRODUCTION

Les salmonelles non typhiques (NTS) posent un problème majeur de santé publique en Afrique et dans le monde. Actuellement on note une émergence de salmonelles mineures au détriment de *Salmonella* Typhi.

En Afrique de l'Ouest y compris le Sénégal les salmonelles mineures sont les principales causes de gastroentérites chez les enfants et les adultes vivants avec le HIV (Seydi MM 2005, 2008).

Au Sénégal, le rôle de l'alimentation dans la transmission des maladies est mal reconnu et l'incidence des maladies d'origine alimentaire sous-estimée.

A cela s'ajoute l'émergence de souches animales multirésistantes aux antibiotiques transmises à l'homme via l'alimentation. Actuellement un peu partout dans le monde des salmonelles multirésistantes aux antibiotiques telle *Salmonella* Kentucky ST198 qui présente une résistance à la ciprofloxacine sont isolées chez les humains et en alimentaire (Simon Le Hello, 2013; Himel Barua). En Ethiopie, Nigéria et au Maroc *Salmonella* Kentucky ST198 a été isolée chez les poulets et les dindes domestiques et des épices importées en France ou aux USA à partir du Maroc. Au Sénégal *Salmonella enterica* serovar Keur massar qui est une souche multirésistante a été isolée aussi bien dans les selles qu'en alimentaire (Gassama et al., 2004), de même que le sérotype Kentucky (Dione et al., 2012).

Il s'agit donc d'un réel problème de Santé Publique nécessitant la mise en place d'un système de surveillance efficace permettant le recueil de données à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire, mais aussi à partir de maladies humaines transmissibles par les aliments telle que la salmonellose.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Période et cadre de l'étude

Étude prospective entre juillet 2012 et juillet 2013 (DAKAR)

Il s'agit d'évaluer la prévalence des salmonelles:

- Les carcasses de poulet vendues en étalage au niveau des marchés de Dakar (Sandaga ; Tilène, Fass, Castors, Colobane, Grand Dakar, Grand Yoff, Parcelles assainies.

- Les selles de sujets diarrhéiques (Dispensaire St Martin de Rebeuss, CS Dominique de Pikine)

- Les fèces de poulet au niveau des élevages de Keur Massar et de Sangalkam



Dispensaire St Martin, Rebeuss



Ferme de Sangalkam

MÉTHODES BACTÉRIOLOGIQUES:

La recherche des salmonelles réalisée:

- Les antibiogrammes et le sérotypage étaient faits à l'unité de BACT-EXP et au LABM de l'IPD. Les concentrations minimales d'inhibitions (CMI) étaient déterminées pour les souches résistantes aux quinolones (NA, CIP).

L'ADN total a été extrait par la méthode chimique QIAamp DNA minikit. L'amplification par PCR en point final. La migration sur gel d'agarose à 1,5%, 100V, 1h.

MÉTHODES MOLÉCULAIRES:

Au total, 100 souches de *salmonella* étaient sélectionnées pour faire la caractérisation moléculaire. Recherche des:

- Eléments génétiques de la résistance intégrons (*int1*, *int2*, *int3*)
- Eléments génétiques de la résistance plasmidique aux quinolones PQDR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6)-Ib-cr* et éléments génétiques de la résistance chromosomique des quinolones *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*
- Facteur de virulence: *invA*, *spvC*, *pipD*, *orfL*, *spvR*

RÉSULTATS

La prévalence des salmonelles était de 4% chez les humains, 31% pour les fèces de poulets et de 96% pour les carcasses de

Origine	Phénotypes de résistance	Déterminants génétiques de la résistance	Déterminants génétiques de la virulence	Sérotypes
Humaines (selles de patients)	na		<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Salmonella
	SXT-a2	<i>int1</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Salmonella
	TE-a2	<i>int1</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Salmonella
	DM-SXT-TE-a1	<i>int1</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	DM-NOR-CP-NA-a1		<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	NOR-CP-NA-SXT-TE-a1		<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
Animales (Fèces de poulets)	AMU-CTX-GM-TE-AMC-CF-CAZ-SXT-C-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Poona
	na	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Chesapeake
	TE-a2	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Brasserie
	SXT-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Brasserie
	SXT-TE-a2	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Brasserie
	SXT-TE-C-a1	<i>int1</i> , <i>parE</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	AM-TE-TE-SXT-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	NA-TE-NOR-CP-SXT-a9	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Sandaga Urban
	NOR-CP-NA-a2	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Urbana
	AM-FOU-NA-NOR-CP-C-a1		<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
Alimentaires (Carcasses de poulets)	AM-TE-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CP-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	AM-TE-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CP-SXT-a1	<i>int1</i> , <i>int2</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	AM-TE-CF-FOX-CTX-AMC-CAZ-NA-TE-NOR-CP-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	na		<i>int1</i> , <i>orfL</i>	Kentucky
	TE-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	SXT-TE-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	NOR-CP-NA-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	NOR-CP-NA-SXT-TE-a1	<i>int1</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Benifia
	NOR-CP-NA-SXT-TE-a14	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Brasserie
	NOR-CP-NA-TE-a1	<i>qnrB</i> , <i>int2</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	NOR-CP-NA-TE-a2	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Kentucky
	AMU-DM-NOR-TE-CP-NA-TE-a4	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	Brasserie
	NOR-AMC-CP-CA-FOX-TE-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	AMU-NOR-AMC-CP-NA-FOX-TE-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	AMU-DM-NOR-TE-CP-NA-TE-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	AMU-DM-NOR-TE-CP-NA-TE-a1	<i>int1</i> , <i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours
	NOR-TE-AMC-CP-CA-NA-SXT-TE-C-a1	<i>qnrB</i>	<i>int1</i> , <i>orfL</i> , <i>spvR</i>	En cours

Tableau 1: Répartition des déterminants génétiques de la résistance et de la virulence des salmonelles au niveau humain, animal et alimentaire

OrfL

invA

pipD

spvR

Figure 1: Photo de gel des facteurs de virulence (*OrfL*, *invA*, *pipD*, *spvR*)

CONCLUSIONS

Plusieurs sérotypes étaient retrouvés au niveau des trois secteurs mais c'était le sérotype *Kentucky* qui était le plus isolé dans les trois secteurs.

- La prévalence des salmonelles était plus élevée au niveau alimentaire avec un pourcentage de 96%. *Salmonella* Kentucky était le sérotype majoritaire et le plus résistant.

- Chez les souches humaines *Salmonella* Poona est isolée, elle présentait une résistance aux céphalosporines de 3ème génération.

Les résistances aux quinolones concernaient les souches humaines avec des CMI de (NA>256µg/ml; Cip=32µg/ml) et animales (NA=192µg/ml; Cip=0,19µg/ml). Cette résistance était codée par les gènes *qnrB*; le séquençage des gènes, *gyrA*, *parE* est en cours afin de déterminer les mutations au niveau de ces gènes. Les intégrons de classe 1 étaient retrouvés (34%). Les intégrons de classe 2 n'ont été retrouvés que chez les souches d'origine animale (7%).

- Les salmonelles d'origine animale étaient plus virulentes avec des prévalences de 100 % pour les facteurs *invA*, *pipD*, *orfL* mais moins résistantes.



Article 3:

Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from poultry and humans in Dakar, Senegal.

Foodborne Pathogens and Disease

Rubrique: Original research manuscripts

FALL-NIANG NK¹, ALAMBEDJI BADA; SITRAKA A¹, SECK A²., DEME T³,
COMBARI A⁴, WANE AA¹, MBOW M³, TIMBINE LG¹ FAYE N⁵, BERCION R².,
GASSAMA-SOW A¹

¹Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, IPD,

²Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale,

³Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène et l'Environnement, IPD,

⁴Laboratoire de Bactériologie, EISMV, UCAD

⁵ Département de Biologie Animale, FST, UCAD

Corresponding author:

Ndèye Khote FALL Ep NIANG

ndeyekhota@hotmail.com

Dr Amy Gassama-Sow
36, Avenue Pasteur Dakar Sénégal
BP 220
Tel : +221 338399235
Fax : +221 338399236
E- mail : gassama@pasteur.sn

Authors affiliations :

Sitraka Andrianony Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar akartiss@yahoo.fr

Seck Abdoulaye, Unité de Biologie Médicale Institut Pasteur de Dakar

seck@pasteur.sn

Timbine Lassina Gadi, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

las_timbin@yahoo.fr

Wane Abdoul Aziz, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

awane@pasteur.sn

Gassama Sow Amy, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar

gassama@pasteur.sn

Abstract

The aim of this study was to investigate the prevalence and mechanism of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* (NTS) isolates.

A total of 391 NTS was isolated from human (n=31), chickens carcasses (n=276) and feces of chickens (n=84) between July 2012 and July 2013 in Dakar and investigated by using serotyping and antimicrobial susceptibility test assays. Among the 391 NTS, 79 were selected for plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes *qnr*, *aac(6 ϕ)-Ib-cr*, and *qepA* and mutations in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* and *parC* by PCR, and DNA sequencing.

