

UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

Année 2011

Thèse N°1809

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

ECOLE DOCTORALE DE GENETIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 23/02/2011

Par

Sun Lay KRUY

Née le 20 juillet 1952 à Kompong Cham, Cambodge

**DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE SALMONELLES ISOLEES
AU CAMBODGE A PARTIR D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES
ALIMENTAIRES OU HUMAINS**

Jury :

M. le Pr. Hervé Fleury

Président

M. le Pr. Jean Louis Koeck

Directeur de thèse

Mme le Pr. Maria Urdaci

Rapporteur

M le Pr. René Migliani

Rapporteur

M. le Dr Pascal Millet

Membre

Mme le Dr. Hélène van Cuyck

Membre

Remerciements:

Aux membres du JURY

M. le Pr. Hervé Fleury	Président
M. le Pr. Jean Louis Koeck	Directeur de thèse
Mme le Pr. Maria Urdaci	Rapporteur
M le Pr. René Migliani	Rapporteur
M. le Dr Pascal Millet	Membre
Mme le Dr. Hélène van Cuyck	Membre

Qui m'ont fait le grand honneur de bien vouloir accepter de siéger en ce jour mémorable pour ma soutenance de thèse. Qu'il me soit permis de leur exprimer l'hommage de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Pr. **Jean Louis Koeck**, mon directeur de thèse, personnalité pleine de gentillesse qui a pris ses temps pour me suivre dans la réalisation de cette thèse et m'a accepté dans son laboratoire à l'HIA Robert Picqué, j'adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A Madame le Docteur **Hélène van Cuyck**, personnalité pleine de gentillesse qui a pris de son temps pour me suivre dans la réalisation de cette thèse, j'adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A Madame **Alexandra Farbos Granger**, personnalité pleine de compétence et de gentillesse qui a pris de son temps pour me suivre dans la réalisation de cette thèse au laboratoire de l'HIA Robert Picqué, j'adresse ma sincère reconnaissance.

A Monsieur **Philippe Leroy**, personnalité pleine de gentillesse qui a pris de son temps pour me suivre dans la réalisation de cette thèse au laboratoire de l'HIA Robert Picqué, j'adresse ma sincère reconnaissance.

A tout le personnel du Service de Biologie Clinique de l'IHA Robert Picqué qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, j'adresse mes sincères remerciements

A Monsieur le Professeur **Vincent Deubel**, Directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge, ses encouragements m'ont permis de poursuivre cette formation, je lui adresse ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect

A Monsieur le Docteur **Jean Louis Sarthou**, ancien Directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge, ses encouragements m'ont permis de poursuivre cette thèse, je lui adresse ma reconnaissance, ma gratitude et mon profond respect

A Monsieur le Professeur **Yves Buisson**, ancien Directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge, personnalité dotée d'un inestimable sens du travail, modèle de patience en toutes occasions, je lui adresse mon profond respect.

A Monsieur le Docteur **François Flye Sainte Marie**, ancien directeur de l'Institut Pasteur du Cambodge dont le dynamisme sans égal au cours de sa carrière à Phnom Penh, m'a servi d'exemple de travailleur infatigable, je lui adresse toute ma reconnaissance et ma gratitude.

A mon mari bien aimé SOM SAM AN, Qui m'a toujours aidé à surmonter les difficultés de ma vie avec beaucoup de courage et de patience. Que cette thèse soit le témoignage de mon affection.

A la mémoire de mon père bien aimé Monsieur KRUY ITH, qui m'a donné un modèle de travailleur infatigable et d'honnêteté exemplaire ;

A la mémoire de mon adorable mère bien aimée Madame KHUM SOEURNG, image de tendresse et d'amour d'une vie humble et honnête.

Qu'il me soit permis de leur rendre hommage et de leur exprimer mes adorations et mon éternel amour

A la mémoire de mes frères bien aimés. Qu'il me soit permis de leur rendre hommage et de leur exprimer mes regrets et mon éternel amour

KRUY CHHUN LENG

KRUY NGUON LY

KRUY LIM HENG

A mes chères sœurs bien aimées, toute ma tendresse

KRUY AUN

KRUY SY LOR

KRUY KIM HOURN

A mes chers amis ‘ Association d’Entraite Kmère d’Aquitaine’

Monsieur SOK JACQUES (YOEURN)

Madame KIT CHANNARA

Monsieur KIEN SAO HOAN

Madame THACH THI LY

Mes amitiés les plus sincères et mes profonds remerciements

LISTE DES ABREVIATIONS

MLVA	<i>Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis</i> Analyse du polymorphisme de répétition en tandem
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i> : Nombre variable de répétition en tandem
TR	<i>Tandem Repeat</i> : Répétition en tandem
DNA	<i>DesoxyriboNucleic Acid</i> : Acide désoxyribonucléique
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> : Acide ribonucléique ribosomal
MST	<i>Minimum Spanning Tree</i> : Arbre minimum couvrant
DI	<i>Diversity Index</i> : Index de diversité
SLV	<i>Single Locus Variants</i> : Variants différents par un locus
DLV	<i>Double Locus Variants</i> : Variants différents par deux loci
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> : Amplification génique par réaction en chaîne
MLST	<i>Multiple-Locus Sequence Typing</i> : Typage par séquençage de loci
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> : Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, dodécyl sulfate de sodium
REA	<i>Restrictive Enzyme Analysis</i> : analyse par enzyme de restriction
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i> : Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restrictive Fragment Length Polymorphism</i> : Amplification génique et polymorphisme de longueur des fragments de restriction du produit amplifié
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i> : Electrophorèse en champs pulsé

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

	Page
LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION ET OBJECTIFS	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
A- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES SALMONELLES	19
1- Identification biochimique et Nomenclature	19
2- Structure antigénique	21
3- Les méthodes d'isolement	26
B- METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE	27
C- METHODES DE GENOTYPAGE UTILISEES POUR LES SALMONELLES	35
D-MARQUEURS VNTRs POUR ETUDE PAR MLVA DES SALMONELLES	37
MATERIELS ET METHODES	45
A-MATERIELS	46
1-Souches de salmonelles	46
1-1. <i>Salmonella enterica</i> provenant d'échantillons biologiques humains (n=45)	46
1-2. <i>Salmonella enterica</i> provenant d'échantillons biologiques alimentaires crus (n=133)	46
1-3. <i>Salmonella enterica</i> provenant d'échantillons biologiques alimentaires cuits (n=28)	47
2-Choix des marqueurs pour l'étude	47
B- METHODES	49
2-1. Sérotypage	49
2-2. Sensibilité aux antibiotiques	49
2-3. Préparation d'ADN et amplification par PCR	49
2-4. Analyses statistiques	50
2-5. Evaluation de la diversité génétique	50
RESULTATS	52
Chapitre 1- Résultats : Caractéristiques générales de la population étudiée	53
1- Diversité antigénique (sérotypes)	53
2- Antibiorésistance	55
Chapitre 2- Résultats : Diversité génotypique	55
1-Caractéristique des marqueurs utilisés	55
2-Vérification des résultats MLVA par détermination de la séquence d'ADN de fragments amplifiés	57
3- Evaluation de la population étudiée par mesure de l'indice de diversité de Hunter et Gaston selon l'origine des isolats	60
Chapitre 3 - Résultats : Epidémiologie moléculaire	65
1. Diversité génotypique des salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=206)	65
2. Diversité génotypique des salmonelles isolées d'échantillons biologiques humains (n=45)	73
3. Diversité génotypique des salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires crus (n=133)	77
4. Diversité génotypique des salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires cuits (n=28)	83
5. Diversité génotypique des salmonelles ACSSuT résistantes de même sérotype isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=81)	87
6- Diversité génotypique de sérotypes particuliers	95

6-1. Diversité génotypique de <i>Salmonella enterica</i> Derby isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=24)	95
6-2. Diversité génotypique des <i>Salmonella</i> Typhimurium isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humaines (n=10)	102
6-3. Diversité génotypique des <i>Salmonella enterica</i> Typhi isolées d'échantillons biologiques humains (n=29)	103
7- Comparaison de la diversité génétique d'isolats de <i>S.enterica</i> Typhi provenant du Cambodge et d'une étude en France	105
7-1. Sélection des souches et des marqueurs communs aux deux études	105
7-2. Comparaison des populations de sérotype Typhi provenant des deux études.....	106
DISCUSSION	110
CONCLUSION-PERSPECTIVES	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXES	
ANNEXE 1- Epidémiologie des souches	
ANNEXE 2- Bilan des résultats de séquençage	
ANNEXE 3- Publications	

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Nomenclature de <i>Salmonella</i>	20
Tableau 2 : Identification biochimique de <i>Salmonella enterica</i> et de <i>Salmonella bongori</i>	21
Tableau 3 : Répertoire de marqueurs VNTR décrits de 2003-2009 par la technique MLVA utilisés pour les sérotypes de <i>Salmonella enterica</i>	40
Tableau 4 : Caractéristiques et spécifications des marqueurs de <i>Salmonella enterica</i> décrits dans la littérature de 2003-2009	41
Tableau 5 : VNTR loci sélectionnés en référence à <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2 5 accession GenBank n°AE006468)	48
Tableau 6 : Répartition par ordre alphabétique des 206 isolats de <i>Salmonella enterica</i> selon les sérotypes	53
Tableau 7.1. Diversité génétique de 206 isolats de <i>S. enterica</i>	61
Tableau 7.2. Diversité génétique de 45 <i>S. enterica</i> d'origine humaine	62
Tableau 7.3. Diversité génétique de 133 <i>S. enterica</i> d'origine animale	63
Tableau 7.4. Diversité génétique de 28 <i>S. enterica</i> d'origine alimentaire	64
Tableau 8.1 : Diversité génétique de 81 <i>S. enterica</i> ACSSuT résistantes de mêmes sérotypes isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains.....	88
Tableau 8.2 : Diversité génétique de 16 <i>S. enterica</i> ACSSuT résistantes d'origine humaine de mêmes sérotypes que ceux isolés d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus).....	89

Tableau 8.3 : Diversité génétique de 60 <i>S. enterica</i> ACSSuT résistantes isolées d'aliments crus de mêmes sérotypes que ceux isolées d'échantillons biologiques alimentaires cuits et humains	90
Tableau 8.4 : Diversité génétique de 5 <i>S. enterica</i> ACSSuT résistantes isolées d'aliments cuits de mêmes sérotypes que celles isolées d'échantillons biologiques alimentaires crus et humains	91
Tableau 9.1. Diversité génétique de 24 <i>S. enterica</i> Derby	96
Tableau 9.2. Diversité génétique de 8 <i>S. enterica</i> Derby d'origine humaine	97
Tableau 9.3. Diversité génétique de 13 <i>S. enterica</i> Derby isolées d'aliments crus	98
Tableau 9.4. Diversité génétique de 13 <i>S. enterica</i> Derby isolées d'aliments cuits	99
ANNEXE 1 :	
Tableau. Epidémiologie des souches	126
ANNEXE 2 :	
Tableau. Bilan de résultats de séquençage	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation cellulaire des antigènes de <i>Salmonella</i>	22
Figure 2 : Représentation schématique d'un LPS de colonie type S	23
Figure3 : Représentation schématique d'un mécanisme génétique du phénomène d'inversion de phase.....	25
Figure 4 : Image d'un gel SDS-PAGE après coloration des protéines.	29
Figure 5 : Image d'un profil de migration plasmidique.....	30
Figure 6 : Mécanisme d'action de l'enzyme de restriction EcoRI	31
Figure 7 : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)	32
Figure 8 : Principe général d'un polymorphisme de longueur de fragments amplifiés.....	34
Figure 9 : Electrophorèse de gel en champ pulsé (PFGE).....	35
Figure 10 : Fragments de <i>S. enterica</i> obtenus en utilisant l' amplification par le marqueur STTR5	55
Figure 11 : Validation des marqueurs par séquençage des produits PCR	58
Figure 11 A : Séquence du génome de l'isolat <i>Salmonella</i> Sandiego (SA_01_06A) utilisant le obtenue en marqueur STTR8	58
Figure 11B: Séquence consensus du génome de l'isolat 202 (SA_03_01B) de <i>salmonella</i> Paratyphi B obtenue en utilisant le marqueur STTR5.	59
Figure 1-1A : Distribution phylogénétique de 206 isolats de <i>S.enterica</i>	67
Figure 1-1B : Distribution phylogénétique de 31 sérotypes de <i>S. enterica</i>	68

