



Maisons-Alfort, le 16 octobre 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'avis sur deux projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus*

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

Rappel de la saisine

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 8 juillet 2009 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) d'une demande d'avis sur deux projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus*. Cette saisine fait suite à sept saisines relatives à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus* : les saisines 2000-SA-0335, 2006-SA-0342, 2007-SA-0141, 2007-SA-0366, 2007-SA-0380, 2008-SA-0202 et 2008-SA-0254.

Par ailleurs, il est demandé parallèlement à l'Afssa d'évaluer l'opportunité de prendre en compte dès aujourd'hui l'augmentation de la fréquence d'isolement chez l'homme (en France et dans certains pays européens) de souches de sérotype Typhimurium monophasiques ou immobiles, dits « Typhimurium-like ».

Avis du Comité d'experts spécialisé « Santé animale »

Le Comité d'experts spécialisé « Santé animale » (CES SA), réuni le 9 septembre 2009, formule l'avis suivant :

« Contexte et questions posées »

Les salmonelloses demeurent la première cause identifiée de toxi-infection alimentaire en Europe. Ainsi, en 2007, elles étaient responsables à elles seules de 2 201 foyers de toxi-infection alimentaire sur les 5 609 foyers rapportés dans l'Union européenne, soit 39,2% des foyers (Community summary report, 2009). Ceci justifie pleinement que la lutte contre les salmonelles demeure une priorité européenne.

*Comme les années précédentes, les deux sérotypes impliqués les plus importants étaient Enteritidis et Typhimurium, responsables à eux deux de plus de 70% des foyers de salmonellose identifiés, de 1 565 hospitalisations et de dix décès. En outre, en 2007, plus de 45% des foyers de salmonellose ont été associés à la consommation d'œufs ou de viande de poulet (Community summary report, 2009). Il paraît donc normal que l'accent ait été mis d'abord sur la lutte contre ces deux sérotypes, d'une part, et sur la lutte contre les salmonelles dans l'espèce poule (*Gallus gallus*), d'autre part. Cette lutte contre les infections des troupeaux aviaires par les salmonelles a d'ailleurs eu un impact concret (réduction de l'ordre de 20%) sur l'incidence des salmonelloses humaines en France (Poirier et al., 2006).*

De façon globale, dans l'Union européenne, Enteritidis est plutôt associé aux œufs et à la viande de poulet, tandis que Typhimurium est plutôt associé à la viande de porc, de volaille et de bovins (Community summary report, 2009). La situation actuelle au niveau européen ne diffère donc guère de la situation rencontrée en France, comme le rapportaient Delmas et al. en 2006 : Enteritidis apparaissait quasi inféodé aux filières avicoles (95% des

souches de ce sérotype isolées par le réseau *Salmonella* proviennent de cette filière, Moury et al., 2006) tandis que, pour *Typhimurium*, 50 à 55% des souches isolées de cas humains avaient comme sources les filières avicoles, alors que 40% d'entre elles avaient comme source la filière bovine (Delmas et al., 2006).

La lutte contre les infections à *Salmonella Enteritidis* (SE) et *Salmonella Typhimurium* (STm) dans l'espèce *Gallus gallus* a été initiée dans les années 1980 dans l'Ouest de la France par les accoueurs. Elle a été ensuite renforcée en 1992 par l'organisation d'un contrôle officiel hygiénique et sanitaire (COHS), avant que la maladie devienne maladie animale réputée contagieuse (MARC) en 1995, avec mise en place de la prophylaxie collective obligatoire en 1998 (Ganière et al., 2005). Depuis 2000, la France a connu une évolution progressive de la réglementation relative à la lutte contre les salmonelles en élevages de l'espèce poule (filieres poule pondeuse et poulet de chair), parallèlement à l'évolution de la réglementation européenne, avec notamment l'élargissement du champ de la lutte à cinq sérotypes en 2007 (avis 2006-SA-0342). A *Typhimurium* et *Enteritidis* sont venus s'ajouter trois sérotypes supplémentaires (Hadar, Infantis et Virchow) qui figuraient parmi les sérotypes majoritairement isolés, tant chez l'homme que chez les volailles en Europe (derrière toutefois *Typhimurium* et *Enteritidis*).

La mise en œuvre de cette réglementation avait comme objectif affiché (dans un but de santé publique) la **réduction de la prévalence** selon des critères établis par la Commission européenne [règlement (CE) N° 2160/2003], sur la base d'une enquête communautaire (« baseline studies »). Pour la France, la situation initiale était favorable, avec toutefois la fixation d'objectifs ambitieux de réduction de la prévalence d'ici à fin 2009. Ainsi, l'objectif de prévalence pour les cinq sérotypes visés a été fixé à un **plafond de 1% chez les reproducteurs en 2009**, pour une prévalence estimée en France à 3% en 2006.

En fait, l'année 2007 a été la première année d'application des programmes de réduction de la prévalence [élément rappelé dans le quatrième considérant du règlement (CE) N° 213/2009]. Les résultats de la surveillance par les Etats-Membres, pour cette année 2007, ont été communiqués à la Commission (cinquième considérant) et c'est sur la base des résultats de deux années calendaires successives [article 2.1.1. de la nouvelle version de l'annexe du règlement (CE) N° 1003/2005] que **l'allègement du nombre de contrôles, officiels** essentiellement, peut être autorisé (sixième considérant ; le nombre de contrôles à la charge de l'exploitant peut être réduit aussi dans le cas de contrôles à l'exploitation). L'annexe du règlement (CE) N° 1003/2005 qui fixe le programme de tests nécessaire pour vérifier l'objectif communautaire de réduction de la prévalence de ces cinq sérotypes a donc été revue en ce sens. La France est concernée, car elle a justement atteint ces objectifs sur deux années calendaires consécutives (2007 et 2008), avec, respectivement, une prévalence de la contamination par les cinq sérotypes visés des troupeaux de reproducteurs (en période de ponte) de *Gallus gallus* dans les deux filières de 0,6% et 0,54% pour 2007 et 2008. Le taux d'infection des troupeaux reproducteurs s'avère contrôlé dans les deux filières et aux différents étages, y compris pendant la période d'élevage (poulettes, préponde) (cf. annexe 1).

D'autre part, il est fait état de **l'augmentation récente de l'isolement** en France et dans certains pays européens, tant chez l'Homme qu'en élevages avicoles, de souches dites « **Typhimurium-like** » (souches monophasiques ou immobiles), qui ne rentrent pas sensu stricto dans le cadre réglementaire alors qu'elles sont génétiquement proches si ce n'est identiques aux souches de sérotype *Typhimurium* habituellement isolées. En corollaire, se pose le problème de l'isolement de ces souches avec la méthode de référence dans l'Union européenne (ISO 6579) fondée sur l'utilisation du milieu Rappaport-Vassiliadis semi solide (MRSV) qui ne permet pas d'isoler des souches immobiles, alors que la méthode de référence française (NF U47-100, avec un second milieu d'enrichissement) le permet. Dans ce contexte, il nous est demandé d'évaluer l'opportunité de quatre scénarios différents au regard du risque pour la santé publique :

- 1- l'attente de données plus précises ;
- 2- la demande aux laboratoires d'analyse agréés et reconnus d'adresser systématiquement au Laboratoire national de référence (LNR) les souches OMA 1,4,[5],12 (Typhimurium-like), mais sans contrainte de délai pour le LNR ;
- 3- la dite demande mais avec caractérisation immédiate et mise en œuvre de mesures de police sanitaire en cas de profil similaire à STm ;
- 4- la mise en œuvre immédiate de mesures de police sanitaire classiques en cas d'isolement d'une souche suspecte d'être Typhimurium-like.