A total of 28 serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (serovars Brancaster, Kentucky, Istanbul, Senftenberg, Chester, Sandiego, Enteritidis, Hadar, Offa, Ouakam, Urbana, others serovars n=17) were selected and (60%, 47/79) were resistant to NA^R and CIP^R. The MICs of nalidixic acid and fluoroquinolones were CIP>32 μ g/ml, NA>256 μ g/ml (n=37). Isolates were positive for the detection of genes *gyrA* (78%), *gyrB* (58%), *parE* (95%), *parC* (4%), *qnrB* (57%), *qnrS* (4%), *qnrC* (1%), *qnrD* (1%), *aac(6 ϕ)-Ib* (1%). *QnrC*, *aac(6 ϕ)-Ib*, *qnrD*, *qnrS* were found in isolates resistant to NA^R and CIP^R. No isolates were positive for *qnrA* and *qepA*.

The mutations were observed in *gyrB* and *parE*. The most prevalent mutations in *gyrB* was substitute of (Leu-Phe n=11) followed (Pro-Ser n=4), (Ala-Thr n=2), (Arg-Gly n=2), (Asn-Asp n=2). The mutations in *parE* were found with serovars Brancaster and Gera and were isolated in carcasses of chicken.

The resistance of *Salmonella* to quinolones in Senegal has been previously described as associated with genes *qnr*, *aac(6 ϕ)-Ib-cr* and point of mutations within the QRDR of *gyrB* and *parE* and reduced susceptibility to fluoroquinolones. To the best of our knowledge, this study is the first report of surveillance of *salmonella* in human, animal and alimentary in Senegal. The spread of NTS carrying *aac(6 ϕ)-Ib-cr* and *qnr* is of serious concern, it would be crucial to accentuate the surveillance on the use of antibiotics, especially in veterinary.

Background

In Senegal, diarrhea is a major public health problem particularly from children under five years (Fall-Niang *et al.*, 2013; Sire *et al.*, 2013). The etiologies of diarrhea can be viral, bacterial or parasitic. Among bacterial etiologies it there's *Salmonella*. Currently we note an emergence of non-typhoidal *Salmonella* (NTS) to the detriment of *Salmonella* Typhi.

Approximately 1 million cases of Salmonellosis, causing 19,336 hospitalizations and nearly 400 deaths, occur each year in the United States (Scallan *et al.*, 2011).

In sub-Saharan Africa including Gambia and Senegal, non-typhoidal *Salmonella* (NTS) are a major cause of invasive disease in infants, young children, and HIV-infected adults and are associated with substantial mortality. For example, a retrospective study in Senegal revealed a prevalence of NTS in patients with HIV to be between 0.15% and 2.13% during 1996 to 2005. In addition, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium were the most common serovars (Seydi *et al.*, 2005, 2008).

Yet, around of 1500 serotypes has been repertored but the majority of salmonellosis are caused by only *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis.

Many studies confirm that as those of Sofia Maraki on the island of Crete to Greece, *Salmonella* Enteritidis were represented by 37.3% and *Salmonella* Typhimurium by 28.7% (Maraki *et al.*, 2014).

Antibacterial agents are often recommended for the treatment of suspected invasive salmonellosis and World Health Organisation (WHO) recommended fluoroquinolones as first-line antibiotics used in the treatment of diarrhea. Fluoroquinolones are very active on a wide range of pathogenic species and were also introduced into veterinary medicine for treatment of poultry against enteric pathogens (Cardinale E *et al.*, 2003). The treatment of bacterial infections diarrhea is increasingly complicated by the ability for bacteria to develop antimicrobial resistance.

In *Salmonella* species, a single mutation in the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* can mediate resistance to quinolones such as nalidixic acid and reduced susceptibility to fluoroquinolones. Mutations in the *gyrB* or topoisomerase IV (*parC* and *parE*) genes are considered rare in *Salmonella* (Giraud *et al.*, 2006).

In the recent years, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) has emerged in *Salmonella* and in other Enterobacteriaceae, and the prevalence of PMQR is increasing (Strahilevitz *et al.*, 2009). It was first reported in 1998 and actually three PMQR mechanisms

have been described (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). The first PMQR mechanism includes *qnr* genes, which encode proteins that directly protect DNA gyrase from quinolone inhibition (Strahilevitz *et al.*, 2009). The second mechanism consists of *aac(6 ϕ)-Ib-cr* gene, which encodes a new variant of the common aminoglycoside acetyltransferase that is capable of acetylating the piperazinyl substituent of some fluoroquinolones, thereby reducing their activities (Robicsek *et al.*, 2006). The third mechanism involves *qepA* gene, which encodes an efflux pump belonging to the major facilitator superfamily (Yamane *et al.*, 2007).

The aim of this study is to describe molecular characteristics of *Salmonella* quinolone resistant strains isolated from human, and poultry recovered in a same period.

Materials and Methods

Salmonella strains

A total of 391 NTS isolates recovered from human (n=31), chickens carcasses (n=276) and feces of chickens (n=84) has been collected between July 2012 and July 2013 in Dakar as part of AGISAR project funded by WHO. Seventy nine from the 391 NTS, were selected for further investigation.

The most frequent serovars and who presented resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin are selected in majority.

Identification and serotyping of *Salmonella* isolates from human were performed as previously described (FALL-NIANG *et al.*, 2013), on food according to norm ISO 6579 (2001), and from animal according to norm (ISO 6579:2002/amendement A 1: 2007).

Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility tests were performed by standard disc diffusion method according to the guidelines of the French Society of Microbiology (see CA-SFM guidelines <http://www.sfm-microbiologie.org>) on Mueller Hinton agar (Bio Rad, France) using commercial discs (Bio Rad, France).

The MICs of nalidixic acid (E-test®, Biomérieux France) and ciprofloxacin (E-test®, Biomérieux France) for all the Nal^R and CIP^R NTS isolates were determined according to the CASFM guidelines (CASFM, 2012). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 were used as quality control strains.

DNA was extracted using a kit (QIAGEN, DNA minikit) according to the manufacturer's recommendations and stored at -20°C.

Detection of PMQR determinants

Two multiplex PCR protocol were used as previously described for simultaneous amplification of *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, and *qnrS* genes and *qnrD*, *aac(6 ϕ)-Ib*, and *qepA* genes respectively (Park et al., 2006; Jacoby et al., 2009; Kim et al., 2009, Cavaco et al., 2009).

PCR amplification and sequencing of *gyrA* and *parC*

Quinolone resistance was confirmed by amplified *gyrA*, *gyrB* and *parC*, *parE* genes on selected isolates as previously described (Giraud et al., 1999).

Contig sequences were edited with Chromas Pro, compared in BLAST of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST>) and were aligned using the ClustalW program.

Results

A total of 28 serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (serovars Brancaster, n=15; Kentucky, n=15; Istanbul, n=5; Senftenberg, n=5; Chester, n=3; Sandiego, n=5; Enteritidis, n=3; Hadar, n=3; Offa, n=3; Ouakam, n=2; Urbana, n=2 and others serovars, n=17) were selected. Most of them (60%, 47/79) were resistant to Na^R and CIP^R.

The MICs of nalidixic acid and fluoroquinolones were determined for 37 Na^R and CIP^R NTS isolates derived from humans (n = 2), veterinary (n =10) and food (n =10) (**table 1**).

Isolates were positive for the detection of *gyrA* (78%), *gyrB* (58%), *parE* (95%), *parC* (4%), *qnrB* (57%), *qnrS* (4%), *qnrC* (1%), *qnrD* (1%), *aac(6')-Ib* (1%) genes. *QnrC*, *aac(6')-Ib*, *qnrD*, *qnrS* were found in isolates resistant to Na^R and CIP^R. None isolate was positive for *qnrA* and *qepA*.

The mutations were observed in *gyrB* and *parE*. The most prevalent mutations in *gyrB* was substitution of Leu-Phe (n=11) followed by Pro-Ser (n=4), Ala-Thr (n=2), Agr-Gly (n=2) and Asn-Asp (n=2) (**table 2**). The mutations of the gene *parE* were found with serovars Brancaster and Gera isolated in carcasses of chicken and they have 18 points of mutations (**table 3**).

Discussion

Results showed that *Salmonella* were multi-resistance to nalidixic acid (MIC \geq 256 μ g/ml, n=20) and ciprofloxacin (CMI >32 μ g/ml, n=18). The resistance to quinolones of *Salmonella* was found at the national level (Sambe-Ba et al., 2013; Fall-Niang et al., 2013) and international (Angulo et al., 2000 ; Sodagari et al., 2015).

The *qnrB* (57%) was detected in the majority when the *qnrS* (4%), *qnrC* (1%), *qnrD* (1%) and the *aac(6')-Ib* (1%) were not detected frequently. The *qnrA* and *qepA* were not detected in the isolates. This high percentage of strains harboring the gene *qnrB* is a major public health problem because it is a transferable gene.

In contrast to a study conducted in Iran where *qnrA* (25.8%) was the majority follow *qnrB* (1.7%) and *qnrS* (1.7%) (Saboochi *et al.*, 2012).

In Denmark it was reported that the resistance of *Salmonella* as *Salmonella* Enteritidis to quinolones increased nearly tenfold in five years. Unfortunately, these results indicated that the use of quinolones in veterinary medicine was the cause (Molbak *et al.*, 2002).

In Turkey a study was made on the level of the resistance plasmid to quinolones of *Salmonella* strains isolated in chicken carcasses. All isolates were negative for the detection of *qnrA*, the *qnrB* and *aac(6')-Ib-cr*, only two strains were positive for *qnrS* (Zafer *et al.*, 2014). The *qnrD* and *qnrC* are not very frequent. The *qnrD* have been characterised in China Henan in 2008 by a strain of *Salmonella* Kentucky of human origin (Cavaco *et al.*, 2009).