Figure 1-1C : Schéma d'un complexe clonal.....	69
Figure 1-2 : Arbre minimum couvrant des 206 isolats de <i>S.enterica</i>	71/72
Figure 1-3 : Arbre minimum couvrant obtenu en considérant une différence d'1 marqueur pour déterminer les complexes clonaux	73
Figure 2-1A: Distribution phylogénétique de 45 isolats de <i>S. enterica</i>	75
Figure 2-1B : Distribution phylogénique de cinq sérotypes de <i>S.enterica</i> d'origine humaine	76
Figure 2-2 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 45 souches de <i>S. enterica</i> d'origine humaine distribuées en 16 types de MLVA	77
Figure 3-1A : Distribution phylogénétique de 133 isolats de <i>Salmonella enterica</i>	80
Figure 3-1B : Distribution phylogénique de 26 sérotypes de <i>Salmonella enterica</i>	81
Figure 3-2 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 133 souches de <i>S. enterica</i> en 70 types de MLVA.....	83
Figure 4-1 : Distribution phylogénétique des 28 isolats de <i>S.enterica</i>	84
Figure 4- 2 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 28 souches de <i>S.enterica</i> en 24 types de MLVA.....	86
Figure 5-2 : Distribution phylogénétique des 81 isolats de <i>S. enterica</i> dont 26 souches sont résistantes à ACSSuT.....	93
Figure 5-3 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 81 souches de <i>S. enterica</i> ACSSuT résistantes en 45 types de MLVA.	95

Figure 6-1-2 : Distribution phylogénétique de 24 isolats de <i>Salmonella</i> Derby.....	100
Figure 6-1-3 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 24 souches de <i>Salmonella</i> Derby issues de trois origines H, F et A discriminées en 14 types de MLVA...	101
Figure 6-2-1 : Distribution phylogénétique de 10 isolats de <i>Salmonella</i> Typhimurium	102
Figure 6-2-2 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 10 souches de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	103
Figure 6-3-1 : Distribution phylogénétique des 29 isolats de <i>Salmonella</i> Typhi	104
Figure 6-3-2 : Arbre minimum couvrant représentant le profil de 29 souches de <i>Salmonella</i> Typhi.	105
Figure 7-2-1 : Distribution phylogénétique de 56 isolats de <i>Salmonella</i> Typhi en fonction de 8 marqueurs VNTR.....	107
Figure 7-2-2 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 8 marqueurs représentant le profil de 56 souches de <i>Salmonella</i> Typhi distribuées en 30 génotypes.	108
Figure 7 -2 -3 : Arbre minimum couvrant comprenant la totalité des souches de sérotype commun isolées dans les deux études	109

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le genre *Salmonella enterica* (*S. enterica*) appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie pathogène ubiquitaire souvent en cause dans les toxi-infections alimentaires collectives et constituant un grave problème de santé publique. Au Cambodge, les salmonelles ne sont pas présentées en tant que micro-organismes répertoriées dans le système de santé, mais sont classées ensemble avec d'autres agents qui causent les diarrhées (1). En santé vétérinaire cette bactérie est très présente dans la viande de poulets des marchés de la ville de Phnom Penh, ainsi les salmonelloses constituent aussi un grave problème de santé publique humaine et vétérinaire au Cambodge (2).

De nombreuses méthodes de typage ont été développées pour caractériser *S. enterica*, en particulier pour différencier les souches de même sérotype, identifier l'origine d'une contamination et suivre l'évolution des souches les plus virulentes responsables de la typhoïde et de salmonelloses mineures chez l'homme et l'animal. Le typage constitue un outil des enquêtes épidémiologiques

Les salmonelles possèdent dans leur génome des successions de motifs d'acide désoxyribonucléique (ADN) identiques, appelés régions de répétition, qui sont composées d'unités de répétition. L'unité est définie par soit des nucléotides, soit des paires de bases, soit des motifs de répétition. Dans le typage moléculaire des bactéries, c'est la succession de motifs répétés ou répétition en tandem (TR : « Tandem Repetition ») dans une séquence codante ou non, qui est prise en considération. Le nombre de TR est très variable selon l'espèce bactérienne. Certaines bactéries possèdent beaucoup de TR, d'autres en ont moins. Le mécanisme de répétition est variable. Les motifs d'ADN de 2 à 8 paires de bases (pb) formés par glissement lors de la réplication sont appelés les micro-satellites ; les motifs de taille supérieure ou égale à 9 pb, formés lors de la réparation de cassures dans le double brin, d'origine répllicative sont des mini-satellites (3). Ces satellites sont de tailles différentes selon le nombre de répétitions du motif ADN appelé répétition en tandem polymorphe ou « Variable Number of Tandem Repeat » (VNTR). Les motifs de répétition en tandem sont plus ou moins conservés. Le typage des bactéries est basé sur l'analyse des variations des loci contenant des TR polymorphes peu conservés (4).

Ces répétitions en tandem polymorphes sont nécessaires à l'adaptation des bactéries à leur environnement par action sur la fonction d'une protéine (variation antigénique, interaction avec d'autres bactéries, interaction avec la cellule cible, régulation de l'expression d'un gène). La délétion ou l'insertion d'une base dans une unité de répétition intervient dans la régulation de protéines enzymatiques comme cela a été décrit chez *Neisseria meningitidis* (5). Le degré de variation des TR dépend donc de l'état de stress de ces bactéries. Certaines des répétitions en

tandem sont non codantes, inter-géniques. Le séquençage complet du génome de plusieurs bactéries a permis la découverte de nombreux loci variables contenant des répétitions en tandem, ce qui a conduit à l'estimation de motifs TR dans plusieurs loci VNTR. Les motifs répétés peuvent varier en taille, en localisation, et en complexité, ainsi qu'en mode de répétition. De courtes répétitions en tandem d'ADN ont été reconnues comme des processus de régulation associés aux protéines de la membrane externe des bactéries, impliquées dans le codage ou dans la région promotrice du gène lié à la biosynthèse de l'antigène de surface (5). L'étude de ces motifs a abouti à l'analyse de séquences VNTR (Multiple locus VNTR analysis ou MLVA) et leur application permet d'obtenir le profil du polymorphisme moléculaire de ces bactéries (3). La méthode MLVA a été développée pour le typage moléculaire de bactéries pathogènes comme *Bacillus anthracis* (6), *E. Coli* O157 H7 (7), *Haemophilus influenzae* (8), *Legionella pneumophila* (9), *Mycobacterium tuberculosis* (10), *Neisseria meningitidis* (11), *Staphylococcus aureus* (12), *Streptococcus pneumoniae* (13), *S. enterica* et *S. enterica* de sérotype Typhimurium (14, 15, 16) ainsi que *Yersinia pestis* (17). Les approches du typage moléculaire utilisant l'analyse par VNTR sont prometteuses pour l'ensemble de ces micro-organismes. Une base de données de séquences répétées en tandem de nombreux génomes complètement séquencés a été mise à disposition (<http://minisatellites.u-psud.fr>) (18). La technique MLVA paraît avoir une capacité élevée de discrimination du polymorphisme moléculaire de micro-organismes (3).

Dans la technique de typage moléculaire par MLVA, un marqueur se définit par une séquence nucléotidique au sein de laquelle est sélectionné un couple d'amorces sens et antisens, localisée en un locus du génome d'un micro-organisme présentant des unités de séquences répétées en tandem. Les marqueurs utilisés dans le typage par la technique MLVA doivent être suffisamment performants pour permettre la caractérisation de salmonelles lors d'épidémies, notamment lors de plusieurs épidémies du même type avec le même phage et qui ont eu lieu en même temps dans différentes régions ou pays, ou continents, en particulier pour *S. enterica* (14). Le choix d'un panel de marqueurs MLVA basé sur l'utilisation de marqueurs de TR à petites tailles (2-8pb) a été rapporté par plusieurs publications dont certains TR sont instables (19). Les protocoles standards d'efficacité de nouveaux protocoles de MLVA sont caractérisés par leur capacité de typage, leur reproductibilité, leur stabilité, leur concordance épidémiologique, ainsi que leur pouvoir de discrimination élevé (3).

En raison du rôle important de *Salmonella enterica* dans les toxi-infections alimentaires, de nombreuses méthodes de typage ont été développées et utilisées pour retracer la chaîne épidémiologique dans le but de confirmer les agents étiologiques de l'infection. En général, la viande de volaille et les œufs sont considérés comme le principal vecteur de transmission des salmonelles. Le sérotypage de *Salmonella* par l'agglutination de l'antigène polysaccharide

spécifique O (antigène somatique O) et de l'antigène flagellaire H de phase 1 et 2 (H1 et H2) est l'une des approches couramment utilisées pour la classification des souches de *Salmonella* dans la nomenclature de Kauffman et White (18). Les antigènes O et H sont très variables et sujets à une combinaison créant plus de 2 579 sérotypes différents de *S. enterica* (20). Une épidémie de salmonellose implique souvent des souches épidémiques prédominantes sur de grandes distances géographiques, et une adaptation à l'hôte sur une longue période de temps (21).

Certains sérotypes de *S. enterica* ont des réactions d'agglutination croisées de l'antigène O ou H avec *E. coli* et d'autres espèces de bactéries, ce qui limite la spécificité du test sérologique de sérotypage (22). Il est nécessaire d'optimiser la discrimination entre les souches liées à une épidémie de celles non liées à un épisode de salmonellose de même origine. Ainsi, il existe de nombreuses méthodes de typage moléculaire inter-sérotypes ou intra-sérotypes de *S. enterica*, utilisant différentes méthodes : la ribotypie (23), la réaction ERIC-PCR (24), le polymorphisme de taille de fragments amplifiés dans le génome (AFLP) (25), l'amplification aléatoire de séquences d'ADN (RAPD) (26), l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) pour la séparation de fragments (27), le polymorphisme de longueur de fragments de restriction après amplification génique (PCR-RFLP) (28), le typage par détermination de la séquence nucléotidique de plusieurs gènes codant des fonctions essentielles à la bactérie (MLST) (29). La reproductibilité et la capacité discriminante sont inégales selon la méthode. Depuis 2003, la méthode de génotypage par MLVA de *S. enterica*, notamment les sérotypes Typhi, Typhimurium, Enteritidis et Newport (14, 15, 30, 31, 32). Cette méthode est considérablement plus rapide que la PFGE et a montré une discrimination moléculaire élevée (3).

Neuf génomes de *S. enterica* (*Salmonella* Typhi Ty2, *Salmonella* Typhi CT18, *Salmonella* Choleraesuis SC-B67, *Salmonella* Paratyphi B SBP7, *Salmonella* Paratyphi A strain ATCC9150 and AKU_12601, *Salmonella* Paratyphi C strain RKS4594, *Salmonella* Typhimurium LT2, et *Salmonella* Arizonae 62z4z23) sont entièrement séquencés, ce qui permet la recherche de régions de VNTR dans le génome des ces souches (<http://minisatellites.u-psud.fr>). Il existe plusieurs moyens d'améliorer notre connaissance de la diversité génétique des salmonelles, en particulier la découverte de nouveaux VNTR plus discriminants, mais aussi l'utilisation de panels de VNTR sur des populations de salmonelles encore peu étudiées, par exemple en raison de leur origine géographique.

L'étude présentée ici porte sur la diversité génétique de salmonelles isolées au Cambodge à partir d'échantillons biologiques humains et alimentaires (cuits et crus). Cette diversité a été étudiée à l'aide d'un panel original de marqueurs génétiques polymorphes VNTR décrits dans la littérature. Les marqueurs ont été choisis en fonction de leur pouvoir discriminant et de leur

capacité à étudier la diversité génétique d'une population bactérienne comprenant une multiplicité de sérotypes, issus d'une zone géographique localisée à Phnom Penh.

Les objectifs de cette étude sont donc d'une part de sélectionner des marqueurs VNTR, d'autre part d'évaluer par la technique MLVA la diversité phénotypique et génotypique d'une population de salmonelles, d'origine humaine et alimentaire, isolées à Phnom Penh, au Cambodge entre 2001 et 2007, et enfin de comparer cette diversité à celle de populations de salmonelles d'autres origines.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A- CARACTERES BACTERIOLOGIQUES DES SALMONELLES

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Sept caractères permettent de définir ces entérobactéries (33). Ce sont des bactéries cultivant sur les milieux ordinaires, bacilles à Gram négatif (Gram -), mobiles grâce à une ciliature péritriche ou immobiles, aéro-anaérobies facultatives fermentant le glucose avec ou sans production de gaz, réduisant les nitrites en nitrates et ne possédant pas d'oxydase.