Méthode d'expertise

L'expertise collective a été réalisée sur la base d'un rapport initial, rédigé par trois rapporteurs, qui a été présenté, discuté en séance et validé par le CES SA réuni le 9 septembre 2009. Elle s'est appuyée sur :

- les documents accompagnant la saisine, à savoir :
 - les deux projets d'arrêtés ;
 - les textes comportant les modifications apportées à ces arrêtés ;
 - le tableau récapitulatif des 12 troupeaux de reproducteurs de *Gallus gallus* révélés positifs en France vis-à-vis de l'un au moins des cinq sérotypes visés par la réglementation en 2007 et 2008 ;
- les rapports et avis précédents relatifs à la lutte contre les salmonelles en élevages de l'espèce poule ;
- le règlement (CE) N° 213/2009 de la Commission du 18 mars 2009 modifiant le règlement (CE) N° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil, et le règlement (CE) N° 1003/2005 en ce qui concerne le contrôle et le dépistage des salmonelles dans les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* et de dindes ;
- Community Summary Report on Foodborne Outbreaks in the European Union in 2007, The EFSA Journal (2009), 271 ;
- le règlement (CE) N° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire ;
- le règlement (CE) N° 1003/2005 de la Commission du 30 juin 2005 portant application du règlement (CE) N° 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la fixation d'un objectif communautaire de réduction de la prévalence de certains sérotypes de salmonelles dans les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* et portant modification du règlement (CE) N° 2160/2003 ;
- les publications de l'EFSA dans le domaine des toxi-infections alimentaires en général et des salmonelloses en particulier ;
- les publications se rapportant, en France, aux toxi-infections alimentaires, aux salmonelloses et à la réglementation relative aux infections des parquets de volailles par les salmonelles ;
- les réponses apportées par la DGAI aux questions du CES SA ;
- les données du CNR des *Salmonella* de l'Institut Pasteur de Paris ;
- les données du réseau *Salmonella* de l'Afssa Lerqap ;
- la bibliographie relative au sujet.

Argumentaire

Deux demandes sont effectuées par la DGAI :

- la première consiste en l'examen des modifications concernant les projets d'arrêtés de lutte contre les salmonelles dans l'espèce poule, avec un accent porté sur les possibilités d'allègement du protocole de dépistage officiel (mais aussi du dépistage à charge des exploitants) de ces infections, offertes à la France en raison de sa bonne situation épidémiologique ;

- la seconde consiste à évaluer l'opportunité de prendre en compte l'augmentation de la fréquence d'isolement chez l'homme de souches « Typhimurium-like », auquel cas les arrêtés seraient modifiés en conséquence.

1. Concernant les modifications apportées aux arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux reproducteurs de l'espèce Gallus gallus, ainsi que dans les troupeaux producteurs d'œufs de consommation de Gallus gallus

Le règlement (CE) N° 213/2009 de la Commission relatif au contrôle et au dépistage des salmonelles dans les cheptels reproducteurs (filières chair et ponte) de Gallus gallus et de dindes laisse le choix à l'autorité compétente de chaque Etat-Membre d'effectuer les prélèvements au couvoir ou dans l'exploitation (sauf pour les exploitations se consacrant à l'exportation, qui doivent réaliser les prélèvements au couvoir). La France a choisi les prélèvements au couvoir en espèce Gallus gallus.

1.1. Modifications relatives à l'allègement possible des modalités de prélèvement

Il a été demandé à l'Administration qu'il n'y ait pas plus de deux prélèvements sur le site de l'exploitation et à l'initiative de l'exploitant : un prélèvement en début de ponte et un prélèvement en fin de ponte. Ces deux prélèvements seraient complétés par un prélèvement « officiel », par les services vétérinaires, en milieu de ponte. Cette proposition revient à supprimer deux prélèvements pour les reproducteurs de la filière chair, et un prélèvement pour les reproducteurs de la filière ponte (et non l'inverse comme indiqué dans la lettre de saisine).

Des possibilités d'allègement du dispositif (diminution du nombre de contrôles, officiels pour l'essentiel) sont laissées à disposition des Etats-Membres satisfaisant aux conditions (sous le seuil fixé pour l'objectif communautaire de prévalence pendant deux années calendaires consécutives). Elles sont reprises dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Nombre et fréquence minimaux des prélèvements exigés par le règlement (CE) N° 213/2009. En rouge et en italique apparaissent les dérogations possibles dans le cas de la France.

Option choisie	Prélèvement au couvoir, cas général	Prélèvement à l'exploitation Obligatoire en cas d'exportation
Fréquence des prélèvements par exploitant	Couvoir : Toutes les 2 semaines <i>pas de dérogation possible</i>	Toutes les 2 semaines <i>dérogation : cadence 3 semaines possible</i>
Fréquence des prélèvements officiels	Couvoir : 1 prélèvement toutes les 16 semaines <i>dérogation 1 fois par an</i> Exploitation : 2 prélèvements (4 semaines après l'entrée en ponte et 8 semaines avant la réforme) <i>dérogation : 1 seule fois à n'importe quel moment</i>	Exploitation : 3 prélèvements dans l'exploitation (4 semaines après l'entrée en ponte, 8 semaines avant la réforme, et à un autre moment éloigné) <i>dérogation : 2 prélèvements seulement</i>

L'annexe 1 relative aux modalités de prélèvement a donc été profondément remaniée en ce qui concerne la première partie (« Troupeaux de volailles de reproduction »). Néanmoins, le texte apparaît très proche de la version précédente (du 26 février 2008), même s'il distingue désormais, conformément au règlement (CE) N° 213/2009 (voir tableau 2), les exploitations dont la totalité des œufs à couver est destinée à l'exportation (intra- ou extracommunautaire, article 1.2.5.) des autres exploitations (article 1.2.3.), puisque, dans le cas de ces exploitations exportatrices, les échantillons doivent être

prélevés dans l'exploitation (et non au couvoir comme c'est le cas pour les autres). Pour les exploitations exportatrices, il y a donc plutôt un **renforcement** du dispositif, même si le passage à une cadence de trois semaines est autorisé à titre dérogatoire.

Concernant spécifiquement la **possibilité d'allègement**, elle apparaît désormais dans les arrêtés modifiés :

- pour les exploitations non exportatrices : annexe I, point 1.2.4. (arrêté ponte) et 2.3. (arrêté chair), avec désormais un contrôle annuel par troupeau au couvoir au lieu des contrôles toutes les 16 semaines exigés auparavant ;
- pour les exploitations dont la totalité des œufs à couvrir est destinée à l'exportation : annexe I, point 1.2.5 (arrêté ponte) et 2.4. (arrêté chair) avec la possibilité de passer à une fréquence de recherche toutes les trois semaines, au lieu de toutes les deux semaines, conformément au règlement (CE) N° 213/2009 (le passage à une cadence de trois semaines n'est pas permis dans l'option « couvoir »).

Les **modifications introduites dans le dispositif de dépistage** sont donc les suivantes :

- En **période d'élevage** (ou « préponde »), il n'y a pas de modification du dispositif.

- En revanche, des modifications concernent le dispositif en **période de ponte**. Ainsi, si l'on compare les exigences, avant et après modification des arrêtés, en termes de prélèvements à effectuer dans le cadre de ce dépistage sur les reproducteurs, et pour les deux filières :

1- Cas général, prélèvements au couvoir :

- a. le moment le plus adapté pour la réalisation de l'échantillonnage au couvoir est précisé ;
- b. les modalités de prélèvement au couvoir ont été revues, avec notamment la possibilité d'utilisation d'une chiffonnette, et correspondent désormais aux pratiques reconnues en France ;
- c. le contrôle officiel n'intervient plus qu'annuellement au lieu d'une fois toutes les 16 semaines auparavant ;

2- Prélèvements sur l'exploitation :

- a. dans le cas général, le nombre total de moments de prélèvements est identique, mais, désormais, tous se font avec un protocole « allégé » (avec deux paires de chaussettes notamment contre cinq dans le protocole complet), alors que, auparavant, deux se faisaient selon le protocole complet ;
- b. pour les exploitations dont la totalité des œufs à couvrir est destinée à l'exportation, les prélèvements doivent désormais se faire sur l'exploitation, et uniquement selon un protocole complet. La dérogation peut s'appliquer ici. A noter qu'ici aussi, les chiffonnettes ont été mieux intégrées dans les matrices de prélèvement possibles, remplaçant les échantillons composites de fientes fraîches auparavant préconisés.

D'autre part, en filière « œufs de consommation », il n'y a pas de changement concernant les modalités du dépistage en volailles de rente (production).

Pour rendre compte des modifications introduites par les nouveaux arrêtés, deux tableaux récapitulatifs ont été établis (tableaux 2 et 3, ci-après). On y constate que :

- La possibilité de dérogation au couvoir se voit appliquée dans les deux filières ;
- Les prélèvements officiels sont allégés (un au lieu de deux) mais en même temps remplacés par des prélèvements obligatoires à l'initiative de l'exploitant, aux dates clés à l'origine de la majorité des suspicions en 2007-2008 ;
- Le nombre d'échantillons soumis à analyse est au bilan légèrement inférieur.