The mutation in the quinolone resistance-determining region was detected by the sequencing. The mutations were observed at the gene *gyrB* and *parE*. These results are different with those observed by Migma *et al.* (2011) and Liebana *et al.* (2002) who noted mutations in *gyrA* and *parC*.

This difference could be geographic. The change may be due with quinolones and fluoroquinolones used in human and veterinary medicine as well as the coping mechanism due to selected pression of some fluoroquinolones. The mutations of the gene *gyrB* with substitution of Leu-258-Phe and Ser-463-Tyr were observed in *Salmonella* Typhimurium by Gensberg K *et al.*, (1996).

Recently, a multinational study revealed different rates of reduced ciprofloxacin susceptibility among the human NTS isolates from Taiwan (48.1%), Thailand (46.2%), Korea (36.5%), Singapore (24.5%), Philippines (14.9%), Sri Lanka (8.0%), and Hong Kong (7.1%) (Lee *et al.*, 2009). In Senegal the resistance of *Salmonella* to quinolones was observed by Dione *et al.*, 2012. An emergence of multiresistant strains to quinolones and fluoroquinolones such as *Salmonella* Gera and *Salmonella* Brancaster was observed. These emerging strains merit to be studied later to better understand their cause and consequence of their presence in the food sector.

Conclusions

In conclusion, *Salmonella* was resistant to quinolones with MICs ; NA MIC > 256 g / ml and CIP MIC > 32 mg / ml. This resistance was encoded by *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* genes and point of mutations within the QRDR of *gyrB* and *parE*. To the best of our knowledge, this study is the first report of surveillance of *salmonella* in human, animal and alimentary in Senegal. The presence of genes *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* which are transferable genes promote the dissemination of the genetic elements of resistance in *Salmonella* or even other enteric

bacteria. This is a major public health problem. It would be crucial to accentuate the surveillance on the use of antibiotics, especially in veterinary medicine, in order to prevent increased resistance to recently developed molecules.

References

- Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML** (2000). "Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals". *Microb Drug Resist* 6: 77-83
- Cardinale E, Dromigny J A, Tall F, Ndiaye M, et al**, Fluoroquinolone susceptibility of *Campylobacter* strains, Senegal. *Emerging Infect Dis*, 2003. 9: p. 1479-81.
- Cavaco L. M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F. M.** (2009). "*qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin". 53(2) 603–608.
- Dione MM, Stanny Geerts, Martin Antonio.** (2012). "Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant *Salmonella* recovered from poultry in Southern Senegal". *J Infect Dev Ctries* 6(5):436-442.
- Fall-Niang NK, Sire JM , Tall A, Samb B, Breurec S, Ndour MM, Faye N, Garin B, Gassama-Sow A.** (2013). "Etiology of acute diarrhoea childhood and antimicrobial resistance of enteropathogenic bacteria in Dakar" *Dak Méd* 8(1) p1-10
- Gensberg K, Jin YF, Piddock LJ.** *Microbiol Lett* (1996). "A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium*". *Apr* 1 137(2-3):293.
- Giraud E, Baucheron S, and Cloeckaert A.** Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 2006; 8:1937–1944.
- Giraud E, Brisabois A, Martel JL, Chalus-Dancla E.** Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counter selection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2131–2137.
- Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC.** Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1665–1616.
- Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim E-C, Jacoby GA, and Hooper DC.** Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a nine-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:639–645.
- Lee HY, Su LH, Tsai MH, Kim SW, Chang HH, Jung SI, Park KH, Perera J, Carlos C, Tan BH, Kumarasinghe G, So T, Chongthaleong A, Hsueh PR, Liu JW, Song JH, Chiu CH.** High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2696–2699.
- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E., Threlfall, E.J., McDowell, S.W. Davies, R.H.** (2002). "Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland". *J Clin Microbiol* (40) 4450–4456.
- Maraki Sofia Ioannis S. Papadakis.** (2014). "Serotypes and Antimicrobial Resistance of Human Nontyphoidal Isolates of *Salmonella enterica* from Crete, Greece". *Interdisciplinary Perspectives on Infect Dis*. Volume 2014, Article ID 256181, 5 pages
- Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA.** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797–799.
- Molbak Kare, Peter Gerner-Smidt, Henrik C. Wegener.** (2002). "Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis". *Emerging Infectious Diseases* 8(5) 514–515. doi: [10.3201/eid0805.010288](https://doi.org/10.3201/eid0805.010288)
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006;12:83–88.

- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC.** Prevalence in the United States of *aac(6 ϕ)Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50:3953–3955.
- Saboochi R., S.D. Siadat, M.R. Aghasadeghi, M.R. Razavi, B. Rajaei, N. Sepehri Rad, A. Moshiri, S.F. Mousavi, S. Javadian, K. Kave, A. Dashtbani-Roozbehani, S.M. Sadat, S. Gerayesh Nejad N. Kashanizadeh** (2012). “Molecular Detection of *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* Resistance Genes among *Salmonella* spp. in Iran”. *Current Research in Bacteriology* 5: 24-30.
- Sambe-Ba Bissoume, Emmanuelle Espié, Mamadou Elimane Faye, Lassina Gadi Timbiné, Mbacké Sembene, Amy Gassama-Sow.** (2013). “Community-acquired diarrhea among children and adults in urban settings in Senegal: clinical, epidemiological and microbiological aspects”. *BMC Infect Dis* 13:580
- Seydi MM, Soumare AI, Sow B, Diop M, Sow PS** (2005) Current aspects of *Salmonella* bacteremia cases in the Ibrahima Diop Mar Infectious Diseases clinic, Fann National Hospital Center (Senegal). *Med Mal Infect* 35: 23-27.
- Seydi MM, Soumare AI, Sow SA, Diop I, Sow AB, Dieng ML, Dia BM, Sow PS** (2008) Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia cases in AIDS patients in a Dakar University Hospital (Senegal). *Med Mal Infect* 38: 25-28.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, Jones JL, Griffin PM.** Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:7–15.
- Sire Jean-Marie; Benoit Garin ; Loic Chartier; Ndeye Khota Fall ; Adama Tall; Abdoulaye Seck; François-Xavier Weill; Sébastien Breurec; Muriel Vray** (2013). “Community-acquired infectious diarrhoea in children under 5 years of age in Dakar, Senegal”. *Pediatrics and International Child Health* 33(3) p 139-144 (ISSN: 20469047) DOI: 10.1179/2046905512Y.0000000046
- Sodagari HR, Mashak Z, Ghadimianazar A.** (2015). “Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran.” *J. Infect. Dev. Ctries.* May 18;9(5):463-9. doi: 10.3855/jidc.5945.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A.** (2009). “Plasmidmediated quinolone resistance: a multifaceted threat”. *Clin Microbiol Rev* 22 : 664–689
- Yamane K, Wachino J-I, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y.** New plasmidmediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3354–3360.
- Zafer Ata, Artun Yibar, Erdem Arslan, Kaan Mustak, Elcin Gunaydin.** (2014). “Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* serotypes isolated from chicken carcasses in Turkey” *Acta Vet. Brn*, 83(4): 281-286 doi:10.2754/avb201483040281 83p281

Annexes

Table 1: MIC of *Salmonella* NA^R and CIP^R

Origin / Sérovars	Resistance phenotypes (mm)		MIC (µg/ml)	
	NA	CIP	NA	CIP
Human				
435 Enteritidis	6	27	>256	>32
B 17 Enteritidis	6	30	>256	= 32
Veterinary				
V20 Brancaster	14	27	>256	>32
V35 Sandiego	14	27	>256	= 0,38
V39 Sandiego	12	28	>256	>32
V40 Chester	12	28	>256	>32
V44 Urbana	0	30	= 192	= 0,19
V45 Kentucky	0	8	>256	>32
V54 Kentucky	0	8	>256	>32
V71 Sandiego	13	26	= 48	>32
V75 Kentucky	0	9	>256	>32
V82 Urbana	0	22	>256	= 0,125
Food				
L1 Kentucky	0	10	>256	>32
L2 Ruzizi	0	11	>256	>32
L8 Hadar	12	24	>256	>32
L20 Kentucky	0	10	>256	>32
L22 Kentucky	0	8	>256	>32
L24 Senftenberg	0	12	>256	>32
L26 Kentucky	0	8	>256	>32
L28 Kentucky	0	0	>256	>32
L30 Benfica	0	24	>256	>32
L32 Abony	0	20	>256	>32
L33 Kentucky	0	0	>256	>32
L39 Kentucky	0	25	= 48	= 0,125
L51 Brancaster	14	27	>256	>32
L55 Brancaster	14	25	>256	>32
L58 Brancaster	19	19	>256	>32
L70 Kentucky	14	8	>256	>32
L74 Farsta	18	26	>256	= 1,5
L83 Istanbul	13	24	>256	>32
L115 Sandiego	13	26	>256	>32
L138 Hadar	17	28	>256	>32
L141 Gera	16	20	>256	>32
L204 Kentucky	0	9	>256	>32
L261 Istanbul	10	25	>256	= 1
L271 Istanbul	8	25	>256	>32
L275 Istanbul	12	22	>256	>32