1-Identification biochimique et nomenclature.

L'identification biochimique d'une souche du genre *Salmonella* est basée sur les caractéristiques suivantes : l'absence d'uréase et de tryptophane désaminase, l'absence de production d'acétoïne (Voges-Proskauer), l'absence de fermentation du lactose, de l'adonitol et de 2-céto-gluconate, la production de SH_2 à partir du thiosulfate, la décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine et la culture positive fréquente sur le milieu citrate de Simmons.

C'est en 1885 que l'américain Daniel E. Salmon a découvert la première souche de *Salmonella* (34). On en connaît aujourd'hui 2579 sérotypes différents (20) et la liste n'est pas close. L'espèce bactérienne est maintenant définie comme un groupe d'hybridation ADN-ADN dont les membres ont des ADN hybridant à plus de 70% entre eux, avec une instabilité thermique des hybrides (ΔT_m) inférieure à 5°C. Sur ces bases, la famille des entérobactéries comporte actuellement plus de 120 espèces génomiques. Kauffmann considérait chaque sérotype de *Salmonella* comme une espèce et leur donnait un nom latin (noté en italique : *Salmonella Typhimurium*). Il reconnaît également dans le genre des sous-genres numérotés de I à IV. Le sous-genre III correspond à ce que les Américains appelaient Arizona.

L'événement de la taxonomie moléculaire allait donner une base objective à la classification.

Les hybridations génomiques ADN-ADN ont mis en évidence 2 espèces génomiques dans le genre *Salmonella* : *S. enterica* espèce habituelle et *S. bongori*, espèce rare. *S. enterica* renferme six sous-espèces (le chiffre romain numérotant la sous-espèce correspond à celui de l'ancien sous-genre) : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) et *indica*

(VI). Avant d'être placée au rang d'espèce, *S. bongori* avait le statut de sous-espèce (V). Les sous-espèces ainsi définies et les sous-genres de Kauffman sont superposables, à l'exception du sous-genre III (Arizona) qui a été scindé en deux sous-groupes d'hybridation contenant les sérotypes monophasiques (sous-espèce *arizonae* : IIIa) et les sérotypes diphasiques (sous-espèce *diarizonae* : IIIb). Il en résulte des modifications de nomenclature (tableau 1).

Les 7 sous-espèces sont différenciables à l'aide d'un certain nombre de caractères biochimiques : utilisation du malonate, possession d'un beta-galactosidase (test ONPG), gélatinase, culture en présence de KCN, production d'acide à partir de ducitol, sorbitol, galacturonate, mucate, L-tartrate, salicine, lactose, γ -glutamyl-transférase, β -gluronidase.

Les souches de *Salmonella* sont ensuite classées en sérotypes (ou sérovar) sur la base de la diversité du lipopolysaccharide (LPS=antigène somatique O) et des antigènes flagellaires H d'après la classification élaborée par White en 1926 puis par Kauffman en 1972 et par Le Minor en 1978 (tableau 2 et 3) (33).

Tableau 1 : Nomenclature des *Salmonella*

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce <i>enterica</i> sérotipe Typhimurium ou <i>Salmonella</i> sérotipe Typhimurium ou <i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>Salmonella houtenae</i>	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèce <i>houtenae</i> sérotipe 43 :z4, z23 :-

En pratique courante, les sérotypes sont désignés par leur forme abrégée plutôt que par leur nom complet. Si un sérotipe de *Salmonella* a un nom cela signifie obligatoirement qu'il appartient à la sous-espèce *enterica*. L'abréviation d'un nom de genre (*Salmonella* = *S.*) n'est permise que si elle est suivie de l'épithète espèce (*S. enterica*). La très grande majorité (99,7 %) des souches de *Salmonella* isolée en pathologie humaine ou d'animaux à sang chaud appartient à la sous-espèce *enterica* (33, 35).

Tableau 2 : Identification biochimique de *Salmonella enterica* et de *Salmonella bongori*.

	Sous-espèces de <i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmonella bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbotol	+	+	+	+	+	-	+
Culture avec KCN	-	-	-	-	+	-	+
L (+)-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
glutamyltransférase	+	+	-	+	+	+	+
β -glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	d	-
Lyse par phase O:1	+	+	-	+	-	+	d

Les symboles: + : 90% ou plus de réactions positives ; - : 90% ou plus de réactions négatives ;
d : réactions variables

2- Structure antigénique

Les *Salmonella* possèdent 3 types principaux d'antigènes (33): antigènes somatiques O (" O " pour Ohne Hauch qui signifie pas d'essaimage), antigène d'enveloppe (Vi essentiellement capsulaire) et antigènes flagellaires H (H pour Hauch qui signifie essaimage) (figure 1).

L'essaimage est une alternative à la nage qui est observée lorsque des bactéries flagellées sont présentes sur un milieu solide. La nage est le type de mobilité le plus fréquent qui s'observe soit dans des milieux liquides soit dans des milieux semi-solides. La nage résulte de la présence de flagelles. Ce phénomène est bien connu chez certaines espèces du genre *Proteus* (*Proteus mirabilis*), mais il semble exister chez de nombreuses souches mobiles (*Serratia* sp., *Vibrio* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Rhodospirillum* sp., *Azospirillum* sp., *Yersinia* sp., *Aeromonas* sp.). L'essaimage nécessite une transformation morphologique des

bactéries. En milieu liquide, les bactéries sont courtes et portent quelques flagelles mais, en milieu solide, les bactéries s'allongent et présentent de très nombreux flagelles.

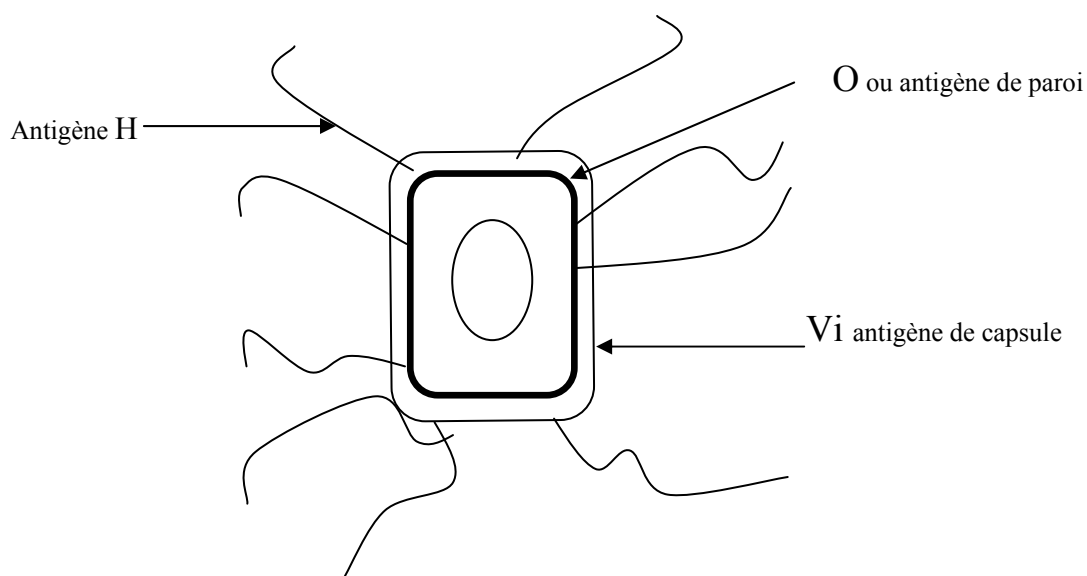


Figure 1 : Localisation cellulaire des antigènes de *Salmonella* (Source : Bouvet P. *Salmonella* : Biochimie, 2002)

2-1. Le lipopolysaccharide (LPS) ou antigène O

Tous les bacilles Gram (-) synthétisent un lipopolysaccharide (appelé LPS) ou antigène somatique O ou endotoxine pour évoquer ses propriétés toxiques qui ne sont exprimées qu'après la lyse de la bactérie.

Le LPS est une macromolécule complexe présente à la surface de la bactérie dont il représente le composant majoritaire (10^5 à 10^6 molécules par cellules). Le LPS est l'un des composants de la membrane externe le plus étudié chez les *Salmonelles* et chez les autres bactéries à Gram négatif car cette molécule induit une myriade d'effets biologiques parmi lesquels beaucoup ont une place importante dans la pathogenèse des infections. Le LPS est un élément essentiel du maintien de l'intégrité de bactéries à Gram négatif et agit comme une barrière contre l'entrée des petites molécules dans la bactérie. Le LPS est hautement immunogène avec pour conséquence la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les épitopes glycosylés présents dans la partie polysaccharidique.

Au moins 30 gènes situés aux loci *rfa*, *rfb*, et *rfc* sont requis pour la synthèse du LPS. Les protéines exprimées par les gènes sont des antigènes somatiques thermostables et alcoolostables qui sont composés de complexes glucido-lipido-protéiques. L'analyse chimique des antigènes révèle des polysaccharides (60%), des lipides (20 à 30%) et de l'hexosamine (3,5 à 4,5%). Le

LPS est constitué de 3 régions qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : le lipide A, le noyau ou core, et le polysaccharide spécifique (figure 2).

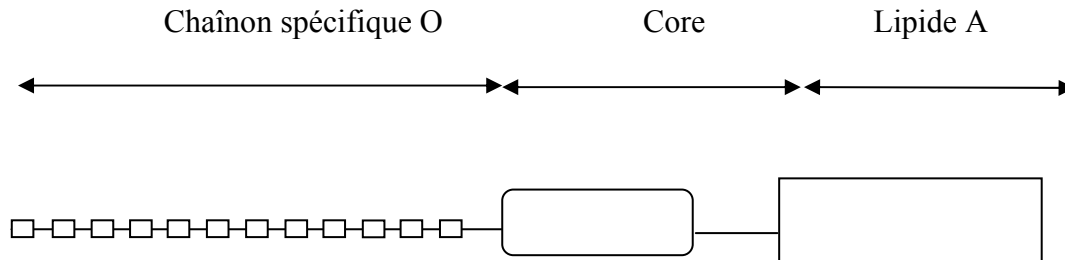


Figure 2 : Représentation schématique d'un LPS de colonie type S (Source : Bouvet P. *Salmonella* : Biochimie, 2002).

- **Le lipide A** : constitué d'un squelette de deux molécules de N-acetyl-D-glucosamine phosphorylées, d'une molécule de 4-amino-L-arabinose et d'une molécule d'éthanolamine. Ce squelette est lié à de longues chaînes d'acides gras. Il est vraisemblablement identique chez toutes les entérobactéries. Le lipide A est indirectement, très largement responsable du choc septicémique (ou choc endotoxinique) observé lors des septicémies à bacille Gram négatif. Il agit indirectement en forçant les cellules à sécréter des médiateurs qui agissent localement ou à distance par voie sanguine. A la suite de l'action des endotoxines, les macrophages du système immunitaire synthétisent des protéines, des radicaux libres oxygénés et des lipides.

- **Le core** ou noyau polysaccharidique de base est constitué chez les *Salmonella* de 2 sucres inhabituels : l'acide 3-désoxy-D-manno-2, octulosonique (ou céto-désoxyoctonate ou KDO), d'un heptose (L-glycero-D-manno-heptose), de sucre (glucose (glc), galactose (gal), N-acétylglucosamine (GlcNac) et de la phosphoryléthanolamine. Le core est identique chez toutes les *Salmonella* mais 4 types existent chez *E. coli*. Chez les *Salmonella* de sérotype Typhimurium le noyau contient 5 hexoses (noyau externe) suivi de 3 heptoses puis de 3 KDO (noyau interne). Les molécules de KDO (2 ou 3 selon les études) servent à la jonction entre la partie polysaccharidique et le lipide A.

Le polysaccharide spécifique est constitué par la polymérisation d'unités oligosaccharidiques se composant de 2 à 6 monosaccharides : des hexoses comme le glucose, galactose, mannose, des 6-désoxyhexoses comme le fructose ou le rhamnose et des 3,6 didésoxyhexoses ; le colitose, le

paratose (groupe 2 [A]), l'abéquose (facteur O :4 du groupe 4 [B]) et le tyvélose (facteur O :9 du groupe 9[D]) branchés en 1-3 sur la mannose. Chez les *Salmonella*, le polysaccharide spécifique comporte plus de 10 (habituellement de 20 à 40) unités oligosaccharidiques.