Tableau 2. Comparaison des prélèvements (au stade production) réalisés en **filière chair** avant et après modifications des arrêtés, tenant compte de la possibilité de dérogation accordée à la France (cas général d'exploitations non exportatrices).

Version de l'arrêté	Âge ou fréquence	Lieu d'échantillonnage	Responsable du prélèvement	Nombre d'échantillons pour l'analyse à chaque prélèvement
Arrêté du 26 février 2008	Toutes les 2 semaines Toutes les 16 semaines	Couvoir	Exploitant VS*	1
<i>Arrêté modifié</i>	<i>Toutes les 2 semaines</i> Une fois par an	<i>Couvoir</i>	<i>Exploitant</i> VS	1
Arrêté du 26 février 2008	A 34, 42 et 50 semaines A 26 semaines et au cours des 8 semaines avant la réforme	Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)	Propriétaire DDSV	2 3
<i>Arrêté modifié</i>	<i>A 26, 34, 42 et 50 semaines et 8 semaines avant la réforme</i> Dont un prélèvement	<i>Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)</i>	<i>Propriétaire</i> DDSV	2 2 ou 3
Arrêté du 26 février 2008	Seconde ponte : 2 semaines avant et 2 semaines après l'entrée en ponte, puis toutes les 12 semaines	Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)	Propriétaire	2
<i>Arrêté modifié</i>	<i>Seconde ponte : 2 semaines avant et 2 semaines après l'entrée en ponte, puis toutes les 12 semaines</i>	<i>Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)</i>	<i>Propriétaire</i>	2

En caractères gras : prélèvements officiels ; sur fond grisé : prélèvements dans la nouvelle version de l'arrêté.

*VS : vétérinaire sanitaire ; DDSV : direction départementale des services vétérinaires

Tableau 3. Comparaison des prélèvements (au stade production) réalisés en **filière ponte** avant et après modifications des arrêtés, tenant compte de la possibilité de dérogation accordée à la France (cas général d'exploitations non exportatrices).

Version de l'arrêté	Âge ou fréquence	Lieu d'échantillonnage	Responsable du prélèvement	Nombre d'échantillons pour l'analyse à chaque prélèvement
Arrêté du 26 février 2008	Toutes les 2 semaines Toutes les 16 semaines	Couvoir	Exploitant VS	1
<i>Arrêté modifié</i>	<i>Toutes les 2 semaines</i> Une fois par an	<i>Couvoir</i>	<i>Exploitant</i> VS	1
Arrêté du 26 février 2008	A 34 et 50 semaines	Couvoir	Exploitant	2
<i>Arrêté modifié</i>	<i>A 34 et 50 semaines</i>	<i>Couvoir</i>	<i>Exploitant</i>	2
Arrêté du 26 février 2008	A 38 et 54 semaines A 24 semaines et au cours des 8 semaines avant la réforme	Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)	Propriétaire DDSV	2 3
<i>Arrêté modifié</i>	<i>A 24, 38 et 54 semaines et 8 semaines avant la réforme</i> Dont un n'importe quand au cours du cycle	<i>Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)</i>	<i>Propriétaire</i> DDSV	2 2 à 3
Arrêté du 26 février 2008	Seconde ponte : 2 semaines avant et 2 semaines après l'entrée en ponte, puis toutes les 12 semaines	Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)	Propriétaire	2
<i>Arrêté modifié</i>	<i>Seconde ponte : 2 semaines avant et 2 semaines après l'entrée en ponte, puis toutes les 12 semaines</i>	<i>Bâtiment d'élevage (au sol ou en cage)</i>	<i>Propriétaire</i>	2

En caractères gras : prélèvements officiels ; sur fond grisé : prélèvements dans la nouvelle version de l'arrêté.

*VS : vétérinaire sanitaire ; DDSV : direction départementale des services vétérinaires

En 2007-2008, 12 élevages au total ont été trouvés positifs pour l'un des cinq sérotypes de salmonelles (tableau 4). Onze d'entre eux l'ont été grâce à des prélèvements en élevage, un seul en couvoir. Ceci conforte les experts de la Commission européenne qui « ont émis des réserves sur l'équivalence entre l'option couvoir et l'option élevage ».

*Sept des 12 élevages ont été dépistés grâce aux prélèvements officiels (apparaissant en caractères gras), dont quatre lors du premier prélèvement officiel (début de lot) et trois lors du second (fin de lot) ; or ce sont ces prélèvements qui sont l'objet de la possible dérogation. Pour éviter que « l'allègement de la pression de contrôle en élevage, par la suppression d'une ou deux dates de prélèvements, n'ait des conséquences sur la qualité sanitaire des produits en aval », la DGAI, propose de remplacer les contrôles de l'autorité compétente à des dates stratégiques (début et fin de lot), par des contrôles imposés à l'exploitant, ce qui paraît justifié. Il paraît donc **inoportun d'alléger davantage la pression de contrôle en élevage**. En effet, c'est cette dernière qui permet de détecter la majorité (11/12) des suspicions d'infection. On peut rappeler l'avis de l'EFSA, dans son rapport sur la prévalence des salmonelles dans les troupeaux de poulets de chair dans l'Union européenne en 2005-2006. L'EFSA indiquait que la prévalence dans l'Union européenne avait été estimée sur la base de prélèvements de cinq échantillons par*

troupeau, et attirait l'attention sur le **risque de sous-estimation de la prévalence** dans le cas où seulement deux échantillons par troupeau seraient utilisés (prévalence estimée à 0,2% au lieu de 0,5% en France de cette façon). Toutefois, la Commission a retenu le nombre de deux prélèvements par troupeau, nombre limité que l'on retrouve naturellement également dans les arrêtés de 2008 et les projets de modifications. Enlever en sus un certain nombre de dates de prélèvements accroîtrait encore la sous-estimation de la contamination des cheptels et n'est pas à recommander, d'autant plus qu'il s'agit de reproducteurs et que l'excrétion salmonellique est reconnue comme pouvant être intermittente, ce qui justifie une recherche au cours du temps.

Tableau 4. Origine de la suspicion des troupeaux trouvés infectés par l'un des sérotypes visés par la réglementation (source : DGAI).

Année	Sérotipe	Origine de la suspicion	Age au prélèvement
2007	Hadar	Prélèvement officiel DDSV	54 semaines
	Enteritidis	Prélèvement obligatoire exploitant	30 semaines
	Enteritidis	Prélèvement obligatoire exploitant	30 semaines
	Enteritidis	Dépistage obligatoire	36 semaines
	Infantis	Prélèvement officiel DDSV	25 semaines
	Hadar	Prélèvement officiel DDSV	26 semaines
2008	Typhimurium	Prélèvement officiel DDSV	55 semaines
	Enteritidis	Prélèvement officiel DDSV	25 semaines
	Typhimurium	Prélèvement officiel DDSV	56 semaines
	Typhimurium	Contrôle complémentaire DDSV	59 semaines
	Typhimurium	Prélèvement obligatoire exploitant (couver)	54 semaines
	Typhimurium	Prélèvement obligatoire exploitant	30 semaines

D'autres modifications sont également retrouvées dans ce texte (notamment arrêté ponte deuxième alinéa 1.2.1., troisième alinéa...) qui ne nous semblent pas devoir appeler de commentaire particulier.

En revanche, le terme « directeur départemental des services vétérinaires » a été conservé dans le texte et mériterait d'être modifié en « directeur en charge des services vétérinaires », par exemple, afin de tenir compte de la prochaine fusion des DDSV et DDAF dans le cadre de la RGPP (Révision Générale des Politiques Publiques).

1.2. Autres modifications introduites par le texte

- Une définition de la « carcasse », manquant dans la réglementation communautaire, a été ajoutée article 1 (arrêté ponte) et 2 (arrêté chair), facilitant la bonne compréhension des mesures de gestion des troupeaux infectés.
- Désormais, les analyses portent sur tous les sérotypes de salmonelles lors des contrôles de confirmation, et non plus sur les seuls sérotypes visés jusqu'ici par la réglementation [Enteritidis, Hadar, Infantis, Typhimurium et Virchow dans l'article 12 (arrêtés ponte et chair) ; Enteritidis et Typhimurium dans l'article 19 (arrêté ponte)]. Les objectifs sont :
 - (i) d'empêcher qu'échappent à l'épidémiosurveillance les élevages suspects d'être infectés par des sérotypes d'intérêt, et
 - (ii) d'anticiper la possible révision à venir des sérotypes soumis au dépistage et à la gestion par la Commission européenne.