Table 2: Mutations of the *gyrB* gene

Origin	Number	Serovars	Mutations of the <i>gyrB</i> gene	MIC		Phenotypes	
				NA	CIP	NA	CIP
Animale	Sal39	Sandiego	Pro-25-149-235-Ser	>256	>32	R	R
			Lys-91-Glu, Ser-220-Arg, Ala-265-Thr,	=192	=0,19	R	R
	Sal44	Urbana	Gln-34-Stop				
	Sal45	Kentucky	Leu-256-Phe	>256	>32	R	R
	Sal 54	Kentucky	Leu-250-Phe, Ala-244-Thr, Ser-191-Ala	>256	>32	R	R
	Sal82	Urbana	Leu-250-Phe	>256	=0,125	R	R
	Sal20	Brancaster	Agr-33-Gly	>32	>32	R	R
Alimentaire			Pro-25-Ser, Ile-23-Val, Val-210-Ile,			R	R
	Sal40	Chester	Ala-207-Thr	>256	>32		
	L2	Ruzizi	Leu-264-Phe,	>256	>32	R	R
	L8	Hadar	Leu-250-Phe	>256	>32	R	R
	L28	Kentucky	Tyr-261-Ile	>256	>32	R	R
	L30	Benfica	Leu-260-Phe	>256	>32	R	R
	L51	Brancaster	Arg-31-Ser, Asn-25-Asp, Lys-85-Glu	>256	>32	R	R
	L55	Brancaster	Leu-264-Phe	>256	>32	R	R
	L58	Brancaster	Leu-264-Phe	>256	>32	I	R
			Leu-258-Phe, Arg-16-Gly, Asn-172-196-Asp Stop-	>256	>32	R	R
	L70	Kentucky	46-31-Arg				
			Leu-162-Phe, Asn-171-196-Asp, Tyr-260-Ile Stop-	>256	>32	I	R
	L141	Gera	45-30-Leu, Stop-105-Gln				
	L204	Kentucky	Leu-263-Phe, Thr-257-Ala	>256	>32	R	R
	L271	Istanbul	Leu-258-Phe, Ser-463-Tyr	>256	>32	R	R

Table 3: Mutations of the *parE* gene

Origin	Number	Serovars	Mutations of the <i>parE</i> gene	MIC		Phenotypes	
				NA	CIP	NA	CIP
Alimentaire	L141	Gera	Ala -28- Thr, Gly-104-206-224-Arg , Stop-86-245-Gly ; Agr-215-Stop, Pro-131-Ser, Leu-89-Phe, Ser-212- Ala, Cys-92-Gly, Ser-209- Gly, Stop-125-Arg, Tyr-167-His, Val-128-Ile, Ile-101-Phe, Asn-51-Ile, Leu-18	>256	>32	I	R
	L58	Brancaster	Ala -35-56-98-Thr, Arg-92-212-194-Gly, Gly-74-233-Stop, Tyr-28-Leu, Thr-17-Ala, Leu-6, Stop-45-151-Gln, Stop-203-Arg, Gly-68-Arg, Gly-80-Cys, Ile-40-Asn, Phe-89-Ile, Phe-77-Leu, Asp-51-His, Ser-119-Pro, Ile-116-Val, His-154-Tyr, Arg-113- Stop, Ala-200-Ser, Gly-197-Ser	>256	>32	I	R

CIP: ciprofloxacin, **NAI:** nalidixic acid, **R:** Resistant, **I:** Intermediate **MIC:** minimum inhibitory concentration

Lys: Lysine ; **Pro:** proline ; **Ser:** Serine ; **Glu:** Glutamic ; **Arg:** Arginine ; **Ala:** Alanine ;
Thr: Threonine ; **Gln:** Glutamine ; **Leu:** Leucine ; **Phe:** Phenylalanine ; **Gly:** Glycine ;

Pro: proline ; **Ile:** isoleucine ; **Val:** Valine ; **Asn:** Asparagine ; **Tyr:** Tyrosine ; **Asp:** Aspartic

Article 4:

Evaluation of the level of *Salmonella* contamination in chicken carcasses in Dakar, Senegal

Fall-Niang NK¹, Deme T³, Alambédji Bada R. Sitraka A¹, Seck A², Wane AA¹, Timbine LG¹, Bercion R², Mbow M³, Gassama-Sow A^{1*}

_Microbiology, safety and Hygiene

Rubrique : Original article

¹Unité de Bactériologie Expérimentale, Institut Pasteur de Dakar, IPD,

²Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale,

³Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène de l'Environnement, IPD

Corresponding author:

Pr Amy Gassama-Sow
36, Avenue Pasteur Dakar Sénégal, BP 220
Tel: +221 338399235
Fax : +221 338399236
E- mail: gassama@pasteur.sn

Authors affiliations

FALL-NIANG NK, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar
ndeyekhota@hotmail.com

SITRAKA A, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar, akartiss@yahoo.fr

SECK A, Laboratoire de Biologie Médicale Institut Pasteur de Dakar seck@pasteur.sn

TIMBINE LG, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar las_timbin@yahoo.fr

WANE AA, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar, awane@pasteur.sn

GASSAMA-SOW A, Unité de Bactériologie Expérimentale Institut Pasteur de Dakar,
gassama@pasteur.sn

Mbow M, Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène de l'Environnement, IPD

Deme T, Laboratoire de Sécurité Alimentaire et d'Hygiène de l'Environnement, IPD

Bercion R, Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale,

Evaluation of the level of *Salmonella* contamination in chicken carcasses from Dakar, Senegal

Abstract:

Background: In Senegal, the incidence of *salmonella* contaminations in poultry products is underestimated. The objective of this study was to investigate the level of *salmonella* contamination in chicken carcasses obtained from retailers in Dakar markets, Senegal. . Chicken carcasses were collected between July 2012 and July 2013. *Salmonella* samples were isolated and cultured according to ISO 6579 (2002) guidelines (Amendment 1: 2007 Horizontal methods recommendation for the detection of *Salmonella*). Susceptibility testing and serotyping of isolates were performed by using standard techniques.

Results: A total of 300 chicken carcasses were analyzed and the prevalence of *Salmonella* contamination reached 53%. Overall, the hygiene conditions at the retailer stores where chicken carcasses were sold were fair, except at one market where the hygiene conditions were poor. Indeed, the rate of *salmonella* contamination at that market reached 78%. Interestingly, a total of 20 *Salmonella* serotypes were identified among our *Salmonella* isolates.

The 3 most commonly found serovars were *Salmonella* Istanbul (28%), *S. Brancaster* (19%) and *S. Kentucky* (13%), accounting for 55 % of all isolates. Overall, 21% of isolates were resistant to quinolones and fluoroquinolones. A very high number of isolates displayed a resistance phenotype to tetracycline (66%) and streptomycin (47%). Less isolates were resistant to cephalosporins (2 to 5%), chloramphenicol (2%), gentamicin (8%) and imipenem (1%)

Conclusion: A high prevalence of *salmonella* contamination was observed in chicken carcasses sold in Dakar markets. This is probably due to poor hygiene conditions in chicken farms and slaughter houses but also due to the fact that the cold chain is not always maintained through the distribution chain of poultry products.

Veterinary professionals should be more careful when prescribing and using certain antibiotics. A preventive and educational work needs to be done at all stages, from the production to the distribution of poultry products, in order to ensure the wellbeing of the populations.

Keywords: *Salmonella*, chickens, markets, Dakar, antibiotics

Introduction

According to WHO's the food safety policies should cover all stages of the food production chain, from farms to the consumer plate (14). *Salmonella* is one of the leading causes of human gastroenteritis all over the world. Indeed, each year, there are in average 93.8 million cases of gastroenteritis linked to *Salmonella* infection, with approximately 155,000 death cases (12).

In Africa, non-typhoid *Salmonella* are the main causes of bacteremia among immunocompromised individuals, infants and newborns (4; 13). However the epidemiologie of *Salmonella* in developing countries are not well documented (1; 10). In general, the primary sources of salmonellosis are food-producing animals such as cattle, poultry and swine (16).

Salmonella are carried in the intestinal tracts of many birds, including chicken, and epidemiological evidences have suggested that this site is a potential reservoir for human infections and an entry point into the food chain. In chicken carcasses, *salmonella* are commonly found on the skin and muscles, although the neck and the anus are the most contaminated parts. Consumption of contaminated poultry products (or undercooked products) appears to be one of the main sources of human infection.

In Senegal, the incidence of *Salmonella* contamination in food products is underestimated. To date, there are few reports that have focused on the microbiological quality of poultry products in Senegal. In a pioneering study conducted in 2004 Cardinal et al showed that the incidence of *salmonella* contamination in chicken carcasses reached 32%. They also isolated a new *Salmonella* serovar (*Salmonella enterica* serovar Keur Massar) that displayed a multidrug resistance phenotype. The same serovar was later reported in both human and food samples (9). Recently, another serovar, *Salmonella enterica* serovar Kentucky was isolated from poultry samples.

In Senegal, chicken carcasses are sold on display in the markets by retailers. This probably plays a role in the proliferation of *Salmonella*. In addition, power shortages make the situation worse by disrupting the cold chain, which is required for storing poultry products.

The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Salmonella* contamination in chicken carcasses sold on display on the markets in Dakar and its suburbs.

Results

Environment of sale of chicken carcasses in Dakar

We conducted a field survey in different farms, slaughter houses and retailer stores to better understand the conditions of sale and the quality of chicken carcasses sold on the market in Dakar, Senegal.

In this study, chicken carcasses were purchased from retailers in different markets in Dakar. Chickens were raised in industrial or traditional farms in rural and urban areas. Overall, the conditions of sale of chicken carcasses were fair except at Tilène market where the hygiene conditions were poor in 40%. In fact, 78% of chicken carcasses from this market were contaminated with *Salmonella*. Most chicken carcasses were sold on display and they were stored in one individual bag (**Table I**).