2-2. L'antigène d'enveloppe Vi

La capsule est une entité morphologique que l'on peut mettre en évidence à l'aide de techniques simples (coloration à l'encre de chine par exemple). Lorsque les constituants polysaccharidiques excrétés par la cellule bactérienne sont plus ou moins libérés dans le milieu en lui conférant une forte viscosité et ne constituent plus une entité morphologique, on parle de couche muqueuse. Le plus souvent la nature chimique des capsules est une structure polysidique polymérisée. Les oses constitutifs sont très variés. Les plus fréquemment rencontrés sont les hexoses neutres, les 6-désoxyhexoses, les polyols, les acides uroniques et les sucres aminés. On peut y trouver associés des groupements phosphate, formate, pyruvate et succinate.

L'antigène Vi est l'un des plus importants du point de vue du diagnostic dans le genre *Salmonella*. L'antigène Vi est un polysaccharide exprimé par la très grande majorité des souches de *Salmonella* Typhi, plus rarement par des souches de *Salmonella* Paratyphi C et exceptionnellement par des souches de *Salmonella* Dublin.

2-3. Les flagellines ou antigène H

Les flagelles sont des appendices qui permettent à la bactérie de se mouvoir. Les flagelles présentent 3 parties principales : le filament hélicoïdal, une partie coudée qu'on appelle le crochet et le corpuscule basal (partie intracellulaire du flagelle). Le filament est de grande longueur (10µm) de forme hélicoïdale, comprenant plusieurs tours de spires et totalement rigide. Chez la plupart des espèces, il est composé de sous unités protéiniques formant une seule protéine, la flagelline. Selon les espèces, la taille du monomère de flagelline varie de 15 Kda. Les régions C- et N-terminales qui sont responsables de l'assemblage et du transport sont hautement conservées. La région centrale est au contraire hautement polymorphique et donne aux différents flagelles les propriétés spécifiques de la molécule de flagelline. Le crochet est très court (60 nm), présente la même architecture générale que le filament mais contrairement à lui, il est très flexible car il doit transmettre le mouvement de rotation d'un moteur dont l'axe est perpendiculaire à la surface cellulaire. Le corpuscule basal correspond à la zone d'insertion du flagelle dans le corps cellulaire. Sa structure est complexe mais on peut imaginer une partie fixe (ou stator) et une partie mobile (ou rotor) et un inverseur qui déclenche le mouvement de rotation

dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. D'autres protéines sont présentes. On peut citer les protéines membranaires Mot (pour motor) qui interviennent dans la rotation du moteur et le sens de rotation.

La lettre H de cet antigène vient du mot allemand Hauch qui signifie film en rapport avec le phénomène d'essaimage.

Les flagelles sont des polymères de sous unités protéiques de flagelline, une protéine fibreuse de masse moléculaire 50.000 Da. La polymérisation de la flagelline est un phénomène physique qui se produit spontanément lorsque les flagellines sont placées dans un milieu de salinité appropriée. Ces antigènes sont thermolabiles. La composition en acides aminés et la structure primaire déterminent la spécificité de nombreux antigènes H. Ces antigènes sont lentement détruits par l'alcool. Les antigènes flagellaires H de *Salmonella* sont typiquement diphasiques. La grande majorité des sérotypes peuvent exprimer alternativement deux spécificités pour leur antigène flagellaire. En effet, il existe deux systèmes génétiques (*fliC* et *fliB*) situés à deux endroits séparés du chromosome. De manière aléatoire, avec une fréquence de 10^3 à 10^5 (toute les 1000 à 100.000 divisions), le gène silencieux est exprimé alors que le premier gène ne l'est plus.

C'est le phénomène de variation de phase. Le gène *fliC* est soumis à la répression par le produit du gène *fliAb* (qui fait partie de l'opéron *fli*). L'expression de l'opéron *fli* empêche donc l'expression du gène *fliC*.

Le schéma ci-dessous (figure 3) détaille le mécanisme génétique du phénomène de l'inversion de phase.

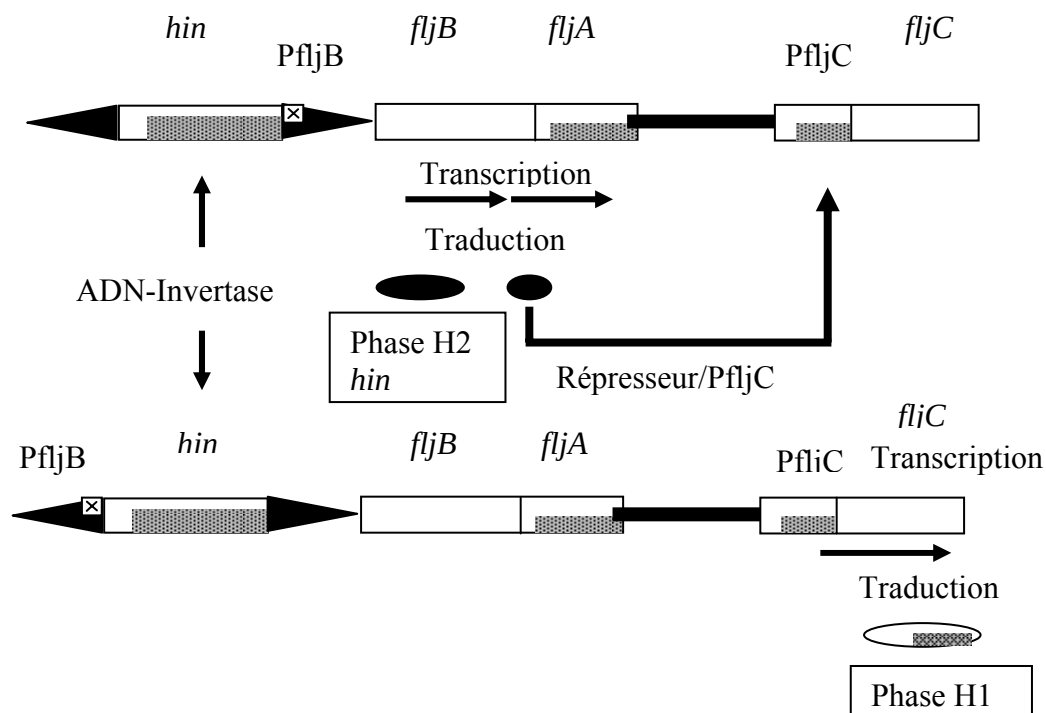


Figure 3 : Représentation schématique d'un mécanisme génétique du phénomène de l'inversion de phase (Source : Bouvet P, 2002)

3-Les méthodes d'isolement

3-1. Caractéristiques culturelles

Après 18-24h d'incubation, les colonies ont un diamètre de 3-4mm. Mais certaines cultures donnent des colonies naines, aspects constants sur certains sérotypes (*S. enterica* Abortus ovis, *S. enterica* Typhi-suis), exceptionnel (mutants) pour la grande majorité des sérotypes qui cultivent habituellement sous formes de colonies de tailles normales. L'aspect muqueux ne se voit qu'après plusieurs jours. Exceptionnellement on peut montrer des souches de Salmonelles cultivant sous forme de colonies muqueuses, dont les dimensions et l'aspect rappellent ceux des Klebsielles. L'aptitude à cultiver sous forme de colonies muqueuses est perdue après quelques mois de conservation. Il est rare d'isoler à partir de l'organisme des cultures sous formes R, à l'exception de celles provenant des urines, où les Salmonella sont fréquemment isolées pour des raisons non élucidées (36).

Principe de la méthode d'isolement des salmonelles

La recherche des salmonelles dans un échantillon humain, animal ou alimentaire a pour but de mettre en évidence un petit nombre de ces bactéries au sein d'une flore abondante (associée ou de contamination). C'est pour cette raison que les méthodes mises en œuvre classiquement, visent à favoriser la multiplication des Salmonelles et à inhiber les flores adventices. Une analyse pour la recherche de Salmonelle a un caractère qualitatif et non quantitatif. Le résultat est exprimé en terme de présence ou absence de *Salmonella* dans x grammes d'un aliment (plan d'interprétation à 2 classes) ou dans un produit biologique (sang, selles) (36).

3-2. Méthodes conventionnelles ou méthodes classiques.

3-2-1- Isolement de salmonelles dans des produits pathologiques d'origine humaine

a- des selles ou coproculture, comprend 3 étapes :

- L'enrichissement en milieux sélectifs liquides
- L'isolement sur milieux sélectifs solides.
- L'identification

b- du sang (ou hémoculture), comprend 2 étapes :

- L'isolement sur milieux liquides
- L'identification

3-2-2- Recherche des salmonelles dans des aliments

La recherche des salmonelles dans un aliment est normalisée et comprenant 4 étapes

- Le pré-enrichissement
- L'enrichissement en milieux sélectifs liquides
- L'isolement sur milieux sélectifs solides
- L'identification

B- METHODES DE TYPAGE MOLECULAIRE

1-Méthodes moléculaires définitives

Ce sont des méthodes de typage dont les résultats de différentes expériences peuvent être comparées directement, et dont les résultats sont transférables (37).

1-1. Typage par séquençage de loci (MLST)

Le MLST est une méthode de séquençage partiel de l'information génétique de souches bactériennes et de certains eucaryotes unicellulaires, parasites ou champignons. Il porte sur des portions de gènes constitutifs d'agents pathogènes dits « gènes de ménage » désignant un gène dont l'expression est indispensable et qui est responsable du métabolisme de la cellule. Les gènes séquencés ont la particularité d'être indépendants des gènes de virulence de l'agent pathogène, de sa résistance aux antibiotiques, ainsi que des caractères phénotypiques cliniques observables chez l'individu qui en est infecté. Ces derniers caractères dépendent d'ailleurs autant de l'individu lui-même que de l'agent pathogène. L'intérêt de cette méthode standard de séquençage est de permettre l'établissement d'importantes bases de données répertoriant chaque séquençage, et à laquelle des laboratoires du monde entier ont non seulement accès, mais peuvent également participer en partageant les séquences des souches qu'ils étudient.

Le séquençage puis la comparaison de ses résultats avec les bases de données, sont un moyen pour les épidémiologistes non pas d'envisager l'impact potentiel de l'agent pathogène sur la population au cours de son évolution, car les gènes étudiés sont indépendants de ces facteurs de virulence, mais d'analyser la répartition de chaque souche pour ensuite tenter de prévoir leur propagation dans la population (38).

1-2. Analyse du polymorphisme de répétition en tandem (MLVA)

L'analyse MLVA est une méthode d'analyse de loci de répétitions en tandem polymorphe pouvant être utilisée pour de nombreuses bactéries. Elle exploite comme source de

polymorphisme la variation du nombre de motifs dans les répétitions en tandem. Le terme "MLVA" est surtout utilisé dans le cadre du typage de bactéries. L'amplification par PCR d'une collection de loci répétés en tandem, et la mesure de la taille des fragments amplifiés, permettent d'assigner à une souche une série de nombres correspondant au nombre d'unités répétées présentes dans chaque locus (3). Un site dédié à cette technique et une base de données de séquences répétées en tandem de nombreux génomes complètement séquencés a été mis à disposition (<http://minisatellites.u-psud.fr>) (18).

2- Méthodes moléculaires comparatives

Pour certaines méthodes de typage, les résultats de différentes expériences ne peuvent pas être directement comparés, et sont non transférables (37) :

2-1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant ou SDS-PAGE

Électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) sépare les protéines en fonction de leur taille (figure 4). SDS est un détergent qui dissocie et déplie les sous-unités des protéines oligomériques. Le SDS se lie aux polypeptides pour former des complexes leur conférant une charge négative. La vitesse de migration électrophorétique dans un gel est donc déterminée uniquement par la taille de la molécule polypeptidique. Le poids moléculaire est déterminé par la migration simultanée de protéines marqueurs de poids moléculaires connus. SDS-PAGE est une technique largement utilisée en biologie, en biochimie, et en génétique pour séparer les protéines et les identifier selon leur masse moléculaire (39).