Si le premier objectif paraît louable et de nature à améliorer la situation sanitaire des élevages de volailles, le second paraît en revanche en contradiction avec l'avis récemment émis par l'EFSA en mars 2009 (« Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in breeding hens of Gallus gallus », The EFSA Journal, 1036). Dans ce dernier, l'EFSA considère que le bénéfice tiré de l'extension de la lutte à trois sérovars supplémentaires en 2007 est marginal et faible, et que le choix d'autres sérovars que Typhimurium et Enteritidis (considérés tous deux « de la plus haute importance ») doit être adapté à la situation particulière de chaque Etat-Membre.

En effet, dans l'avis de l'EFSA de mars 2009, on retrouve les données relatives aux salmonelloses dans l'Union européenne en 2000-2001, époque à laquelle Enteritidis et Typhimurium représentaient 72 à 87 % des sérotypes identifiés lors de salmonellose humaine (dans neuf pays), ainsi qu'en 2006-2007, alors que ces mêmes sérotypes représentaient toujours 81 à 85% des sérotypes identifiés lors de salmonellose humaine (dans 22 pays). En outre, dans l'annexe 2 du présent avis (page 51 du rapport EFSA) résultant de l'analyse de la contribution des différents sérotypes et des différentes filières (chair et ponte) aux salmonelloses alimentaires en 2007, la place de ces deux sérotypes demeure prépondérante.

- Il est à noter qu'en conséquence de la modification introduite dans les articles 12 et 19, le titre de l'annexe I est modifié, avec suppression de la mention des noms des cinq sérotypes. Toutefois, dans les deux projets d'arrêtés, le nom Enteritidis y figure toujours et doit être supprimé.
- Dans les articles 23 (arrêté chair) et 25 (arrêté ponte), le terme « obligatoires » remplace « officiels ». Ceci correspond au transfert de la responsabilité du prélèvement à l'exploitant pour éviter de diminuer le nombre de prélèvements effectués dans les élevages.
- Les articles 25 (arrêté chair) et 27 (arrêté ponte) ont été modifiés pour distinguer le devenir des viandes fraîches, abats, etc. issus de carcasses de volailles provenant d'un troupeau dans lequel l'infection a été confirmée, selon qu'une infection généralisée par Salmonella enterica subsp. enterica a, ou non, été mise en évidence. En outre, des termes conformes à ceux employés dans le Paquet Hygiène ont été utilisés. Ces articles incluent une mise en cohérence du devenir des carcasses et des viscères issus de troupeaux positifs avec l'arrêté « poulet de chair » (en cours de modification pour intégrer les dindes d'engraissement, cf. saisine 2009-SA-0187). Ils n'appellent pas de commentaire particulier.
- Dans l'annexe II (arrêté ponte), l'insertion de l'INUAV (identifiant national unique ateliers de volailles) dans les documents accompagnant les prélèvements est désormais précisée.

2. Opportunité de prise en compte de l'augmentation de la fréquence d'isolement chez l'homme de souches « Typhimurium-like »

2.1. Précisions sur les souches analysées dans la saisine

La dénomination « Typhimurium-like » utilisée dans le document ne correspond pas à une appellation officiellement reconnue, mais elle présente un intérêt pratique. Elle permet de regrouper l'ensemble des souches proches de S. Typhimurium, mais qui ont perdu une des deux phases flagellaires (souches monophasiques), et les souches ayant perdu les deux phases flagellaires (souches devenant alors immobiles). Ces souches sont proches en termes de sérotypage, partageant avec Typhimurium les antigènes somatiques O (de paroi) et une partie des antigènes flagellaires H. Pour mémoire, la formule antigénique complète de Typhimurium comporte :

- les antigènes somatiques O 1,4,[5],12 ; le facteur 1 est souligné car il peut être exprimé suite à l'acquisition d'un phage, le facteur cinq est entre crochets car son expression est variable ;
- les antigènes flagellaires H, sous deux phases : en phase 1, l'antigène i, et en phase 2, les antigènes 1,2.

D'un point de vue taxonomique, ces souches dérivées de la formule antigénique du sérotype Typhimurium : 1,4,[5],12 :i :1,2 peuvent donc également apparaître sous plusieurs formules antigéniques, puisque les déterminants antigéniques 1 et 5 peuvent être absents (tableau 5) :

Tableau 5. Formules antigéniques pouvant être rencontrées chez les variants du sérotype Typhimurium (souches « Typhimurium-like »).

Formule antigénique identifiée			Conclusion	Commentaires
Antigènes somatiques O	Antigènes flagellaires H			
	en phase 1	en phase 2		
<u>1</u> ,4,[5],12 :	i :	-	Variant monophasique du sérotype Typhimurium	Perte de l'expression de la deuxième phase flagellaire codée par le gène <i>fliB</i>
<u>1</u> ,4,[5],12 :	- :	1,2		Perte de l'expression de la première phase flagellaire codée par le gène <i>fliC</i>
<u>1</u> ,4,[5],12 :	- :	-	Variant immobile du sérotype Typhimurium	Perte de l'expression des deux phases flagellaires

Le caractère diphasique de l'antigène flagellaire de certaines salmonelles consiste en la capacité de changer sa composition par un simple « switch » de l'expression de 2 loci codant la protéine flagellaire majeure (Mc Quiston et al., 2008a). Cette propriété est spécifique d'espèce, de sous-espèce et de sérotype.

Au sein des salmonelles, le caractère diphasique de l'antigène flagellaire est un caractère acquis, probablement par transfert horizontal, depuis plusieurs millions d'années, au cours de l'évolution de l'espèce et des sous-espèces. Ce caractère diphasique ne se retrouve que dans certaines sous-espèces de *Salmonella enterica*, la principale étant *Salmonella enterica subsp enterica*, ou « sous-espèce I » (Mc Quiston et al., 2008b). Cependant, certaines salmonelles diphasiques semblent avoir ensuite perdu le locus de phase 2, avec un certain succès évolutif dans plusieurs lignées, correspondant par exemple aux sérotypes Typhimurium, Enteritidis et Dublin (Mc Quiston et al., 2008a). Les mêmes auteurs ont pu montrer que, d'une façon générale, lorsqu'un sérotype diphasique évoluait vers un sérotype monophasique, cette évolution correspondait le plus souvent à une perte du locus de phase 2. Cela permet d'expliquer l'émergence du sérotype 1,4,[5],12 :i :- par rapport à l'autre sérotype monophasique 1,4,[5],12 :-:1,2 et au sérotype immobile 1,4,[5],12 :- :-, tous deux beaucoup moins fréquemment rencontrés. Par ailleurs, très peu de données bibliographiques sont disponibles au sujet de ces deux derniers sérotypes.

2.2. Contexte international d'émergence de souches monophasiques

On assiste, depuis la fin des années 90, à l'émergence de **souches monophasiques de sérotype 4,5,12 :i :-** (Switt et al., 2009). Dans la revue complète et très documentée publiée récemment par ces auteurs, on retrouve ainsi des souches isolées de sources variées (Homme, volailles, bovins, porcs), en Asie, Amérique et Europe (tableau 6). On peut également souligner l'importance prise par ce type de salmonelle dans les isolements humains aux Etats-Unis (6^{ème} position en 2005) et en Italie (3^{ème} position en 2006).

Différents foyers épidémiques impliquant des souches de sérotype 4,[5],12 :i :- ont été rapportés dans la littérature. Ainsi, des souches appartenant à ce sérotype ont été à l'origine d'un foyer épidémique au Luxembourg, avec 133 cas confirmés en 2006, dont l'origine pourrait être associée à la consommation de viande de porc (Mossong et al., 2007). Enfin, en 2007, une large épidémie impliquant 272 isollements de souches de ce sérotype dans plusieurs Etats américains a fait l'objet d'une enquête épidémiologique, ce qui a permis de mettre en évidence la présence de souches appartenant à ce même sérotype dans des « pot pies » distribuées par un fabricant particulier ; cette investigation a été suivie d'un rappel et d'un retrait des lots contaminés (CDC, 2007). De plus, une étude menée sur les souches de sérotype 4,[5],12 :i :- ayant été à l'origine de cas humains à New York, en 1998, a montré une virulence particulièrement importante de ces isolats sur la base des signes cliniques et du taux d'hospitalisation (Agasan et al., 2002).