Type of sold chickens and contamination level

A sample has been performed on about 300 chickens purchased in major markets of Dakar and its suburbs. A total of 300 chicken carcasses were analyzed. Although they were all bought from different stores in Dakar markets, they originated from 3 types of chickens: the broilers, premises, and layer chickens. Of the 300 chicken carcasses, 53% (n=160) were infected with one or many *Salmonella*. Overall, a total of 273 *Salmonella* isolates was collected from these chicken carcasses.

The prevalence of *Salmonella* was high in broilers for Sandaga market (68%), Tilène (75%), Fass (50%), Grand Dakar (42%), Grand Yoff (43%) and Parcelles Assainies (62%). As for the chickens premises the prevalence of *Salmonella* was high in the markets of Sandaga (40%), Tilène (91%), Grand Dakar (77%), Grand Yoff (62%), Castor (62,5%), Parcelles Assainies (45%). As for layer chickens *Salmonella* prevalence was high in markets Castor (100%), Tilène (40%) and Grand Dakar (78%) **figure 1**.

Salmonella serovars

Serotyping analysis of the 273 *Salmonella* isolates identified 20 different *Salmonella* serovars. The serovars Istanbul (28%), Brancaster (19%) and Kentucky (13%) were the most commonly found serovars (**figure 2**). We were unable to characterize 2 *Salmonella* isolates since they did not correspond to any existing profile on the Kauffman-White classification scheme for *Salmonella*.

Antibiotic resistance

Antimicrobial susceptibility testing was performed according to the recommendations of “CA-SFM, 2012”. Among the 273 *Salmonella* isolates, 21% of isolates were resistant to quinolones and fluoroquinolones. It is noteworthy that the incidence of tetracycline and streptomycin resistance was very high (66% and 47% respectively). Few *Salmonella* isolates were resistant to cephalosporin (2 to 5%), chloramphenicol (2%), gentamicin (8%) and imipenem (1%). Interestingly, 25% of isolates remained susceptible to all tested antibiotics (Figure 3).

The most commonly found resistance phenotype was NTeS, which indicated a resistance to quinolones and fluoroquinolones tetracycline and streptomycin (these antibiotics were commonly used in veterinary medicine).

The second commonly found resistance profile was CFGN, which indicates a resistance to gentamicin, quinolones, first, second and third generation cephalosporins (these antibiotics were frequently used in both veterinary and human medicine). The third common resistance profile was CFNGT indicating a resistance to first, second and third generation cephalosporin, quinolones, fluoroquinolones and tetracycline. The fourth common resistance profile was CFNGT showing a resistance to first, second and third generation cephalosporin, quinolones and fluoroquinolones, tetracycline and imipenem (**table II**).

Discussion

In this study, we analyzed 300 chicken carcasses purchased in Dakar markets and its suburbs to look for *Salmonella* contamination. To this end, three types of chicken carcasses were purchased (broilers, layer chicken and chicken premises). *Salmonella* contaminations were found in all three categories of chicken carcasses from all the selected markets, suggesting a broad distribution of *Salmonella* in poultry products from Dakar the capital of Senegal and its suburbs.

Overall, the hygiene conditions at different retailer stores were fair, except at Tilène market where the hygiene conditions were poor. Indeed, 40% of the chicken carcasses purchased from Tilene market were contaminated with bacteria (*Salmonella* accounted for 78% of those bacteria).

The overall prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses was 53%, suggesting a high level of contamination of chicken products, and this increases the risks of food poisoning for consumers.

A total of 20 serovar were identified in this study, and the most frequent ones were *S. Istanbul* (70/273, 26%), *S. Brancaster* (51/273, 19%) and *S. Kentucky* (33/273, 12%). These serovars

have been previously reported in chicken carcasses and human feces (8). It is possible that the same clones are circulating between poultry and humans.

Antimicrobial susceptibility was performed on strains isolated from chicken carcasses. Of the 273 *Salmonella* strains tested, 21% were resistant to quinolones and fluoroquinolones strains while 25% remained susceptible to all tested antibiotics. An emergence of strains resistant to quinolones and fluoroquinolones was noted on the sector. This result is obtained also by the Hello *et al.*, (11) and Barua *et al* (2) with the emergence of *Salmonella* Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. The serovar Istanbul was most frequently in chicken carcasses but the majority of strains was resistant to (SXT-TE), only two strains are resistant to quinolones. This serovar was found in other studies in Senegal (7). It was an emerging serovar and was not in contact with many antibiotics. After serovar Istanbul, *Salmonella* Brancaster was also found in chicken carcasses. It was a very frequently isolated serovar in Senegal at the chicken carcasses (7; 5). Serovar Brancaster was resistance to quinolones (22%). More than 90% of isolates of *Salmonella* Brancaster and Kentucky were resistant to tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole when 30% of *Salmonella* Kentucky isolates were also resistant to quinolones. Resistance to these antibiotics could be explained by their use as growth promoters in the veterinary medicine. Several studies have shown that the selection of resistant strains was the result of an extensive use of different families of antibiotics in animals, especially as growth promoters (15). In Senegal and worldwide the resistance of *Salmonella* Kentucky to quinolones has been reported in several studies Dione *et al.*, 2012 (7). *Salmonella* Senftenberg isolates were resistant to tetracycline, 3rd generation cephalosporins, to quinolones and even to imipenem. What constitutes a high risk that can be associated with consumption of chicken if cold chains are not followed, because imipenem is an antibiotic of last resort in the treatment of food-borne infections. Currently emergence of *Salmonella* Senftenberg in the poultry sector was noted (3). This is a risk to human health

because these bacteria may be present in animals at slaughter and food processing. Serovars Hadar, Gera, Yeerongpilly were not very frequent. The few isolated strains were multidrug resistant, especially to cephalosporins of 1 and 2 generation or even 3 generation for the serovar Yeerongpilly. The serovar Hadar also resistant to quinolones and fluoroquinolones, tetracycline, gentamicin and imipenem.

The serovar Hadar, Gera, and Yeerongpilly were less encountered. Isolates belonging to these serovars displayed a multidrug resistance phenotype. More specifically, the isolates of the serovar Yeerongpilly were resistant to first, second and even to third generation cephalosporin, while the isolates from the serovar Hadar were resistant to quinolones, fluoroquinolones, tetracyclin, gentamycin and imipenem.

The presence of these multidrug resistant strains is a major public health problem. Multidrug resistance may be due by a horizontal transfer of resistance genes via bacterial conjugation (9).

Conclusion

A high prevalence of *salmonella* contamination (53%) was observed in chicken carcasses isolated in Senegal. This situation leads me to interest myself in terms of mode of farmed, but also to slaughter and hygiene conditions when selling chickens in Dakar where the cold chain is sometimes lacking. In total, 21% of strains were resistant to quinolones and fluoroquinolones.

Veterinary professionals should be vigilant in the prescription as well as in the use of these antibiotics. Prevention and communication must be focused primarily in upstream sectors of distribution stages to ensure the health of populations.

Methods

This study is part of WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) project funded by WHO. Chicken carcasses were collected between July 2012 to July 2013.

Sampling methods

Samples used in this study were whole chicken carcasses sold in the open in the multipurpose Dakar markets. Chicken carcasses were bought and kept in sterile bags, and were immediately sent to the laboratory for further microbiological analysis. The target markets for sample collection were Sandaga; Tilène; Fass; castor; Colobane ; Grand Dakar; Grand Yoff and Parcelles Assainies.

Collect and data validation

This study was done in collaboration with a technician who working from the laboratory of food hygiene and safety in Pasteur Institute of Dakar. The samples (chicken carcasses) were delivered according to the requirements of hygiene and food safety laboratory of the Pasteur Institute of Dakar for the microbiological examination.

Isolation and identification of *Salmonella* isolates

Salmonella strains were isolated by following the ISO 6579 (2002) guidelines, Amendment 1: 2007 Horizontal methods for the detection of *Salmonella*. Suspect colonies were confirmed by biochemical and serological tests. Serotyping was doing by slide agglutination. Sensitivity testing of strains to antibiotics was carried by following the “CASFM” guidelines (CASFM / www.sfm-microbiologie.org).