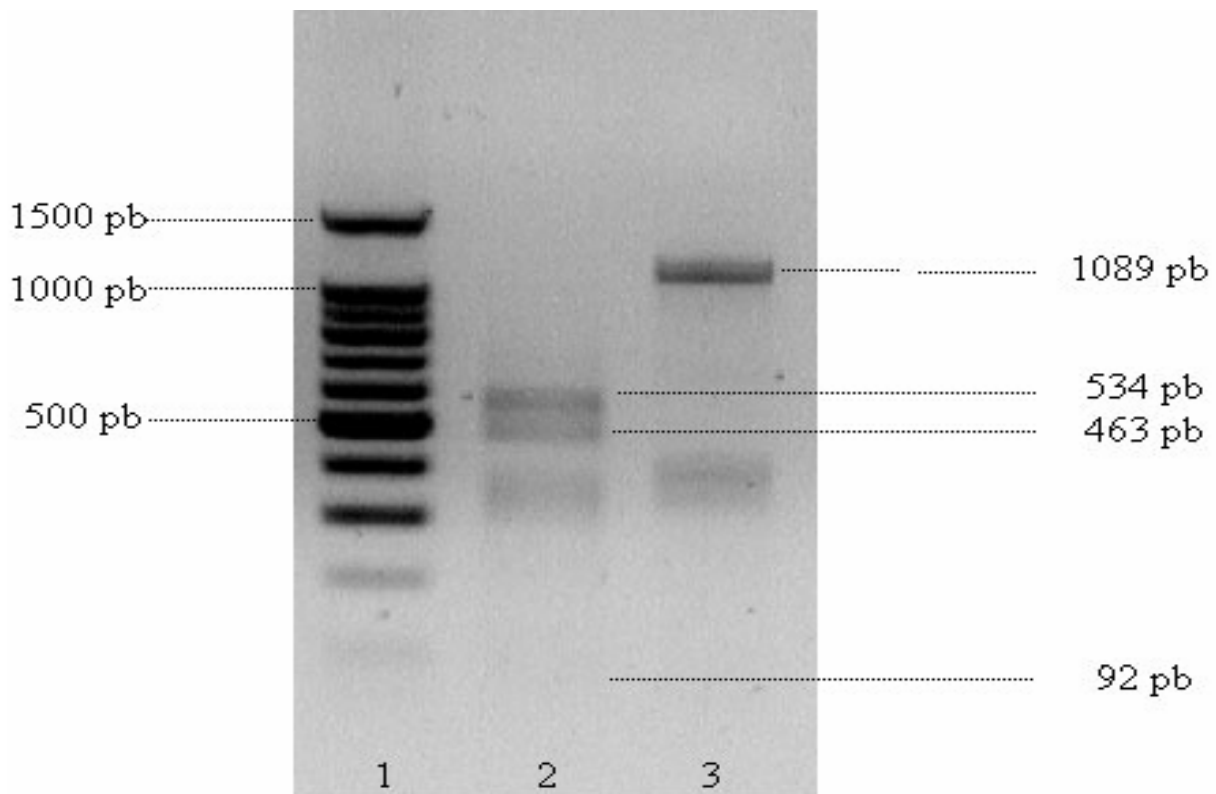


Figure 4 : Image d'un gel SDS-PAGE après coloration des protéines. Les marqueurs de poids moléculaires sont indiqués dans la première colonne de gauche (Source : <http://www.absoluteastronomy.com/topics/SDS-PAGE>)

2-2. Profil plasmidique

L'analyse du profil plasmidique implique l'extraction d'ADN plasmidique et la séparation par électrophorèse. Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaire extra chromosomique qui peut se répliquer indépendamment des chromosomes. Ils contiennent des gènes normalement peu essentiels à la croissance cellulaire ou à la survie et procèdent d'un simple mécanisme de transfert de l'ADN entre des individus d'une même espèce bactérienne. Après migration en gel d'agarose, les plasmides sont visualisés sous la lumière UV et leurs tailles sont estimées par rapport à des plasmides de tailles connues isolés à partir de souches de référence par exemple d'*E. coli* (40) (Figure 5).

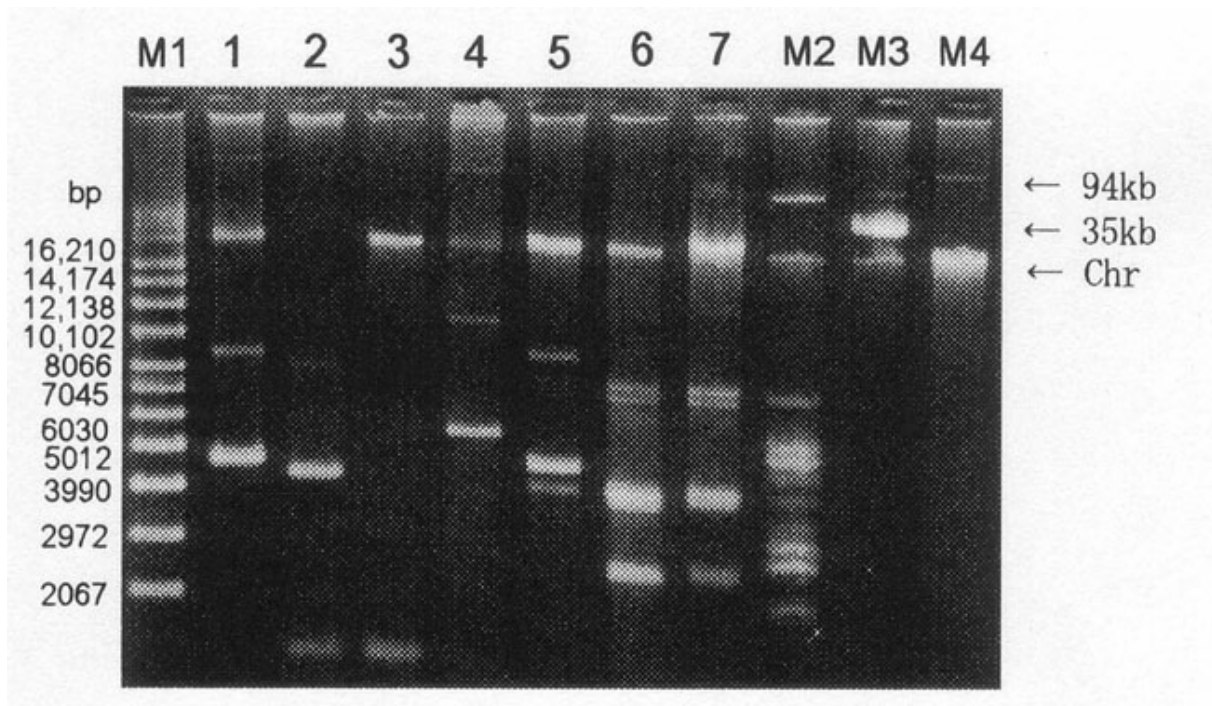


Figure 5 : Image d'un profil de migration plasmidique. Les plasmides sont isolés de 7 isolats différents. M1: échelle connue en paires de bases (pb) d'ADN super enroulé. M2-4: Plasmides de tailles connues. Chr: ADN chromosomique (Source : <http://www.nih.go.jp/JJID/56/77.html>).

2-3. Analyse par des enzymes de restriction ou REA

Dans cette technique, des fragments d'ADN sont obtenus après digestion par des enzymes de restriction, et leurs tailles sont comparées, fournissant une carte physique du génome, des gènes, ou d'autres segments de l'ADN (41). Les enzymes de restriction ont été découverts autour des années 60 au cours des enquêtes sur le phénomène de restriction d'hôte spécifique et la modification des virus bactériens. Les enzymes de restriction protègent les bactéries des infections par des virus, et il est généralement admis qu'il s'agit de leur rôle dans la nature. Elles fonctionnent comme un système immunitaire microbien. Une souche d' *E. coli* à laquelle il manque une enzyme de restriction peut être infectée par un virus, qui la détruit. Plus une souche bactérienne possède d'enzymes de restriction, moins elle est vulnérable. EcoRI et EcoRII d'*Escherichia coli*, et HindII et HindIII d'*H. influenzae* sont parmi les premières enzymes de restriction purifiées. Ces enzymes ont été découvertes par clivage d'ADN à des sites spécifiques. Les chercheurs n'ont pas tardé à reconnaître que les enzymes de restriction pouvaient leur fournir un remarquable outil pour étudier l'organisation des gènes, leur fonction et leur expression. Werner Arber, Daniel Nathans, et Hamilton O. Smith ont obtenu le prix Nobel

de Physiologie ou Médecine en 1978 pour la découverte de ces enzymes de restriction (Figure 6) (42).

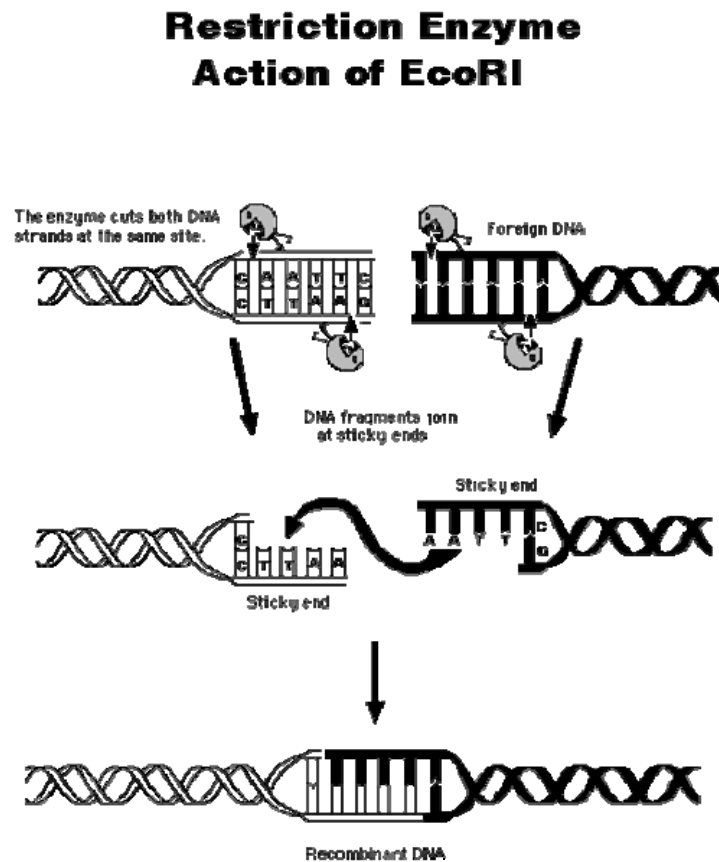


Figure 6 : Mécanisme d'action de l'enzyme de restriction Eco RI. L'enzyme de restriction EcoRI, la première enzyme de restriction isolée de la bactérie *E. Coli*, est capable de reconnaître la séquence de base 5 'GAATTC 3'. L'enzyme coupe chaque brin d'ADN entre G et A dans cette séquence. La coupure génère des "bouts collants" d'ADN. Chaque extrémité de simple brin possède la séquence 5'AATT 3'. Ces extrémités collantes s'associent obligatoirement à un fragment d'ADN qui contient la séquence de bases complémentaires (Source : http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Methods/restriction.html).

2-4. Ribotypage

Le ribotypage implique la prise des empreintes génétique des fragments de restriction d'ADN génomique contenant la totalité ou des partie des gènes codant pour les ARNr 16S et 23S. Le ribotypage est une méthode qui permet d'identifier et de classer les bactéries en fonction des différences de l'ARNr. Il génère une empreinte hautement reproductible et précise qui peut être utilisée pour classer les bactéries du genre à travers et au-delà du niveau de l'espèce. L'ADN est extrait à partir de quelques colonies de bactéries, puis coupé en fragments successifs. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane et hybridé avec une région de l'opéron ARNr qui permet de révéler les motifs de gènes d'ARNr (RiboPrint). Les résultats sont enregistrés, numérisés et stockés dans une base de données. Les variations dans la position et l'intensité des bandes

d'ARNr entre les bactéries peuvent être utilisées pour leur classification et leur identification. Les bases de données pour *Listeria* (80 types de profils), *Salmonella* (97 types de profils), *Escherichia* (65 types de profils) et les staphylocoques (252 types de motifs) ont été établies. En outre, plus de 35 genres différents ont été testés et des modèles de RiboPrint obtenus. Ces bases de données continuent de croître avec le nombre des bactéries « ribotypées » (43).