Tableau 6. Rapports publiés sur l'isolement dans le monde de *Salmonella enterica* sérotype 4,5,12:i:- (d'après Moreno et al., 2009 ; Dionisi et al., 2009).

Année(s) d'isolement	Pays	Source
1986–1987	Portugal	Poulet
1993–1994	Thaïlande	Homme, viande de poulet
1997	Espagne	Homme, aliments
1991–2000	Brésil	Homme, aliments, animaux
1998–2000	Etats-Unis	Homme, viande crue de poulet
1998–2000	Espagne	Porc
2000–2001	Thaïlande	Homme, viande congelée, aliments
2000–2003	Taiwan	Homme
2003–2004	Portugal	Carcasses de porcs
2004	Etats-Unis	Homme, bovins
Non disponible	Etats-Unis	Bovins, volaille, oiseaux non domestiques
2006	Luxembourg	Homme, aliments, porcs
2003-2006	Italie	Homme

2.3. Données françaises

2.3.1. Données du Centre National de Référence des Salmonella

Les données du CNR des *Salmonella* disponibles dans le rapport d'activité annuel 2008, concernant les isolats humains, montrent une très nette augmentation du sérotype 4,[5],12 :i :- , décrit comme un variant monophasique de Typhimurium. Celui-ci prend une place prépondérante puisqu'avec 410 isolats, il atteint en 2008 la troisième place par ordre de fréquence d'isolement, assez loin toutefois derrière les sérotypes Enteritidis (1 929 isolats) et Typhimurium (4 748 isolats). Le tableau 7, extrait du rapport annuel d'activité 2008 du CNR, illustre la montée progressive de ce sérotype qui, entre 2005 et 2008, passe de la onzième à la troisième position dans l'ordre de fréquence d'isolement. Par ailleurs, de nombreux foyers de cas groupés correspondant au sérotype 4,[5],12 :i :- ont été identifiés en 2008 en France : 13 épidémies familiales, trois infections collectives et deux infections en milieu hospitalier. Ces épidémies participent sans doute à l'augmentation très importante du nombre d'isolats recensés par le CNR en 2008.

Tableau 7 Principaux sérotypes de salmonelles isolés par le CNR de 2005 à 2008 par ordre de fréquence. Entre parenthèses et pour le seul sérotype monophasique 4,[5],12 :i :- figure le nombre d'isolats.

Rang d'isolement	2005	2006	2007	2008
1	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium
2	Enteritidis	Enteritidis	Enteritidis	Enteritidis
3	Agona	Derby	Derby	4,[5],12 :i :- (410)
4	Infantis	Typhi	Hadar	Derby
5	Typhi	Napoli	4,[5],12 :i :- (121)	Kentucky
6	Derby	Hadar	Typhi	Typhi
7	Hadar	Infantis	Newport	Newport
8	Virchow	Virchow	Kentucky	Panama
9	Newport	4,[5],12 :i :- (113)	Infantis	Hadar
10	Panama	Newport	Panama	Infantis
11	4,[5],12 :i :- (99)	Panama	Virchow	Brandenburg

Les données concernant les deux autres sérotypes, 1,4,[5],12 :-:1,2 et 1,4,[5],12 :- :-, sont très peu documentées. Le tableau 8 ci-dessous indique l'évolution, entre 2005 à 2008, du nombre annuel d'isolats de ces deux variants du sérotype Typhimurium (Simon Le Hello, CNR des Salmonella, communication personnelle).

Tableau 8. Nombre d'isolats collectés par le CNR des Salmonella de 2005 à 2008 (Simon Le Hello, communication personnelle)

Sérotype	2005	2006	2007	2008
<u>1,4,[5],12 :-:1,2</u>	2	4	12	7
<u>1,4,[5],12 :- :-</u>	13	29	8	24

On peut souligner l'existence, en 2008, de deux foyers de cas groupés associés au sérotype 1,4,[5],12 :- :-, l'un dans un contexte familial et l'autre en collectivité. Le variant monophasique 1,4,[5],12 :-:1,2 est quant à lui beaucoup moins fréquemment isolé, avec un nombre très faible de souches par rapport au variant 4,[5],12 :i :-.

2.3.2. Données du réseau Salmonella

Le réseau Salmonella piloté par l'unité CEB (Caractérisation et Epidémiologie Bactériennes) de l'Afssa Lerqap a pour objectif d'effectuer la surveillance des sérotypes de Salmonella provenant d'isolements chez l'animal et dans son environnement, dans les aliments, à tous les stades de production, et dans l'écosystème. Ce réseau, fondé sur le volontariat de 150 laboratoires d'analyses répartis sur tout le territoire, existe depuis plus de 10 ans. La stabilité de son fonctionnement permet d'établir des tendances évolutives spatio-temporelles des différents sérotypes et de détecter des événements inhabituels, tels que l'émergence de sérotypes ou de clones spécifiques. Les données collectées par le réseau sont réparties en trois grands secteurs de la chaîne agro-alimentaire :

- Secteur Santé et production animales (P) qui correspond aux isolats d'animaux malades ou porteurs sains ou de leur environnement d'élevage ;
- Secteur « Hygiène des aliments » (H) qui correspond aux isolats d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale, associés à l'environnement d'abattoirs, provenant d'ateliers de découpe et de transformation ;

- Secteur « Ecosystème » (E) qui correspond aux isolats d'environnement naturel.

Ces données, ainsi réparties dans les trois secteurs, et dans différentes espèces animales et sous-catégories d'aliments, sont régulièrement publiées dans les bulletins trimestriels et les inventaires annuels.

Dans le cadre de la saisine, deux types de requêtes ont été effectuées dans la base de données du réseau Salmonella :

- l'une permettant d'objectiver l'augmentation du nombre de souches collectées des sérotypes correspondant aux variants monophasiques chez Typhimurium : cette détection d'évènements inhabituels repose sur la génération d'alarmes à l'aide de trois méthodes statistiques, et par comparaison des séries temporelles ;
- l'autre permettant d'identifier précisément les isolats appartenant aux sérotypes recherchés (variants monophasiques et immobiles) en leur associant l'ensemble des informations épidémiologiques disponibles (origine géographique, type et nature de prélèvement, secteur d'isolement, espèce animale ou catégorie de produits alimentaires).

a) Détection d'évènements inhabituels

Sérovar 1,4,[5]12:i-

Ce sérovar est régulièrement collecté par le réseau Salmonella, mais avec un nombre de souches enregistrées chaque semaine généralement inférieur à cinq. Une augmentation significative du nombre de souches de ce sérovar collectées a été observée depuis fin 2007. A partir du quatrième trimestre 2007, des remontées hebdomadaires de six à 15 souches sont régulièrement observées. Ceci a généré des alarmes statistiques avec les trois méthodes utilisées.

Sérovar 1,4[5]12:-:-

Ce sérovar reste rare dans la base de données du réseau Salmonella. Deux alarmes statistiques ont été générées par au moins deux des méthodes : l'une au troisième trimestre 2007, correspondant à une remontée de 11 souches de sérovar 4,12 :- :-, et l'autre au deuxième trimestre 2009, correspondant à la remontée de trois souches de sérovar 4,5,12 :- :- dans le cadre de l'investigation d'un foyer de cas humains associés à la consommation de tiramisu. Toutes les souches immobiles à l'origine de ces alarmes provenaient d'élevages de volailles (poules).

Sérovar 1,4[5]12:-:1,2

Aucune alarme statistique relative à ce sérotype n'a été détectée durant la même période d'étude. Ce variant monophasique est beaucoup moins fréquemment isolé que le variant 4,[5]12:i-.

b) Données descriptives des isolements de souches enregistrées sur la base de données du réseau Salmonella

Le tableau 9 présente la synthèse du nombre d'isolats collectés par le réseau, entre 2005 et 2008, en fonction de leur secteur d'isolement et de l'espèce animale ou de la catégorie de produits.

Le sérovar monophasique 1,4,[5]12:i- est de loin le plus isolé, le plus souvent en relation avec les filières avicoles, mais pas uniquement.

L'autre sérovar monophasique, 1,4[5]12:-:1,2, est le moins fréquemment isolé ; il est à noter que seulement deux souches ont été isolées depuis 2005 à partir d'élevages de Gallus gallus, dans le cadre de prélèvements réglementaires, l'une de poules pondeuses, l'autre de poulets de chair.