References

1. Acha PN, Szyfres B (2001). “Salmonellosis. In Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Volume I: Bacterioses and Mycoses. 3rd edition. Edited by Acha PN, Szyfres B. Washington, D.C: Pan American Health Organization;:233–246.
2. Barua, H., Biswas, P. K., Olsen, K. E. P., & Christensen, J. P. (2012).” Prevalence and characterization of motile *Salmonella* in commercial layer poultry farms in Bangladesh”. *PLoS One* 7 (4). 10.1371/journal.pone.0035914

3. **Boumart Zineb, Sylvie M. Roche, Françoise Lalande, Isabelle Virlogeux-Payant, Christelle Hennequet-Antier, Pierrette Menanteau, Irene Gabriel, François-Xavier Weill, Philippe Velge, Marianne Chemaly** (2012). "Heterogeneity of Persistence of *Salmonella enterica* Serotype Senftenberg Strains Could Explain the Emergence of this Serotype in Poultry Flocks". PLoS ONE 7(4): e35782. doi:10.1371/journal.pone.0035782.
4. **Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE** (2005). "WHO estimates of the causes of death in children". Lancet, 365:1147–1152.
5. **Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Rivoal K, Rose V, Tall F, Mead GC, Salvat G.** (2005). "Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility". J Appl Microbiol 99(4):968-77.
6. **Cardinale, E., Tall F., Gueye E.F., Cisse M. Et Salvat G.** (2004). "Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* infection in Senegalese broiler-chicken flocks". Prev Vet Med 63: 151–161.
7. **Dione MM, Stanny Geerts, Martin Antonio.** (2012). "Characterisation of novel strains of multiply antibiotic-resistant *Salmonella* recovered from poultry in Southern Senegal". J Infect Dev Ctries 6(5):436-442.
8. **Dione M.M., et al.** (2011). "Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal". J Infect Dev Ctries. 5(11): 765-75.
9. **Gassama Sow A, Awa Aïdara-Kane, Nabil Raked, François Denis, Marie-Cécile Ploy.** (2004). "Integrins in *Salmonella* Keurmassar, Senegal". **Emerg. Infect. Dis.** 10 (7) : 1339-40
10. **Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Muyodi J, Githinji JW, Kagendo D, Munyalo A, Hart CA** (2006). Invasive multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in Africa: zoonotic or anthroponotic transmission? J Med Microbiol (55) 585–591.
11. **Le Hello S, Amany Bekhit, Sophie A. Granier, Himel Barua, Janine Beutlich, Magdalena Zajac, Sebastian Münch, Vitali Sintchenko, Brahim Bouchrif, Kayode Fashae, Jean-Louis Pinsard, Lucile Sontag, Laetitia Fabre, Martine Garnier, Véronique Guibert,**

- Peter Howard, Rene S. Hendriksen, Jens P. Christensen, Paritosh K. Biswas, Axel Cloeckaert, Wolfgang Rabsch, Dariusz Wasyl, Benoit Doublet, Weill FX (2013).** “The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain” Frontiers in Microbiology Vols. 1 to 5; 2010 to 2014doi: 10.3389/fmicb.2013.00395
- 12. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O’Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM (2010).** “The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis”. Clin Infect Dis, (50):882–889.
- 13. Morpeth SC, Ramadhani HO, Crump JA (2009).** “Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa”. Clin Infect Dis (49) 606–611.
- 14. OMS (2015)** « la sécurité sanitaire des aliments » Journée mondiale de la Santé 2015.
- 15. Sanders P. (2005).** “L’antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale“. Bull. Acad. Vét. France 158 (2): 137-143.
- 16. Thorns CJ (2000).** Bacterial food-borne zoonoses. Rev Sci Tech (19) 226–239.

Table I: Farming and sale conditions of chickens in Dakar

		Health & Environment			Origin			Farming area		Number of <i>Salmonella</i>
		NS	A	S	IF	TF	STF	U	R	
Sandaga	B	2	5	6	-	13	-	1	12	13
	CP	-	-	2	-	2	-	-	2	2
	LC	2	-	-	-	-	2	2	-	2
Tilène	B	7	14	-	16	-	5	5	15	21
	CP	8	13	-	17	-	4	13	8	21
Fass	B	-	-	5	5	-	-	-	-	5
	LC	-	5	-	-	-	5	-	5	5
Castor	B	-	4	-	4	-	-	4	-	4
	CP	-	8	2	2	-	8	-	10	10
Colobane	B	-	5	-	3	2	-	-	5	5
	CP	-	4	-	1	3	-	-	4	4
	LC	-	7	-	7	-	-	4	3	7
Grand Dakar	B	-	8	-	8	-	-	-	8	8
	CP	-	10	-	10	-	-	-	10	10
	LC	-	5	-	5	-	-	4	1	5
Grand Yoff	B	-	4	5	9	-	-	7	2	9
	CP	-	8	-	8	-	-	4	4	8
	LC	-	1	-	1	-	-	1	-	1
Parcelles	B	3	4	9	13	3		16	-	16
Assainies	CP	-	5	-	5	-	-	3	2	5

NS: No satisfactory, A: Acceptable, S: Satisfactory, IF: Industrial Farming, TF: traditional

Farming, STF: Semitradeional farming, U: Urban, R: Rural

CP: Chicken Premises, B : Broiler, LC: Layer Chickens

Table II : *Salmonella* resistance patterns

Serovars	Resistance patterns	Number of isolates
Istanbul	TE	13
	SXT-TE	36
	SXT-TE-C	1
	GM-SXT-TE	1
	GM-NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	14
Brancaster	TE	21
	SXT-TE	19
	NOR-CIP-NA-TE	7
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	2
	AMX-AMC-CF-SXT-FOX-TE	1
	AMX-NOR-CIP-CF-NA-SXT-FOX-TE	1
Kentucky	SXT	6
	SXT-TE	2
	SXT	1
	GM-SXT-TE	13
	NOR-CIP-NA-TE	1
	AMX-AMC-CF-FOX	1
Senftenberg	NOR-CIP-NA-SXT-TE	4
	CTX-NOR-TIC-CIP-NA	1
	AMX-GM-NOR-TIC-CIP-NA-TE	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-TE	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-TE	1
	C	1
Sandiego	TE	1
	TIC-CAZ-C	1
	CTX-NOR-CAZ	1
	CTX-NOR-CAZ-C	1
	AMX-NOR-CAZ-C	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Hadar	CTX-NOR-CIP-CAZ-IMP-C	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-IMP-TE	1
	SXT-TE	2
	NOR-CIP-NA	2
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	3
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Indiana	AMX-NOR-TIC-CIP-NA-TE	1
	AMX-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-NA-SXT-IMP-TE-C	1
	SXT-TE	6
	GM-SXT-TE	2
	SXT-TE	1
	SXT	1
Masembe	SXT-FOX-TE	2
	TE	2
	SXT-TE	6
	GM	1
	TE	2
	TE	1
Give	NOR-CIP-NA-TE	1
	SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-TE	1
	NOR-CIP-NA-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Llandoff	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	AMX-NOR-AMC-CIP-NA-FOX-TE	1
	AMX-GM-NOR-TIC-AMC-CIP-CF-CAZ-NA-TE	1
	SXT-TE	6
	GM	1
	TE	2
Schwarzengrund	TE	1
	NOR-CIP-NA-TE	1
	SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-TE	1
	NOR-CIP-NA-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Typhimurium	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Tsevie	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Johannesburg	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Llobregat	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Farsta	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Benfica	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Abony	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Ruzizi	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Phaliron	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Gera	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
Yeerongpilly	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1
	NOR-CIP-NA-SXT-TE	1