2-5. Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe est une technique qui a été développée en 1990 (44) afin de construire des cartes génétiques. Le principe consiste à utiliser des amorces d'environ 10 paires de bases avec des températures d'appariement basses, 36- 45°C. Des appariements plus ou moins spécifiques ou des mésappariements permettent l'amplification d'une série de fragments de tailles différentes. Les fragments obtenus dépendent de l'appariement des amorces et de la distance entre ces appariements. Le peu de matériel nécessaire à la RAPD en fait une technique de base particulièrement intéressante pour observer des variations de population même si la faible reproductibilité entre laboratoires est un sujet fréquent de critiques (La présence d'artéfacts et d'amplifications dans le témoin négatif, et la variabilité entre les analyses d'un même échantillon ont été souvent décrites. En utilisant une concentration d'ADN suffisante sans être trop élevée (entre 10 et 100ng) et en standardisant au maximum les réactions (même polymérase, même thermo- cycleur, même manipulateur), la reproductibilité de la manipulation peut être fortement améliorée. L'avantage de cette technique, est qu'elle ne nécessite pas d'équipement spécifique, et que les bandes d'intérêts peuvent être excisées du gel d'électrophorèse pour le séquençage.

2-6. Amplification génique et restriction du produit amplifié (PCR-RFLP)

D'autres techniques utilisent à la fois l'amplification génique et la restriction du produit amplifié (PCR-RFLP) (45) (Figure 7).

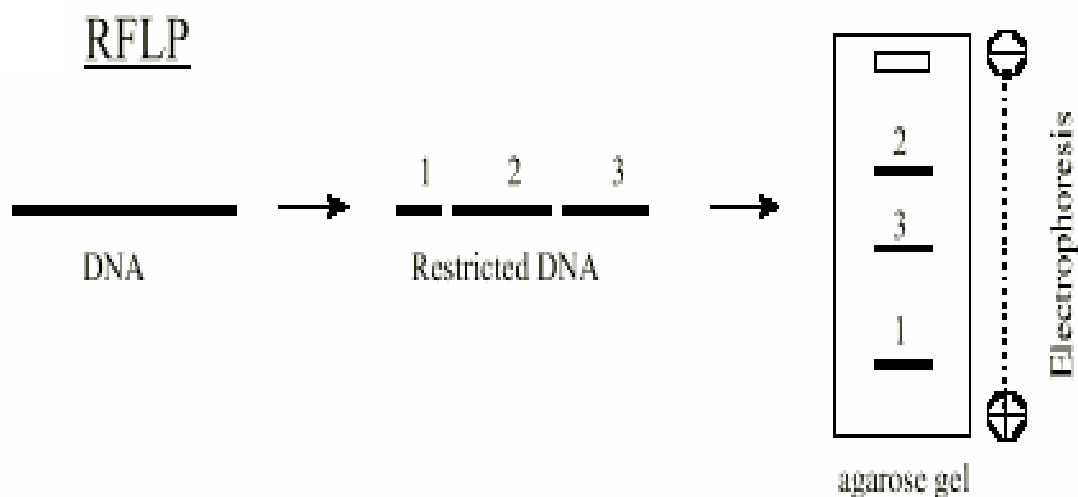


Figure 7 : Principe de technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Le fragment d'ADN est coupé en 3 morceaux (1, 2 et 3) par une enzyme de restriction. L'ADN est ensuite inséré dans un puits de gel d'agarose et les fragments sont séparés par électrophorèse. La séparation est basée sur la taille des fragments, les plus petits fragments migrant plus loin dans le gel. Ce modèle, appelé RFLP, représente une empreinte caractéristique de ce fragment d'ADN

(Source : <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/osullivan.html>).

2-7. Polymorphisme en longueur des fragments amplifiés (AFLP)

En raison des difficultés rencontrées avec les techniques d'amplification aléatoire, une nouvelle technique d'analyse génomique a été développée, le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment-Length Polymorphism ou AFLP) (46) (figure 8). L'ADN génomique est digéré par deux enzymes. Des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des sites de restriction. Les amorces peuvent ensuite se fixer sur les extrémités des fragments obtenus et ceux-ci sont amplifiés. La PCR peut être réalisée en plusieurs étapes : une première avec des amorces dont la séquence est identique à celle des adaptateurs et qui amplifie ainsi tous les fragments ; la seconde avec des amorces possédant de 1 à 3 nucléotides supplémentaires en 3' sélectionnant ainsi un plus petit nombre de fragments étant donné que ceux ci peuvent être très nombreux. L'utilisation d'amorces fluorescentes permet une comparaison standardisée de cette technique par électrophorèse capillaire. Il existe de nombreuses possibilités pour réaliser des AFLP, c'est à dire simuler des PCR et des gels grâce à des programmes informatiques. Ces simulations permettent de cibler au mieux les enzymes et les amorces à utiliser lors de la réalisation de l'expérience mais nécessitent de connaître la séquence génomique complète de certaines espèces présentes dans l'échantillon. L'AFLP est une technique puissante pour différencier des espèces voire des sous-espèces. Elle a été utilisée pour comparer des populations bactériennes présentes dans le sol, subissant une faible augmentation en hydrates de carbone, pour caractériser des types de *Clostridium botulinum* ou encore observer l'impact des dilutions sur la croissance d'une population bactérienne. L'avantage de cette technique, est de tester *in silico* pour choisir les enzymes intéressantes et permettre de différencier des espèces voire des sous-espèces. Les bandes présentant un intérêt peuvent être compatibles avec une analyse automatisée. Cependant cette technique est consommatrice de temps.

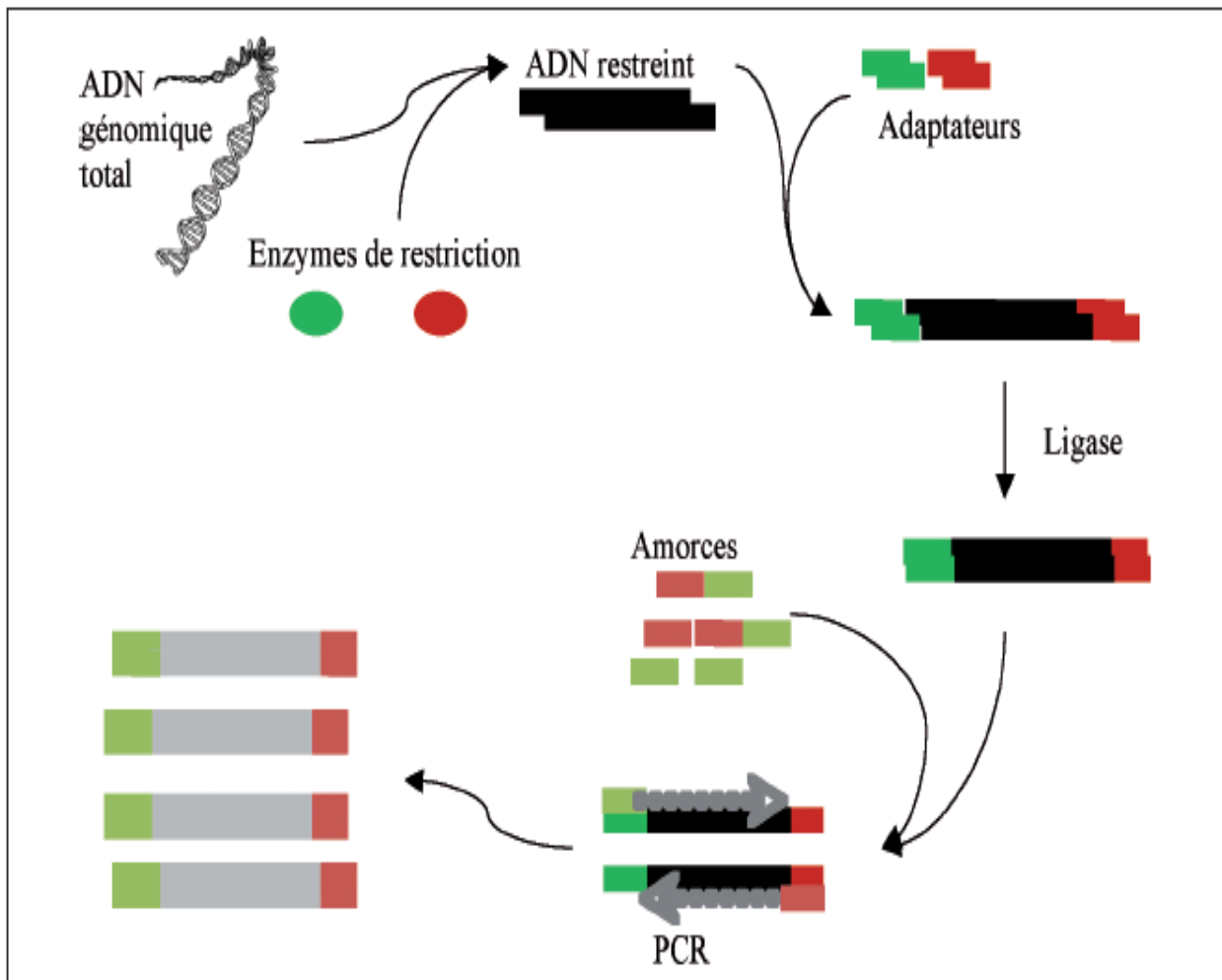


Figure 8 : Principe général d'un polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
(Source : <http://insilico.ehu.es/AFLP/info.html>)

2-8. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

La PFGE est une électrophorèse sur gel d'agarose utilisant des champs électriques alternés (47, 48). Les changements de direction des molécules en fonction de leur structure tridimensionnelle durant la migration font varier leur distance totale de migration. La PFGE permet de séparer des fragments de très grande taille, jusqu'à 10 Mb, alors que les électrophorèses traditionnelles séparent des fragments de taille maximum 50 kb. La PFGE peut être utilisée sur des génomes ou métagénomes entiers restreints avec des enzymes de restrictions coupant peu fréquemment (figure 9).

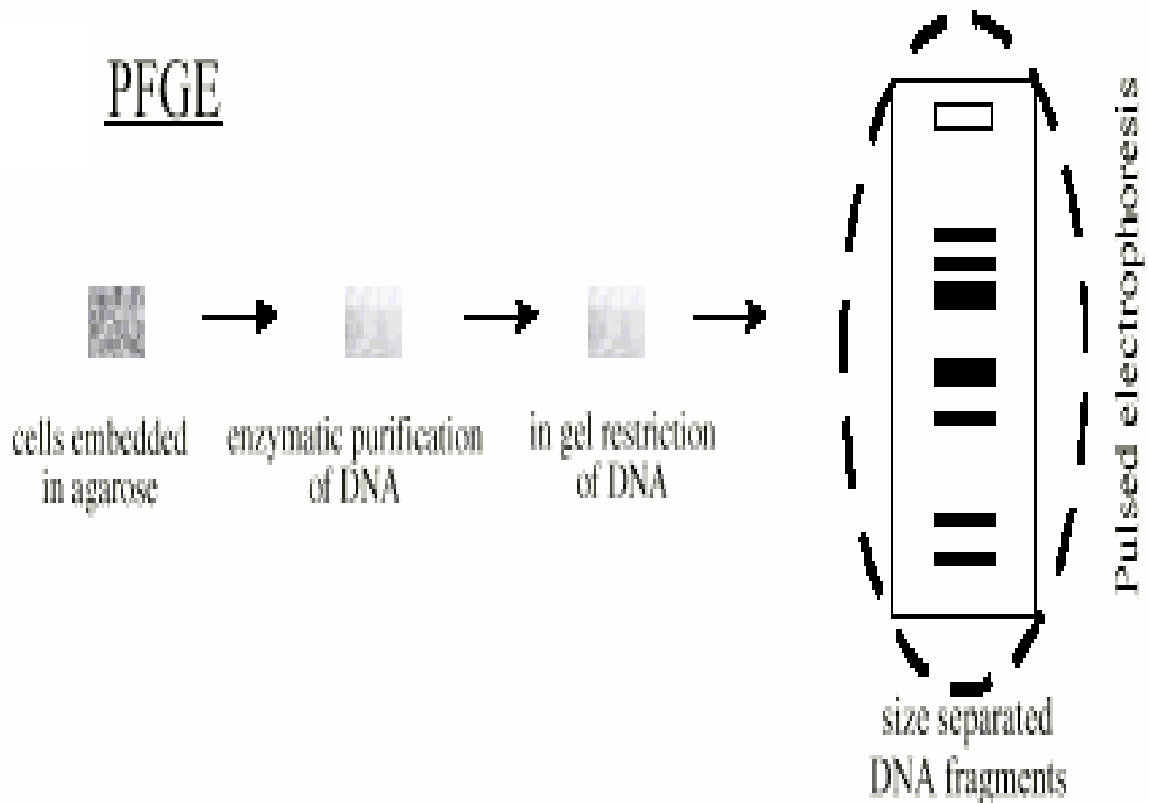


Figure 9 : Electrophorèse de gel en champ pulsé (PFGE). Cette technique est utilisée pour séparer les fragments de restriction de taille importante (50-1.000 kb). La totalité des cellules est noyée dans un bloc d'agarose et l'ADN est libéré par voie enzymatique, puis coupé *in situ* par des enzymes de restriction coupant rarement. Le bloc d'agarose est alors insérée dans un puits en gel d'agarose et les fragments de restriction sont séparés par un courant électrique qui donne des impulsions sous des angles différents.