Enfin, des souches du sérotype immobile 1,4[5]12:-:- ont été isolées de poules pondeuses en 2007 et 2008.

Tableau 9. Nombre d'isolats collectés par le réseau *Salmonella* de 2005 à 2008, selon les secteurs et principales espèces animales ou catégories d'aliments (sources : inventaires du réseau *Salmonella*, base de données du réseau *Salmonella*).

Sérotype	Secteur	2005	2006	2007	2008
1,4,[5]12:i:-	Total / tous secteurs	33	31	79	50
	P	10 Poule pondeuse (3) Canard (5) Dinde (1) Volaille (1)	13 Oie (2) Canard (2) Dinde (5) Bovin (1) Poulet de chair (1) Caille (1) Poulette (1)	20 Volaille (2) Canard (3) Poulet de chair (3) Canari (1) Bovin (2) Porc (3) Poule pondeuse (1) Dinde (3) Eau abreuvoir (2)	27 Poulet de chair (14) Poule (4) Bovin (2) Volaille (2) Dinde (4) Porc (1)
	H	21 Produits de porc (8) Bœuf (2) Saucisse (1) Chorizo, cervelas (3) Matière première (1) Crevette (1) Produits de volaille (2) Env atelier (2) Fromage (1)	18 Figatelli (4) Farce (1) Chorizo (1) Produits de porc (4) Poisson (1) Pâté en croute (1) Saucisse(1) Produits volaille (1) Produits ovin (4)	55 Saucisse (7) Caille (2) Produits de porc (15) Chorizo (14) Oie (1) Figatelli (1) Peau de cou poulet (2) Produits bovins (1) Produits laitiers (9) Foin (1) autres (1) Env atelier (1)	21 Lait (7) Porc (6) Chorizo (1) Env abattoir (2) Saucisse (1) Crevette (1) Canard (2) Alimentation animale (1)
	E	2	0	4	2
1,4[5]12:-:1,2	Tous secteurs	12	4	17	3
	Par secteur	P (6), H (5), E (1)	P (4), H (0), E(0)	P (4), H (12), E (1)	P (1), H (2), E (0)
1,4[5]12:-:-	Tous secteurs	9	8	19	9
	Par secteur	P (3), H (6), E (0)	P (5), H (3), E (0)	P (14), H (3), E (2)	P (5), H (1), E (3)

*P : secteur « Santé et production animales » ; H : secteur « Hygiène des aliments ; E : secteur « Ecosystème » ; Env : environnement.

2.3. Détection des sérotypes variants monophasiques et immobiles

La méthode officielle pour le dépistage des troupeaux en Europe utilise la norme NF EN ISO 6579 annexe D qui préconise l'emploi du milieu MSR/V comme milieu d'enrichissement et de sélection des salmonelles. Ce milieu, fondé sur le principe de mobilité des *Salmonella*, permet a priori de détecter les variants monophasiques, mais ne permet pas de détecter les souches immobiles d'une façon générale et, en particulier, le variant immobile 1,4[5]12:-:-. Il est à noter également que certaines méthodes alternatives de détection des *Salmonella* validées par l'AFNOR sont également fondées sur le principe de mobilité et de présence d'antigènes flagellaires exprimés. Ces méthodes ne sont donc pas adaptées à la détection de variants immobiles, et cette restriction figure dans l'attestation AFNOR de validation de la méthode.

2.4. Etude génomique des variants monophasiques et immobiles

De nombreuses études de caractérisation génotypique des souches de sérotype 1,4,[5],12:i:- ont été réalisées, faisant appel à différentes techniques telles que l'électrophorèse en champ pulsé (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), le « multilocus sequence typing » (MLST), les puces à ADN et le séquençage. L'ensemble des résultats publiés montre très clairement que les **souches de sérotype 1,4,[5],12:i:-** sont très fortement apparentées aux souches de sérotype Typhimurium, suggérant ainsi que **ces souches correspondent à un variant monophasique du sérotype Typhimurium**. En effet, la grande majorité des souches du variant 1,4,5,12:i:- sont de lysotype U302, suggérant que ce variant aurait pu émerger à partir d'un ancêtre commun de sérotype Typhimurium lysotype U302 (Amavisit et al., 2005 ; Echeita et al., 2001 ; de la Torre et al., 2003). D'autres souches, isolées au Luxembourg, sont quant à elles des variants de Typhimurium dérivés du lysotype DT193 (Mossong et al., 2007).

Les résultats comparatifs de caractérisation par MLST de souches de sérotype Typhimurium et de sérotype 4,5,12:i:- ont montré que l'ensemble des souches se regroupait dans un seul et même « séquence-type » (ST6), très fréquemment identifié pour Typhimurium. Les résultats de caractérisation par PFGE, méthode réputée pour être très discriminante, montrent qu'il existe par ailleurs une très grande diversité de profils PFGE parmi ces isolats. Ces résultats suggèrent une diversification importante au sein du sérotype 4,5,12:i:-. Les résultats de séquençage du génome d'une souche de sérotype 4,5,12:i:- isolée chez l'animal en comparaison avec le génome de Typhimurium montrent qu'il existe différents points de mutations et délétions sur le génome du variant monophasique, ayant entraîné la perte d'expression de la phase 2 flagellaire. Des souches monophasiques espagnoles 4,5,12:i:- présentent des caractéristiques en typage par puces ADN très proches des souches diphasiques Typhimurium de référence (Garaizar et al., 2002). En conclusion, les différences entre ces souches monophasiques et les souches de sérotype Typhimurium n'apparaissent pas plus importantes qu'entre les souches de référence STm et leur variant Copenhagen (Chiu et al., 2006).

Concernant la virulence, les résultats sont contrastés. D'après les travaux de Ikeda et al. (2001), il semblerait que la virulence mesurée *in vivo* sur un modèle animal (mortalité chez la souris) des souches ayant perdu l'expression de la deuxième phase (variant monophasique 4,5,12:i:-) soit supérieure à celle des souches exprimant les deux phases (sérotype Typhimurium). A l'inverse, les travaux de Gewirtz et al. (2001) montrent une diminution d'invasion en culture cellulaire des mutants 4,5,12:i:-.

La recherche bibliographique n'a pas permis d'identifier de données de caractérisation génotypique ou phénotypique relatives **au variant monophasique 1,4,[5],12:-:1,2 et aux souches immobiles 1,4,[5],12:-:-**.

Cependant, dans le cadre d'une **investigation de cas groupés menée en France en mai-juin 2009**, les **souches immobiles 1,4,[5],12:-:-** d'origine humaine, ainsi que les souches isolées de l'aliment incriminé (tiramisu) et de l'élevage de poules pondeuses à l'origine de la contamination des œufs, ont récemment été caractérisées, à la fois par PFGE et MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) par le CNR des Salmonella et l'Afssa Lerqap. Les résultats montrent une identité parfaite entre les profils des souches humaines et ceux des souches de tiramisu et des poules pondeuses, aussi bien par la technique PFGE que par MLVA ; cette technique MLVA, plus discriminante que la PFGE, est mise en œuvre par le CNR spécifiquement dans le cadre de cette enquête pour affiner les données de PFGE lorsqu'un profil très fréquemment identifié chez Typhimurium (STYMX0007) a été mis en évidence. Le profil MLVA a permis de reconnaître un profil spécifique lié à cet épisode et différent des profils MLVA des autres souches non reliées à l'étude (données CNR et Afssa Lerqap non publiées actuellement).

De plus, et de manière plus générale, les résultats de caractérisation par PFGE après macro-restriction par XbaI, recensés dans la base de données BioNumerics de l'Afssa Lerqap, montrent globalement que, sur les 67 souches analysées regroupant à la fois les variants monophasiques 1,4,[5],12:i:- et 1,4,[5],12:-:1,2 et les souches immobiles 1,4,[5],12:-:-, **90% d'entre elles ont présenté un profil PFGE identique ou proche d'un profil PFGE**

du sérotype Typhimurium. D'autre part, l'un des profils PFGE majoritairement identifié parmi les souches de sérotype Typhimurium (STYMX0007) a été retrouvé parmi les souches monophasiques et immobiles (données de l'Afssa Lerqap non publiées actuellement).