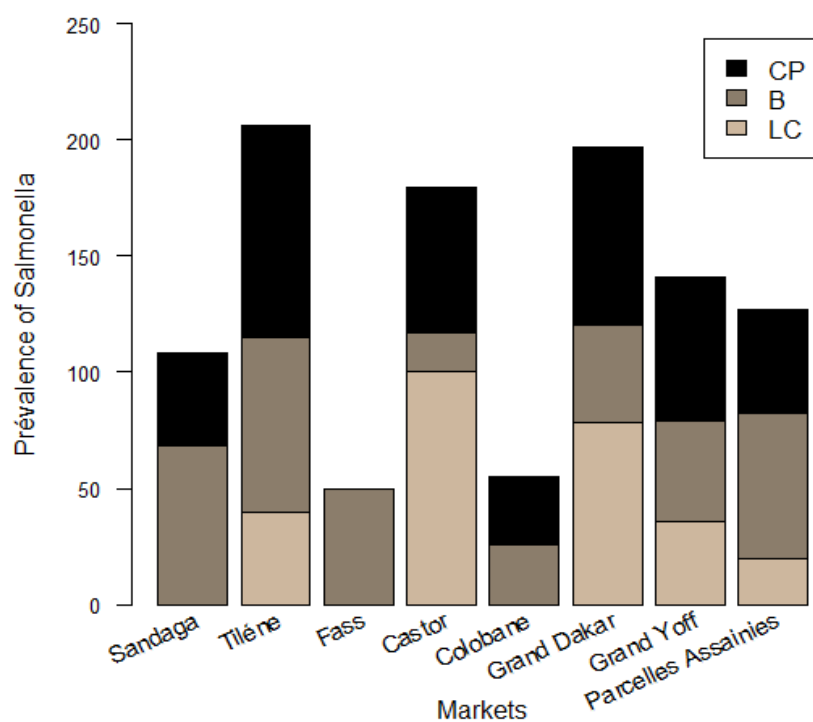


Figure 1 : Prevalence of *salmonella* according to the markets

CP: Chicken Premises, B : Broiler, LC : Layer Chickens

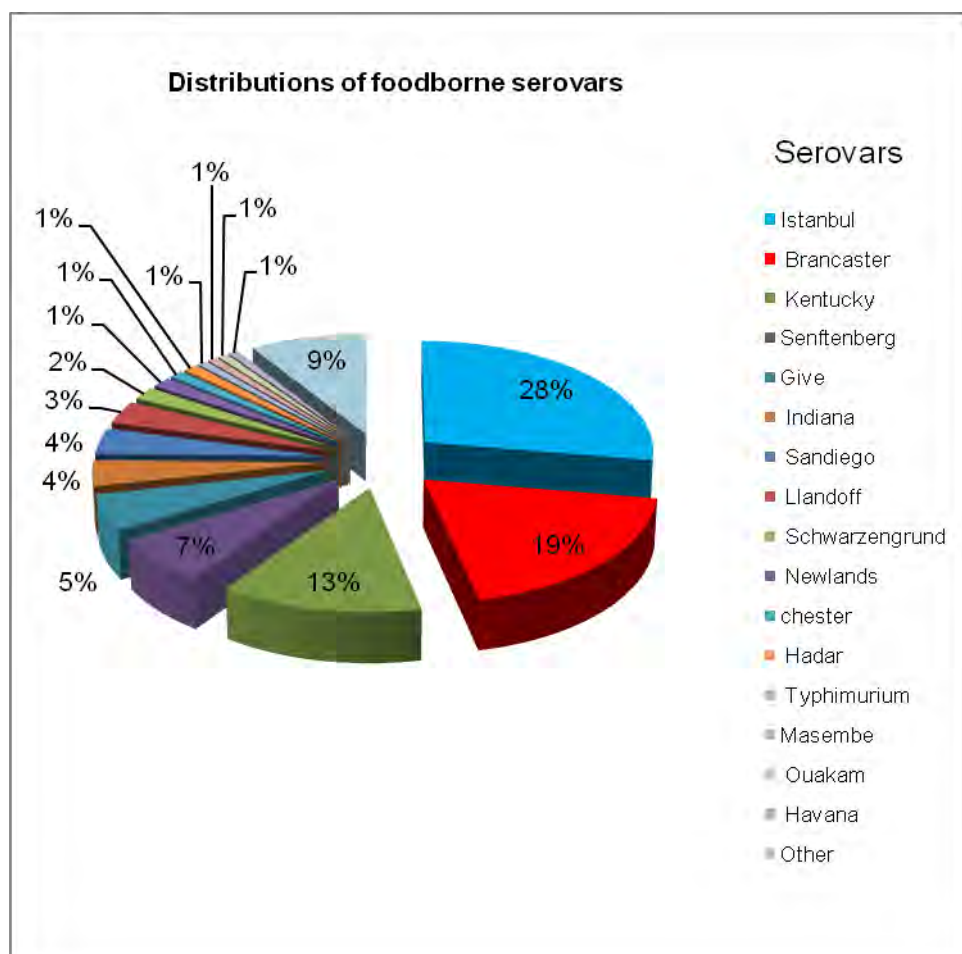


Figure 2 : Distribution of serovars

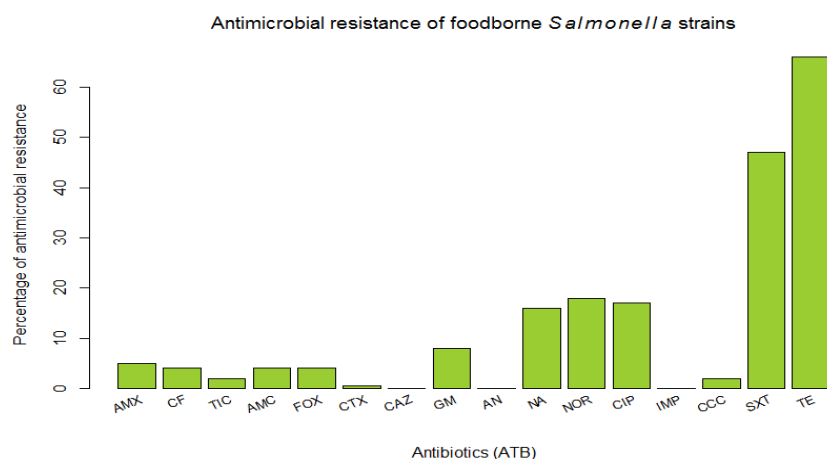


Figure 3: *Salmonella* percentage resistance to antibiotics

AM : amoxicillin, **TIC** : ticarcillin, **CF** : cefalotin, **FOX** : cefoxitin, **CTX** : cefotaxim, **AMC** : Amoxicillin + clavulanic acid, **CAZ** : ceftazidim, **IMP** : imipenem, **GM** : gentamicin, **AN** : amikacin, **NA** : nalidixic acid **TE** : tetracyclin, **NOR** : norfloxacin, **CIP** : ciprofloxacin, **SXT** : triméthoprim + sulfaméthoxazol **C** : chloramphénicol

Résumé

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
 ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT
 FACULTE (OU ECOLE) : FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE
 THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie et Pathologies Humaines

Résumé

Nom et prénoms de la Candidate : Ndéye Khote FALL-NIANG

Titre de la thèse : Evaluation de l'antibiorésistance des souches de salmonelles d'origine alimentaire, animale et humaine

Date et lieu de soutenance : le 29 janvier 2016

Jury

Président : Cheikh Saad-bouh BOYE, Professeur, (FMPO, UCAD, Dakar)

Membres : Mbacké SEMBENE, Professeur, (FST, UCAD, Dakar)

Rianatou BADA ALAMBEDJI, Professeur, (EISMV, UCAD, Dakar)

Nicolas BARRO, Professeur, (FS, Univ OUAGADOUGOU)

Ngor FAYE, Maître de Conférences, (FST, UCAD, Dakar)

Amy GASSAMA-SOW, Professeur, (ESP/UCAD, IPD)

Résumé : Selon l'OMS la sécurité sanitaire des aliments doivent porter sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation. Les maladies d'origine alimentaire posent un problème de santé publique à travers le monde et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Ces maladies peuvent être provoquées par des bactéries du genre *Salmonella*, des virus et des parasites ou des substances chimiques qui pénètrent dans l'organisme par le biais d'eau ou d'aliments contaminés. Il est important de comprendre comment les organismes pathogènes telle que *Salmonella* entrent dans la chaîne alimentaire et s'y propagent afin d'éviter ou de réduire le plus possible l'exposition des consommateurs à ces agents. Il s'agit donc d'un réel problème de Santé Publique nécessitant la mise en place d'un système de surveillance efficace permettant le recueil de données à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire, mais aussi à partir de maladies humaines transmissibles par les aliments. De plus, l'émergence de souches animales multirésistantes aux antibiotiques transmises à l'homme via l'alimentation est un facteur potentiel d'aggravation de la situation.

L'objectif de cette étude nommée AGISAR était de rechercher simultanément des salmonelles chez des patients présentant des diarrhées, chez les carcasses de poulets et au niveau des fèces de poulets et de faire la caractérisation moléculaire. C'était une étude prospective entre juillet 2012 et juillet 2013. La coproculture était utilisée pour la recherche des salmonelles au niveau des selles. *Salmonella* était recherchée selon la norme ISO 6579 (2002), *Salmonella* était recherchée selon la norme (ISO 6579:2002/Amd1: 2007) respectivement pour les poulets et les fèces de poulets. Les antibiogrammes et le sérotypage étaient effectués selon des techniques standards. Les CMI étaient déterminées par E-test pour les souches résistantes à NA et à la CIP. Au total 80 souches de salmonelles d'origine humaine, alimentaire et animale ont été sélectionnées pour faire la caractérisation des supports génétiques de la résistance et la recherche des facteurs de virulence.

Au total **300** prélèvements de carcasses de poulets, **268** prélèvements de selles ou de fientes de poulets et **186** prélèvements de selles de patients ont été effectués. La prévalence des salmonelles était de **5%** chez les humains, **18%** avec les fèces de poulets et de **53%** avec les carcasses de poulets. Ainsi, *S. Kentucky*, *S. Brancaster*, *S. Senftenberg*, *S. Sandiego* et *S. Istanbul* étaient majoritaires avec un pic d'apparition en période de chaleur (Juin-Juillet). Les *int1* était détectée en majorité (33%) suivi des *int2* et les *int3* n'étaient pas représentés. Le séquençage de la région 36854/36855 au niveau de l'*int1* avait permis de détecter trois types de cassettes *dfr* (*dfrA7*, *dfrA15*), *aacCA5*, *aadA7*. Les salmonelles présentaient des résistances aux quinolones avec des CMI de NA CMI >256 µg/ml et de la CIP CMI >32 µg/ml. Cette résistance était codée par les gènes *qnr*, l'*aac(6')-Ib-cr* et des mutations au niveau du gène *gyrB* et le gène *parE*. Les isolats possédaient des supports génétiques de la virulence (*invA*, *orfL*, *spiC*, *pipD*, *spvR*, *sopB* et *misL*) surtout avec les souches d'origines humaines et animales indiquant une importante pathogénicité réelle des souches circulantes.

La présence des gènes transférables, du SGI et les intégrons favorisent la dissémination de la résistance et l'échec thérapeutique.

Les professionnels vétérinaires doivent faire preuve de vigilance aussi bien dans la prescription que dans l'utilisation de ces antibiotiques. La prévention et la communication doivent être prioritairement axées dans les secteurs en amont des stades de distribution pour assurer la santé des populations. Cette étude confirme la nécessité de suivre les recommandations de l'OMS en 2015 sur la sécurité sanitaire des aliments «**de la ferme à l'assiette**».

Mots clés : Surveillance intégrée, antibiorésistance, salmonelles, aliments, animaux, humains

Title: Evaluation of the antibiotic resistance of *Salmonella* strains from food, animal and human

Summary

According to WHO, food safety should cover the entire food chain, from production to consumption. Food-borne diseases are a public health problem across the world and particularly in developing country. These diseases can be caused by bacteria as same *Salmonella*, viruses and parasites or chemical substances that enters to the body through of contaminated water or food. It is important to understand how pathogens such as *Salmonella* enters the food chain and be spread, it to avoid or minimize consumer exposure to these agents. So this is a real public health problem requiring the establishment of an effective monitoring system for data collection at all stages of the food production chain, but also from transmissible human diseases food. Moreover, the emergence of animal strains multiresistant to antibiotics transmitted to humans through food is a potential factor of aggravation of the situation.