(Source : <http://www.open-access-biology.com/probiotics/osullivan/osullivan.html>).

C- METHODES DE GENOTYPAGE UTILISEES POUR LES SALMONELLES

L'importance des salmonelloses, les conséquences économiques et en santé publique de ces pathologies, ont entraîné le développement de nombreuses méthodes moléculaires pour la caractérisation des salmonelles. Cette caractérisation s'appuie en premier lieu sur la détermination du sérotype, méthode très couramment employée, permettant de suivre les tendances évolutives des sérotypes dans différentes filières en vue de l'épidémiologie-surveillance des salmonelles. Les méthodes moléculaires sont des outils complémentaires d'investigation permettant de différencier des souches de même sérotype. Ces techniques, en général plus longues et fastidieuses à mettre en oeuvre, sont plutôt réservées aux enquêtes épidémiologiques dans un écosystème donné ou lors d'investigations suite à une toxi-infection alimentaire ou à une épidémie de salmonellose. A côté du sérotypage universellement reconnu, le choix des méthodes moléculaires doit tenir compte du pouvoir discriminant pour un sérotype donné.

Les méthodes de génotypage des salmonelles sont limitées à l'analyse des plasmides décrite précédemment (49) et aux techniques basées sur la PCR, qui sont notamment les suivantes :

- Un élément répétitif hautement conservé appelé « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » (ERIC) a été décrit et utilisé de façon universelle car les positions des séquences « ERIC » sur le chromosome sont variables selon les sérotypes (24).
- Le génotypage par le typage séquentiel de plusieurs loci (MLST) (50).
- Depuis 2003, la méthode de génotypage par MLVA de *S. enterica* a été introduite. Les avantages connus de cette technique sont les suivants : capacité de typage, reproductibilité, stabilité, concordance épidémiologique, ainsi que pouvoir de discrimination élevé en fonction des marqueurs et des sérotypes étudiés (3, 14, 15).
- La technique RAPD est une méthode de typage très utilisée. Les profils des produits amplifiés ainsi obtenus peuvent être caractéristiques de la souche et permettent une bonne discrimination au sein d'un sérotype donné (51).

Les techniques PCR ont l'avantage d'être simples à mettre en oeuvre et de permettre d'obtenir un résultat très rapide. Après la phase d'extraction de l'ADN, la PCR est réalisée, suivie de l'électrophorèse des produits amplifiés et de la révélation de ces produits par coloration au bromure d'éthidium, l'ensemble de ces étapes est réalisable dans une journée (52).

Par ailleurs, les techniques basées sur la digestion par les enzymes de restriction (« Restriction Enzyme Analysis » ou REA) sont les suivantes :

- Le ribotypage, a été décrit précédemment. Dans le cas des salmonelles, cette technique a été utilisée par exemple pour la caractérisation du gène de la flagelline, permettant ainsi une approche moléculaire d'identification des antigènes H dans le but de se substituer à la sérotypie ou de révéler une phase flagellaire antigéniquement non décelable. Les gènes de flagelline de certains sérotypes ont donc été amplifiés puis clivés par des endonucléases HhaI ou HphI. Des profils de restriction du gène de la flagelline ont été obtenus pour les deux phases flagellaires, mais la diversité rencontrée dans ces profils ne correspondait pas de façon précise aux résultats de l'agglutination flagellaire.
- L'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE, développée par la suite. Les enzymes de macro-restriction utilisées pour le PFGE des *Salmonella* sont XbaI, BlnI ou SpeI (53). Cette technique a montré, de façon générale, un très bon pouvoir discriminant pour *Salmonella*, mais il existe des variations en fonction du sérotype étudié. C'est ainsi qu'il existe un bon polymorphisme par PFGE chez *Salmonella* Typhimurium après digestion par

XbaI alors que la même enzyme de restriction donne beaucoup moins de diversité chez *Salmonella* Enteritidis.

D'autres techniques utilisent à la fois l'amplification génique et la restriction du produit amplifié (PCR-RFLP) (54). Dans le cas des salmonelles, cette technique a été utilisée par exemple pour la caractérisation du gène de la flagelline, permettant ainsi une approche moléculaire d'identification des antigènes H dans le but de se substituer à la sérotypie ou de révéler une phase flagellaire antigéniquement non décelable. Les gènes de flagelline de certains sérotypes ont donc été amplifiés puis clivés par des endonucléases HhaI ou HphI. Des profils de restriction du gène de la flagelline ont été obtenus pour les deux phases flagellaires, mais la diversité rencontrée dans ces profils ne correspondait pas de façon précise aux résultats de l'agglutination flagellaire.

Malgré cette diversité, le sérotypage reste toujours la technique utilisée en première intention avant toute autre caractérisation et il permet une bonne discrimination avec plus de 2579 sérotypes répertoriés dans le monde (20).

Les méthodes moléculaires pour la caractérisation des salmonelles n'ont d'intérêt que si elles apportent une différenciation des isolats appartenant à un même sérotype. Pour chacune des techniques employées, il est important de connaître le pouvoir discriminant pour un sérotype donné, car celui-ci peut varier d'un sérotype à un autre. Ces techniques permettent d'évaluer la relation génotypique des souches étudiées pour lesquelles un lien épidémiologique est suspecté lors d'investigation d'une toxi-infection alimentaire par exemple.

L'interprétation des résultats apportés par la caractérisation moléculaire, doit se faire avec prudence toujours en confrontation avec les données épidémiologiques.

Enfin, en dehors de quelques essais d'inter-comparaison entre laboratoires, ces techniques ne sont pas standardisées à l'heure actuelle et il n'existe pas de référentiel commun à tous les laboratoires, permettant d'échanger de façon facile et rapide les informations concernant ces profils.

D- MARQUEURS VNTRs POUR ETUDE PAR MLVA DES SALMONELLES

Le développement de marqueurs VNTRs (Tableau 3) pour tester les salmonelles a commencé par une étude d'un sérotype unique, puis étendu à d'autres sérotypes de salmonelles. En 2003, Lindstedt et al. (15) a élaboré huit marqueurs sélectionnés dans les loci VNTR de *S. Typhimurium*, à discriminer des souches de *S. Typhimurium* DT104 et *S. Typhimurium*, qui ont

été recueillies sur une période de six ans (1996-2001). Les souches ont été isolées à partir d'échantillons humains et d'aliments en provenance de pays en Europe, en Asie et en Australie. Au cours de la même année, Liu et al. (30) ont développé une méthode de PCR utilisant cinq loci VNTR de Typhi CT18 pour l'analyse génotypique des souches de sérotype *S. Typhi*. Ces souches ont été isolées à partir d'échantillons de l'homme à Singapour, d'Indonésie, de l'Inde, le Bangladesh, la Malaisie, le Népal (les années 2000 et 2001). En 2004, deux autres marqueurs conçus à partir d'un plasmide de *S. Typhimurium* ont été testés avec les quatre marqueurs précédemment décrits en 2003 (16). Ils ont été utilisés pour discriminer *S. Typhimurium* DT104 des souches isolées de l'homme, d'aliments, d'animaux. Les souches sélectionnées de 1981 à 2004, étaient à l'origine de la Norvège. Dans la même année (2004), dix marqueurs ont été sélectionnés parmi les loci VNTR de *S. Typhimurium* LT2, CT18 Typhi et Ty2 (14), de discriminer *S. Typhimurium* et autres sérotypes de *S. enterica* (Anatum, Enteritidis, Gallinarum, Hadar, Montevideo, Newport, Paratyphi A, Paratyphi B et Typhi) isolés à partir d'échantillons humains isolés en France entre 1992 et 1999. En 2006, cinq marqueurs décrit précédemment, et cinq nouveaux loci conçu à partir de génome LT2 de *S. Typhimurium*, ont été utilisés pour discriminer *S. Typhimurium* et *S. Newport* (55). Chaque échantillon a été isolé à partir d'un seul patient admis à l'hôpital de l'Arkansas entre 1997-1998.

Un rapport publié en 2007 a examiné l'utilisation de marqueurs sélectionnés dans la séquence génomique partielle de *S. Enteritidis* LK5 et dans la séquence complète de *S. Enteritidis* PT4 (31). Les séquences du génome de *S. Typhi* CT18 et des souches de Typhi Ty2 et *S. Typhimurium* souche LT2, ont aussi été explorées dans le but de trouver des candidats marqueurs supplémentaires. Les marqueurs ci-dessus ont été utilisés pour tester des isolats de *S. Enteritidis* provenant de toxi-infections alimentaires et des cas humains sporadiques au Minnesota (1998- 2003). Pour l'étude de la variabilité des VNTR pour des souches de *S. Enteritidis* isolées de 1992 à 2007 (une collection d'Afrique, d'Asie et d'Europe), sept marqueurs précédemment décrits à partir des loci de *S. Enteritidis* (31) et *Typhimurium* LT2, et deux marqueurs de loci de *S. Enteritidis* (NCTC_13349 souche et la souche 07-2642) ont été utilisés pour discriminer les souches de *S. Enteritidis* (56). Une collection de *S. Typhi* dans le monde entier (1981-1995) a été testée en utilisant sept marqueurs précédemment décrits, ainsi que deux nouveaux marqueurs dans les loci de la souche de *S. Typhi* CT18 (57). Au même moment, une autre étude a développé une application de l'analyse MLVA à l'aide de deux marqueurs précédents (14) et a développé quatre autres marqueurs sélectionnés dans le génome de *Salmonella* Newport Str SL254 NC_011080. Ils ont été utilisés pour discriminer exclusivement les souches de *S. Newport* isolées de l'animal, les oiseaux sauvages et les humains dans l'État de

Washington (32). Ainsi entre 2003 et 2009, 58 marqueurs ont été sélectionnés à partir de 40 loci, et ont été développés et utilisés par différents auteurs dans des rapports publiés (Tableau 4).

Tableau 3: Répertoire de marqueurs VNTR décrits de 2003 à 2009, utilisés pour la technique MLVA pour le génotypage de *Salmonella enterica*

Year of utilization [reference]	Marker name									
2003 (13)	STTR1	STTR2	STTR3	STTR4	STTR5	STTR6	STTR7	STTR8		
2003 (28)	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5					
2004 (14)			(STTR3)		(STTR5)	(STTR6)			STTR9	STTR10pl
2004 (12)	Sal11 (TR1)	Sal02	Sal04	Sal06	Sal16 (STTR5)	Sal10	Sal15	Sal20	Sal22 (TR5)	Sal23
2006 (53)	819457L- 819457R	2341937L- 2341937R (STTR2)	3629542L- 3629542R (STTR3)	2628542L- 2628542R	3184543L 3184543R (STTR5)	2730867L- 2730867R (STTR6)	2531837L- 2531837R	3414090L- 3414090R (STTR8)	4596419L- 4596419R	4810628L- 4810628R
2007 (29)	SE-10 (STTR1)	SE-2	SE-6 (STTR3)	SE-3	SE-5 (STTR5)	SE-4	SE-7	SE-8	SE-9	SE-1
2008 (54)	SENTRI (STTR1) (SE-10)		SENTRI3	SENTRI4 (SE-1)	SENTRI5 (STTR5) (Sal16) (3184543L- 3184543R) (SE-5)	SENTRI6 (SE-2)	SENTRI2 (STTR7)		SENTRI7 (SE-9)	
2009 (30)	NEWPORT-A	NEWPORT-B	NEWPORT-M	NEWPORT-L	(STTR5)	(STTR6)				
2009 (55)		(Sal02)		(Sal06)	(Sal16)	(Sal10)			TR4500	TR4699

Entre parenthèses, les marqueurs déjà utilisés ou situés dans des VNTR loci identiques à ceux décrits dans la bibliographie