Certaines de ces souches (variants monophasiques et immobile) ont également fait l'objet d'une caractérisation poussée, par PCR en temps réel, de certains marqueurs d'intérêt des souches de sérotype Typhimurium (îlots de pathogénicité, îlot génomique SG11, marqueurs de résistance aux antibiotiques notamment). Ces marqueurs étaient présents chez la plupart des souches (données de l'Afssa-Lerqap non publiées actuellement).

2.5. Conclusion et proposition de scénario

Compte tenu de l'ensemble des données exposées ci-dessus, les variants monophasiques (1,4,[5],12:i:- et 1,4,[5],12:-:1,2.) et immobile (1,4,[5],12:-:-) du sérotype Typhimurium doivent être considérés différemment.

D'un point de vue épidémiologique, les données exposées dans ce document montrent très clairement que la fréquence d'isolement du sérotype 1,4,[5],12:i:- est largement supérieure à celle des sérotypes 1,4,[5],12:-:1,2 et 1,4,[5],12:-:-. Ce constat peut s'expliquer par le désavantage certain de la perte du gène *fliC*, codant le flagelle en phase 1, qui joue un rôle fondamental dans la formation du complexe flagellaire, et dont l'absence entraînerait une perte de fonctionnalité (souches immobiles), alors que la perte du gène *fliB* codant le flagelle en phase 2 a beaucoup moins d'impact sur la mobilité (Mc Quiston et al., 2008a). La perte de la deuxième phase semble même procurer à ces variants monophasiques un avantage sélectif dans un certain environnement, ce qui a ainsi permis leur émergence actuelle alors qu'ils n'étaient que rarement isolés avant 1993 (Switt et al., 2009). Il est par conséquent nécessaire d'examiner la situation différemment selon le variant, **l'émergence actuelle étant avérée uniquement pour le sérotype 1,4,[5],12:i:-** alors que les deux autres variants sont isolés à des fréquences moindres et sans augmentation significative. Ces observations se retrouvent également dans de nombreux pays européens et en Amérique du Nord, puisque ce sérotype se situe dans les trois à dix premiers, par fréquence d'isolement, dans différents pays.

Néanmoins, **les variants monophasiques et immobiles peuvent être eux aussi à l'origine de cas groupés de salmonelloses** : des épisodes liés au sérotype 1,4,[5],12:i:- ont été décrits et, récemment en France, des cas groupés associés au sérotype 1,4,[5],12:-:- ont été observés pour la première fois, l'enquête ayant permis d'identifier la source de contamination ainsi que l'élevage de poules pondeuses à l'origine de la contamination (données non publiées actuellement).

D'un point de vue taxonomique, il est absolument nécessaire de faire la distinction entre ces variants et le sérotype Typhimurium. Cela nécessite d'effectuer un sérotypage complet de la souche à analyser incluant l'étape d'inversion de phase, de façon à identifier ou non cette seconde phase. Dans le cas contraire, les souches présentant un déficit de phase 1 et/ou de phase 2, risquent d'être assimilées à des souches de sérotype Typhimurium, ce qui serait inexact et entraînerait aussi un biais dans la surveillance des sérotypes monophasiques et immobiles.

D'un point de vue génotypique, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde pour reconnaître que **le variant monophasique 1,4,[5],12:i:- dérive du sérotype Typhimurium** à partir d'un ancêtre commun ayant subi des mutations et/ou délétions dans les gènes responsables de l'expression de la phase 2. Ceci est largement démontré par toutes les méthodes de typage moléculaire et d'étude phylogénétique des souches de sérotypes 1,4,[5],12:i:- et Typhimurium. Une certaine variabilité a toutefois été observée au sein du sérotype 1,4,[5],12:i:- et on peut considérer qu'il existe deux grandes lignées de ce sérotype :

- les souches « européennes », notamment celles isolées en Espagne qui présentent un phénotype de multirésistance aux antibiotiques, et
- les souches « nord-américaines et asiatiques » qui sont très rarement résistantes aux antibiotiques et qui ont conservé une copie du gène *hin*

impliqué dans la régulation de l'expression des phases 1 et 2 (Switt et al., 2009).

Cette observation semblerait être en faveur de deux phénomènes évolutifs indépendants, sans pour autant expliquer pourquoi cette émergence a eu tant de succès. Ceci pourrait être expliqué par un avantage sélectif du variant qui ne serait pas complètement reconnu par le système immunitaire du fait de l'absence d'expression d'antigène flagellaire (Switt et al., 2009). Des études plus poussées sur biopuces à ADN semblent en outre montrer qu'il existe des délétions dans d'autres régions que celles concernant l'expression flagellaire de phase 2, qui pourraient avoir un impact sur des caractéristiques phénotypiques, notamment sur la virulence (Garaizar et al., 2002).

Aucune donnée aussi approfondie n'a été publiée concernant les variants monophasique 4,[5],12:-:1,2. et immobile 4,[5],12:-:..

Proposition de scénarios

La saisine propose quatre scénarios possibles, qui ne sont pas incompatibles entre eux :

- les trois premiers concernent directement la surveillance des variants avec une collecte et caractérisation des isolats,
 - le scénario 1 correspond à une situation d'attente sans mise en place d'analyses,
 - les scénarios 2 et 3 correspondent à une situation de collecte centralisée de ces variants, avec une caractérisation sans contrainte de délai dans l'option 2, et avec des contraintes de délai dans l'option 3 ;
- le scénario 4 propose la mise en œuvre de mesures de police sanitaire en appliquant les mêmes mesures lors de l'isolement de ces variants que celles appliquées au sérotype Typhimurium. Ce choix pourrait être conforté par les données génotypiques en faveur d'une proximité des sérotypes monophasiques avec Typhimurium, sérotypes qui sont d'ailleurs appelés des variants monophasiques de Typhimurium. Dans l'hypothèse où cette option serait retenue, il ne serait donc théoriquement pas nécessaire de réaliser une caractérisation complète puisque tout élevage dans lequel une souche serait isolée dans un contexte réglementaire, et présenterait les antigènes somatiques 1,4,[5],12 du sérotype Typhimurium, serait alors soumis aux mêmes mesures de police sanitaire que les élevages avec isolement de STm.

Dans un objectif de santé publique, le CES SA considère qu'il est aujourd'hui important de continuer la surveillance relative à l'isolement de ces variants monophasiques et immobile, aussi bien parmi les souches provenant d'animaux, en particulier des secteurs d'élevage réglementés et d'aliments, que parmi celles isolées chez l'homme. Par ailleurs, cette surveillance est considérée comme critique et indispensable pour mesurer l'émergence et la fréquence des différents sérotypes, incluant bien entendu le variant 1,4,[5],12:i:-, afin de mieux cerner l'impact de ce dernier en santé publique (Switt et al., 2009).

De ce fait, la proposition 2, qui consiste à demander aux laboratoires agréés et reconnus d'envoyer systématiquement au laboratoire associé au LNR des Salmonella, pour le sérotypage, les souches présentant les antigènes somatiques 1,4,[5],12 pour lesquelles il n'a pas été possible d'identifier les phases flagellaires 1 et/ou 2, paraît tout à fait judicieuse.

Dans ce cadre, la caractérisation des souches évoquées dans la présente saisine sous le vocable « Typhimurium-like » pourrait consister, par exemple, en :

- la confirmation du variant monophasique par sérotypage classique et la recherche du gène *fljB* permettant de confirmer la présence du variant 1,4,[5],12:i:-,
- la caractérisation moléculaire par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) après macro-restriction par *Xba*I, ainsi que
- la recherche de certains marqueurs de virulence et de déterminants de résistance aux antibiotiques.

Conclusions et recommandations

Considérant l'importance des filières avicoles et notamment celle de ponte d'œufs de consommation dans la genèse des toxi-infections alimentaires humaines à salmonelles (« cas attribuables ») ;

Considérant l'impact des mesures de prophylaxie collective obligatoire mises en œuvre dans les filières avicoles depuis 1998 ;

Considérant la bonne situation épidémiologique de la France en termes de contamination des filières par les sérotypes visés par la réglementation, l'autorisant à alléger le dispositif de dépistage officiel ;

Considérant l'importance des prélèvements effectués en élevages pour détecter d'éventuelles contaminations, et partant préserver la santé publique ;

Considérant le contexte européen et en particulier le règlement (CE) N° 213/2009 ;

Considérant l'augmentation récente du nombre d'isolements de souches « Typhimurium-like » ;

Considérant la proximité génétique des souches « Typhimurium-like », avec les souches de sérotype Typhimurium ;

Le CES SA donne un avis favorable aux projets d'arrêtés, et recommande qu'il soit tenu compte de l'augmentation récente des isolements de souches « Typhimurium-like » et de leur proximité génétique avec les souches de sérotype Typhimurium

- en préconisant l'utilisation de deux milieux d'enrichissement dans les protocoles de recherche des salmonelles en élevages ;
- en proposant un suivi épidémiologique des souches « Typhimurium-like », avec caractérisation ultérieure ;
- en proposant des mesures de police sanitaire équivalentes à celles mises en œuvre lors d'isolement de souches de sérotype Typhimurium.