The objective of this study was to simultaneously search *salmonella* in patients with diarrhea, in chicken carcasses and the faeces of chickens and do the molecular characterization. It was a prospective study between July 2012 and July 2013. Stool culture was used for *salmonella* research in the stool. *Salmonella* was isolated according to standard ISO 6579 (2001), *Salmonella* was searched according to the standard (ISO 6579: 2002 / Amd1: 2007) respectively for chickens and chicken faeces. Susceptibility testing and serotyping were performed according to standard techniques. The MICs were determined by E-test for resistant strains to NA and the CIP. A total of 80 *Salmonella* strains isolated from human, animal and food were selected to do the characterization of the genetic supports of the resistance and the search for virulence factors.

In total 300 samples carcasses of chicken, 268 samples of chicken faeces and 186 stool samples of patients were taken. The prevalence of *Salmonella* was **5%** in humans, **18%** with the feces of chickens and **53%** with the chicken carcasses.

Thus, *S. Kentucky*, *S. Brancaster*, *S. Senftenberg*, *S. Sandiego* and *S. Istanbul* were majority majority with a peak during the summer period (June-July). *Int1* was detected in the majority (33%) followed by *int2* and *int3* are not represented. The Sequencing of the 36854/36855 region at *int1* led to the detection of three types of cassettes *dfr* (*dfrA7*, *dfrA15*) *aacCA5*, *aadA7*. *Salmonella* presented resistance to quinolones with MIC NA MIC > 256 ug / ml and CIP MIC > 32 mg / ml. This resistance was coded by genes *qnr*, *aac* (6') - *Ib-cr* and mutations of the gene *parE* and *gyrB*. The isolates had genetic supports of virulence (*invA*, *orfL*, *spiC*, *pipD*, *sopB* and *misL*) especially with strains of human and animal origin indicating a significant real pathogenicity of circulating strains. The presence of transferable genes, SGI and incorporate promote dissemination of resistance.

Veterinary professionals must be vigilant in both prescription and in the use of these antibiotics. Prevention and communication should be focused primarily in upstream sectors of distribution stages to ensure the health of populations. This study confirms the need to follow the recommendations of the WHO in 2015 on the food safety "**from farm to food**".

Keywords: integrated surveillance, antimicrobial resistance, *Salmonella*, food, animals, human

Résumé

Selon l'OMS la sécurité sanitaire des aliments doivent porter sur l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la production à la consommation. Les maladies d'origine alimentaire posent un problème de santé publique à travers le monde et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Ces maladies peuvent être provoquées par des bactéries du genre *Salmonella*, des virus et des parasites ou des substances chimiques qui pénètrent dans l'organisme par le biais d'eau ou d'aliments contaminés. Il est important de comprendre comment les organismes pathogènes telle que *Salmonella* entrent dans la chaîne alimentaire et s'y propagent afin d'éviter ou de réduire le plus possible l'exposition des consommateurs à ces agents. Il s'agit donc d'un réel problème de Santé Publique nécessitant la mise en place d'un système de surveillance efficace permettant le recueil de données à toutes les étapes de la chaîne de production alimentaire, mais aussi à partir de maladies humaines transmissibles par les aliments. De plus, l'émergence de souches animales multirésistantes aux antibiotiques transmises à l'homme via l'alimentation est un facteur potentiel d'aggravation de la situation.

L'objectif de cette étude nommée AGISAR était de rechercher simultanément des salmonelles chez des patients présentant des diarrhées, chez les carcasses de poulets et au niveau des fèces de poulets et de faire la caractérisation moléculaire. C'était une étude prospective entre juillet 2012 et juillet 2013. La coproculture était utilisée pour la recherche des salmonelles au niveau des selles. *Salmonella* était recherchée selon la norme ISO 6579 (2002), *Salmonella* était recherchée selon la norme (ISO 6579:2002/Amd1: 2007) respectivement pour les poulets et les fèces de poulets. Les antibiogrammes et le sérotypage étaient effectués selon des techniques standards. Les CMI étaient déterminées par E-test pour les souches résistantes à NA et à la CIP. Au total 80 souches de salmonelles d'origine humaine, alimentaire et animale ont été sélectionnées pour faire la caractérisation des supports génétiques de la résistance et la recherche des facteurs de virulence.

Au total 300 prélèvements de carcasses de poulets, 268 prélèvements de selles ou de fientes de poulets et 186 prélèvements de selles de patients ont été effectués. La prévalence des salmonelles était de 5% chez les humains, 18% avec les fèces de poulets et de 53% avec les carcasses de poulets. Ainsi, *S. Kentucky*, *S. Brancaster*, *S. Senftenberg*, *S. Sandiego* et *S. Istanbul* étaient majoritaires avec un pic d'apparition en période de chaleur (Juin-Juillet). Les *int1* était détectée en majorité (33%) suivi des *int2* et les *int3* n'étaient pas représentés. Le séquençage de la région 36854/36855 au niveau de l'*int1* avait permis de détecter trois types de cassettes *dfr* (*dfrA7*, *dfrA15*), *aacCA5*, *aadA7*. Les salmonelles présentaient des résistances aux quinolones avec des CMI de NA CMI >256 µg/ml et de la CIP CMI >32 µg/ml. Cette résistance était codée par les gènes *qnr*, l'*aac(6')-Ib-cr* et des mutations au niveau du gène *gyrB* et le gène *parE*. Les isolats possédaient des supports génétiques de la virulence (*invA*, *orfL*, *spiC*, *pipD*, *sopB* et *misL*) surtout avec les souches d'origines humaines et animales indiquant une importante pathogénicité réelle des souches circulantes. La présence des gènes transférables, du SGI et les intégrons favorisent la dissémination de la résistance et l'échec thérapeutique.

Les professionnels vétérinaires doivent faire preuve de vigilance aussi bien dans la prescription que dans l'utilisation de ces antibiotiques. La prévention et la communication doivent être prioritairement axées dans les secteurs en amont des stades de distribution pour assurer la santé des populations. Cette étude confirme la nécessité de suivre les recommandations de l'OMS en 2015 sur la sécurité sanitaire des aliments «**de la ferme à l'assiette**».

Evaluation of the antibiotic resistance of *Salmonella* strains from food, animal and human

Summary

According to WHO, food safety should cover the entire food chain, from production to consumption. Food-borne diseases are a public health problem across the world and particularly in developing country. These diseases can be caused by bacteria as same *Salmonella*, viruses and parasites or chemical substances that enters to the body through of contaminated water or food. It is important to understand how pathogens such as *Salmonella* enters the food chain and be spread, it to avoid or minimize consumer exposure to these agents. So this is a real public health problem requiring the establishment of an effective monitoring system for data collection at all stages of the food production chain, but also from transmissible human diseases food. Moreover, the emergence of animal strains multiresistant to antibiotics transmitted to humans through food is a potential factor of aggravation of the situation.

The objective of this study was to simultaneously search *salmonella* in patients with diarrhea, in chicken carcasses and the faeces of chickens and do the molecular characterization. It was a prospective study between July 2012 and July 2013. Stool culture was used for *salmonella* research in the stool. *Salmonella* was isolated according to standard ISO 6579 (2001), *Salmonella* was searched according to the standard (ISO 6579: 2002 / Amd1: 2007) respectively for chickens and chicken faeces. Susceptibility testing and serotyping were performed according to standard techniques. The MICs were determined by E-test for resistant strains to NA and the CIP. A total of 80 *Salmonella* strains isolated from human, animal and food were selected to do the characterization of the genetic supports of the resistance and the search for virulence factors.

In total 300 samples carcasses of chicken, 268 samples of chicken faeces and 186 stool samples of patients were taken. The prevalence of *Salmonella* was 5% in humans, 18% with the feces of chickens and 53% with the chicken carcasses. Thus, *S. Kentucky*, *S. Brancaster*, *S. Senftenberg*, *S. Sandiego* and *S. Istanbul* were majority majority with a peak during the summer period (June-July). *Int1* was detected in the majority (33%) followed by *int2* and *int3* are not represented. The Sequencing of the 36854/36855 region at *int1* led to the detection of three types of cassettes *dfr* (*dfrA7*, *dfrA15*) *aacCA5*, *aadA7*. *Salmonella* presented resistance to quinolone with MIC NA MIC > 256 ug / ml and CIP MIC > 32 mg / ml. This resistance was coded by genes *qnr*, *aac (6') - Ib-cr* and mutations of the gene *are* and *gyrB*. The isolates had genetic supports of virulence (*invA*, *orfL*, *spiC*, *pipD*, *sopB* and *misL*) especially with strains of human and animal origin indicating a significant real pathogenicity of circulating strains. The presence of transferable genes, SGI and incorporate promote dissemination of resistance.

Veterinary professionals must be vigilant in both prescription and in the use of these antibiotics. Prevention and communication should be focused primarily in upstream sectors of distribution stages to ensure the health of populations. This study confirms the need to follow the recommendations of the WHO in 2015 on the food safety “**from farm to food**”.

Discipline : Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement

MOTS-CLES : Surveillance intégrée, antibiorésistance, salmonelles, aliments, animaux, humains

ED-SEV, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop BP 5005. Fann. Dakar-Sénégal