Principales références bibliographiques

Agasan A, Kornblum J, Williams G, Pratt CC, Fleckenstein P, Wong M, Ramon A. (2002). Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing food-borne infections in New York City. *J. Clin. Microbiol.* 40(6):1924-1929.

Amavisit P, Boonyawiwat W, Bangtrakulnont A. (2005). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 43(6):2736-2740.

Brisabois A, Danan C., Frémy S., Granier S., Moury F., Oudart C; Piquet C., Pires Gomes C. Données du réseau *Salmonella*: Inventaires du réseau *Salmonella*, 2005, 2006 et 2007.

[CDC]. Centers for Disease Control and Prevention. (2007). *Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2005*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2007.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Investigation of outbreak of human infections caused by *Salmonella* serotype I 4,[5], 12:i:-, 2007. Accessible en ligne à <http://www.cdc.gov/salmonella/4512eyeminus.html>. Atlanta, GA: CDC, 2007.

Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, Weill FX, Chu C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44(7):2354-2358.

de la Torre E, Zapata D, Tello M, Mejía W, Frías N, García Peña FJ, Mateu EM, Torre E. (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype typhimurium DT U302. *J. Clin. Microbiol.* 41(6):2395-2400.

Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Piihier N, Weill FX, de Valk H, Vaillant V, Désenclos JC. (2006). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 50:418-421.

Dionisi AM, Graziani C, Lucarelli C, Filetici E, Villa L, Owczarek S, Caprioli A, Luzzi I. (2009). Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and Monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(6):711-717.

Echeita MA, Herrera S, Usera MA. (2001). Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* 39(8):2981-2983.

EFSA (2009). The Community Summary Report on Foodborne Outbreaks in the European Union in 2007, *The EFSA Journal* (2009), 271

EFSA (2009). Quantitative estimation of the impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in breeding hens of *Gallus gallus*. *The EFSA Journal*, 1036, 2-68.

Ganière et al.. (2005). *Maladies réputées contagieuses et maladies à déclaration obligatoire des oiseaux*, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Mérial (Lyon), 2005, 26 p.

Garaizar J, Porwollik S, Echeita A, Rementeria A, Herrera S, Wong RM, Frye J, Usera MA, McClelland M. (2002). DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *J. Clin. Microbiol.* 40(6):2074-2078.

Gewirtz AT, Simon PO Jr, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD, Neish AS, Madara JL. (2001). *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J. Clin. Invest.* 107:99–109.

Ikeda J, Schmitt C, Darnell S, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, Adams P, O'Connor CD, O'Brien AD. (2001). Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect. Immun.* 69:3021–3030.

McQuiston JR, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM Jr. (2008a). Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.* 16(4):142-148.

McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, Doyle J, Fields PI, Tauxe RV, Logsdon JM Jr. (2008b). Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J. Bacteriol.* 190(21):7060-7067.

Mossong J, Marques P, Ragimbeau C, Huberty-Krau P, Losch S, Meyer G, Moris G, Strottnner C, Rabsch W, Schneider F. (2007). Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveill.* 12(6):E11-2.

Moury F, Frémy S, Brisabois A. (2006) *Epidémiosurveillance des salmonelles d'origine non humaine : données du réseau Salmonella, année 2005*. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 20/2006, 6-8.

Poirier E, Watier L, Espié E, Bouvet P, Weill FX, de Valk H, Desenclos JC (2006) Evaluation de l'impact des mesures prises dans les élevages aviaires sur l'incidence des salmonelloses en France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2-3/2006 : 18-19.

Switt AIM, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(4):407-415.

Weill F.X, Le Hello S. *Données du CNR des Salmonella: rapport d'activité annuel 2008.*

Zamperini K, Soni V, Waltman D, Sanchez S, Theriault EC, Bray J, Maurer JJ. (2007). Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian Dis.* 51(4):958-964.

Mots clés : salmonelles, souches "Typhimurium-like", *Gallus gallus* »

Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Tels sont les éléments d'analyse que l'Afssa est en mesure de fournir en réponse à la saisine de la Direction générale de l'alimentation sur la demande d'avis sur deux projets de modification des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans l'espèce *Gallus gallus*.

Le Directeur général de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Marc MORTUREUX

Annexe 1. Taux d'infection (%), par les sérotypes d'intérêt de *Salmonella*, des troupeaux de reproducteurs des filières chair et ponte de l'espèce *Gallus gallus* visés par le dépistage obligatoire en France, par étage et par filière de production, depuis 2000 (source DGAI, rapports techniques 2006-2008).

Sérotype	Filière concernée	Filière œufs de consommation				Filière chair			
	Étage	Sélection		Multiplication		Sélection		Multiplication	
	Stade	Elevage	Ponte	Elevage	Ponte	Elevage	Ponte	Elevage	Ponte
Enteritidis	2000	0	0	0	2,2	0,7	0,6	0,34	1,70
	2001	0	0	0	1	0	0	0,11	0,82
	2002	0	0	0	0	0	0,61	0,31	0,64
	2003	0	0	0	1,2	0	0	0,3	0,81
	2004	0	0	0	0	0	0	0	0,2
	2005	0	0	0	0	0	0	0	0,6
	2006	0	0	0	0	0	1,4	0,1	0,2
	2007	0	0	0	0,88	1,05	0	0,12	0,33
2008	0	0	0	0	0	0	0,58	0,12	
Typhimurium	2000	0	0	0	0	0,7	0	0,66	1,21
	2001	0	0	0	0	0	0	0,8	0,31
	2002	0	0	0	0	0	0,61	0,1	0,28
	2003	0	0	2,2	1,2	0	0	0,22	0,2
	2004	0	0	0	0	0	0	0	0,1
	2005	0	0	0	0	0	0	0	0,1
	2006	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1
	2007	0	0	0	0	0	0	0,23	0
2008	0	0	0	0	0	0	0	0,58	
Hadar	2007	0	0	0	0	0	0	0	0,22
	2008	0	0	0	0	0	0	0	0
Infantis	2007	0	0	0	0	0	0	0	0,11
	2008	0	0	0	0	0	0	0	0
Virchow	2007	0	0	0	0	0,53	0	0	0
	2008	0	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 2. Distribution des salmonelles isolées de foyers de toxi-infections alimentaires en 2007 liées à la consommation d'œufs ou ovoproduits et de viandes de volailles de l'espèce poule rapportée par les Etats-Membres (EFSA, mars 2009).

<i>Salmonella</i> serovar	EU Total 2007				Eggs and egg products (including raw eggs in bakery products)				Poultry meat (<i>Gallus gallus</i>) and products thereof			
	Outbreaks	Human cases	Hospitalisations	Deaths	Outbreaks	Human cases	Hospitalisations	Deaths	Outbreaks	Human cases	Hospitalisations	Deaths
<i>S. Enteritidis</i>	260	5,009	1,244	9	132	1,645	398	3	11	133	32	0
<i>S. Typhimurium</i>	55	954	179	0	18	97	27	0	1	71	4	0
<i>S. Agona</i>	2	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Anatum</i>	2	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Bovismorbificans</i>	1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Brandenburg</i>	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Bredeney</i>	2	14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Coeln</i>	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. group B</i>	1	26	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. group D</i>	1	3	3	0	1	3	3	0	0	0	0	0
<i>S. Heidelberg</i>	2	25	7	0	0	0	0	0	1	12	1	0
<i>S. Infantis</i>	1	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Kimuenza</i>	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Newport</i>	2	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Panama</i>	1	31	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Senftenberg</i>	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Stanley</i>	1	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Thompson</i>	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>S. Virchow</i>	2	23	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Weltevreden</i>	2	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp., unspecified	63	881	71	0	23	150	27	0	2	113	3	0
EU total	403	7,187	1,531	9	175	1,897	455	3	15	329	40	0