Tableau 4: Caractéristiques et spécificités des marqueurs de *Salmonella enterica* décrits dans la littérature de 2003 à 2009

VNTR locus	Locus (alias) [reference]	Souche de référence_location_ Bande de PCR nombre de TR	Primers F et R	PCR (bp)	Gène	DI (CI95%)
1	STTR1 (13)	LT2_815055_21bp_15U	F-CAGCAGTACAACCGTCAGCAGGAT R-GCCCCACCGTTAGCGCCCGATGTA	770	<i>tolA</i>	Na
	SE-10 (29)	LK5_774282_45bp_3.9U ^c and PT4_774282_45bp_8.1U ^d	F-GCTGAGATCGCCAAGCAGATCGTCG R-ACTGGCGCAACAGCAGCAGCAACAG	Not indicated	<i>tolA</i>	0.05 ^a
	SENTR1 (54)	PT4_774282_45bp_7.8U and 07-2642_774282_45bp_7.8U ^d	F-GCAACAGCAGCAGCAACAG R-CCGAGCTGAGATCGCCAAG	440(415)	<i>tolA</i>	0.07 ^a
2	STTR2 (13)	LT2_2341937_60bp_10U	F-GGGTTCCTTCCAGATTTACG R-TTTACCCGCGCATATTACCACACT	711	<i>sspH2</i>	Na
	2341937L- 2341937R(29)	LT2_2341937_60bp_10.3U	F-GTGGGTTCCTTCCAGATTT R-TTACCCGCGCATATTACCAC	712	<i>sspH2</i>	Na
3	STTR3 (13)	LT2_3629458_33bp_10U	F-CCCCCTAAGCCCCGATAATGG R-TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	490	<i>bigA</i>	0.25 ^a
	3629542L- 3629542(53)	LT2_3629542_33bp_10.9U	F-GAAAAACGCGCAAAACTCTC R-GCCACTGGTTGTCCTGTTCT	751	<i>bigA</i>	0.720(0.622-0.818) ^b
	SE-6(29)	LK5_3511025_33bp_10.8U and PT4_3511025_33bp_10.8U ^d	F-CCCCTAAGCCCCGATAATG R-GCCGTTGCTGAAGGT	Not indicated	<i>bigA</i>	0.07 ^a
4	STTR4 (13)	LT2_2630632_189bp_5U	F-GGCGCCGCTATGGGTGGTGA R-CAAAAGCGGTAGCGATGAGC	1,138	<i>shdA</i>	Na
5	STTR5 (13)	LT2_3184543_6bp_13U	F-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT R-GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	259	<i>yohM</i>	0.87 ^a
	Sal16 (STTR5) (12)	CT18_3041_6bp_14U Ty2_3027_6bp_16U LT2_3184_6bp_15U	F-CCATGGCTGCAGTTAATTTCT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	224 236 230	<i>yohM</i>	0.834 ^a
	3184543L- 3184543R (53)	LT2_3184543_6bp_13.3U	F-TTATTATTCTGAGCACCGCGT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	205	<i>yohM</i>	0.871(0.830-0.911) ^b
	SE-5 (29)	LK5_3073233_ ^f PT4_3073233_6bp_11.8U ^d	F-CCATGGCTGCAGTTAATTTCT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	Not indicated	<i>yohM</i>	0.77 ^a
	SENTR5 (54)	PT4_3073233_6bp_10U and 07-2642_3073233_6bp_10U ^d	F-CACCGCACAAATCAGTGGAAC R-GCGTTGAATATCGGCAGCATG	271(270)	<i>yohM</i>	0.65 ^a
6	STTR6 (13)	LT2_2730867_6bp_13U ^d	F- TCGGGCATGCGTTGAAA R- CTGGTGGGGAGAATGACTGG	342	Prophage related	0.90 ^a
	2730867L- 2730867R(53)	LT2_2730867_6bp_13.7U	F-TGCTGAGCATAAACGACATCA R-CAGCACCAGAAGCAATGGTA	168	Intergenic	0.816(0.755-0.877) ^b
7	STTR7 (13)	LT2_1039570_39bp_8U	F-CGCGCAGCCGTTCTCACT R-TGTTCCAGCGCAAAGGTATCTA	594	<i>ftsK</i>	Na
	SENTR2	PT4_954671_3bp_9.3U and	F- CACTGGACGATCTGGATTTCTC	519(510)	<i>ftsK</i>	0.07 ^a

8	(54) STTR8 (13)	07-2642_954671_3bp_9.3U ^d LT2_3414113_116bp_4U	R-GTCGCCGTTACGCATCAAC F-TTATGTCACCACGGCTGTCAAT R-AAGGCCAAATAGGGGTTTCATAAGG	925	No information	Na
	3414090L- 3414090R (53)	LT2_3414090_116bp_6.5U	F-AATTAATTGCCGATGGTGA R-AGCGATTGCTGGCCTAGAT	841	Intergenic	0.497(0.411-0.583) ^b
9	STTR9 (14)	LT2_3246672_9bp_3U ^d	F- AGAGGCGCTGCGATTGACGATA R- CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC	163	Intergenic	0.51 ^a
10	STTR10pl (14)	pSLT_53711_9bp_13U ^d	F-CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG R-GAAGGGGCGGGCAGAGACAGC	364	Intergenic	0.92 ^a
11	TR1 (28)	CT18_2017115_7bp_12U	F- AGAACCAGCAATGCGCCAACG A R- CAAGAAGTGCGCATACTACACC	261	Intergenic between <i>yedD</i> and <i>yedE</i>	0.834 ^a
	Sal11(TR1) (12)	CT18_2017_7bp_12U Ty2_1009_7bp_11U LT2_2053_7bp_2U	F-GCCAACGATCGCTACTTTTT R-GCGCATACTACACCGATCAC	239 232 169	Intergenic between <i>acrD</i> and <i>yffB</i>	0.466(0.345-0.587) ^b
12	TR2 (28)	CT18_2556810_8bp_27U	F- CCCTGTTTTTCGTGCTGATACG R- CAGAGGATATCGCAACAATCGG	511	<i>acrD</i>	0.964 ^a
13	TR3 (28)	CT18_2926145_27bp_3.3U	F-CGAAGGCGGAAAAACGTCCTG R-TGCGATTGGTGTCTGTTCTA C	545	Intergenic	Na
14	TR4 (28)	CT18_4396728_13bp_2.1U	F-AAAAGCCCGTCTAGTCTTGCGAG R-ATCCTTCGGTATCGGGGTATCC	421	Intergenic	Na
15	TR5 (28)	CT18_4624169_7bp_4.7U	F-TGAAAACCGGCTCGTAGCAGTG R-CATACGGTTACTGCGGGATTGG	194	Intergenic	Na
	TR5(Sal22) (12)	CT18_4624_7bp_6U Ty2_4607_7 bp_4U LT2_4645_7bp_3U	F-GCCAGAGGGTTTCATTTTCAA R-ATGCGACGCCGTTTTACTAC	184 170 163	Intergenic	0.473(0.425-0.521) ^b
16	Sal02 (12)	CT18_666_6 bp_10 U Ty2_2315_6 bp_15 U LT2_0681_6bp_3U ^f	F-GGAAAGACTGGCGAACAAT R-TCGCCAATACCATGAGTACG	149 179 107	<i>citT</i>	0.927 ^a
17	Sal04 (12)	CT18_0740_20bp_2U Ty2_2240_20bp_2U LT2_0764_20bp_1U ^f	F-TCGCACAGATGACCAATTTT R-GATCGACGCTCACTGCTTC	194 194 174	<i>speF</i>	0.406(0.322-0.490) ^b
18	Sal06 (12)	CT18_0764_6 bp_5U Ty2_2216_6 bp_6U LT2_0789_6pb_3U	F-TTGGTCGCGGAACTATAACTG R-CTTCGTCTGATTGCCACTCC	174 180 162	STY0765	0.244 ^a
19	Sal10 (12)	CT18_2016_12 bp_2U Ty2_1009_12 bp_2U LT2_2053_12pb_3U	F-AAGCGACGTTCTTCTGCAAC R-TGGAATATGATGGCATGACG	196 196 208	<i>yedD</i>	0.024 ^a
20	Sal15 (12)	CT18_2917_12bp_2U ^f Ty2_2903_12bp_2U ^f LT2_3067_12bp_3U	F-GTGACCGGTTGAGTTTGCAT R-GGCAGGTTGTACCAGTTTCGT	189 189 201	<i>nlpD</i>	0.418(0.344-0.493) ^b

21	Sal20 (12)	CT18_3643_3bp_16U Ty2_3629_3bp_17U LT2_4301_3bp_10U	F- CAGCCGACACAACCTTAACGA R- ACTGTACCGTGC GCGTTT	193 196 175	<i>ftsN</i>	0.864 ^a
22	Sal 23 (12)	CT18_4738_12bp_3.3U Ty2_4721_12bp_3.3U LT2_4774_12bp_3U	F-CCCGCACACTAAGGAGAGAC R-ACCGCGTTAGTGGCTAACAT	262 262 250	STM4518	0.496(0.471-0.522) ^b
23	819457L- 819457R (53)	LT2_819457_155bp_3.6U	F-ATCCAAGGGGTCGTTAGCTC R-ACGTAGCCCCGTATCTGATG	716	<i>LysZ</i>	0.469(0.388-0.549) ^b
24	2531837L- 2531837R [25] SE-4 [18]	LT2_2531837_117bp_2.7U LK5_2530891_117bp_2.7U ^e and PT4_2530891_117bp_2.7U ^e and ^d	F-CCCTATAATGCGACTCCACA R-GAACCTGCGACCAATTGATTA F-ACTTTAGAAAATGCGTTGAC R-AAGTCAACTGCTCTACCAAC	400 Not indicated	<i>valU</i> <i>valU</i>	Na 0.05 ^a
25	2628542L- 2628542R (53)	LT2_2628542_36bp_4U	F-GCCATCGGCATTACGATACT R-GAGGTTAACGCCGGTCTGTA	363	<i>shdA</i> , STM2513	0.529(0.401-0.658) ^b
26	4596419L- 4596419R (53)	LT2_4596419_232bp_2.3U ^e	F-TGTTGTGGCACCGTGCTAT R-CGCCCTGGGATAAGTCTGT	892	STM4351	Na
27	4810628L- 4810628R (53)	LT2_4810628_118bp_2.8U	F-TTGGAATGATGAACTGGAA R-GCAAAGCGTCTTATCCAACC	521	STM4552+ Leu+LeuQ	Na
28	SE-1(29) SENTR4 (54)	LK5_2504795_7bp_4.9U and PT4_2504795_7bp_4.9U ^d PT4_2504795_7pb_4.9U and 07-2642_2504795_7pb_4.9U ^d	F-AGACGTGGCAAGGAACAGTAG R-CCAGCCATCCATACCAAGAC F-GACCAACACTCTATGAACCAATG R-ACCAGGCAACTATTCGCTATC	Not indicated 120(120)	None identified Putative bacteriophage tail proteine, STY631a homologue	0.62 ^a 0.63 ^a
29	SE-2(29) SENTR6 (54)	LK5_4617691_7bp_4.7U and PT4_4617691_7bp_5.7U ^d PT4_4617691_7bp_5.1U and 07-2642_4617691_7bp_5.1U ^d and ^f	F-CTTCGGATTATACCTGGATTG R-TGGACGGAGGCGATAG F-ATGGACGGAGGCGATAGAC R-AGCTTCACAATTTGCGTATTCTG	Not indicated 180(177)	None identified Non-coding	0.73 ^a 0.64 ^a
30	SE-3(29)	LK5_2048155_12bp_4U and PT4_2048155_12bp_3U ^d	F-CAACAAAACAACAGCAGCAT R-GGGAAACGGTAATCAGAAAGT	Not indicated	Non identified	0.54 ^a
31	SE-7(29)	LK5_2961372_61bp_8.5U and PT4_2961372_61bp_8.5U ^d	F-GATAATGCTGCCGTTGGTAA R-ACTGCGTTTGGTTTCTTTTCT	Not indicated	<i>ygbF</i>	0.60 ^a
32	SE-8 (29)	LK5_2812703_87bp_1U ^f and PT4_2812703_87bp_1U ^d and ^f	F-TTGCCGCATAGCAGCAGAAGT R-GCCTGAACACGCTTTTAAATAGGCT	Not indicated	None identified	0.45 ^a
33	SE-9 (29) SENTR7 [19]	LK5_533269_9bp_2.1U and PT4_533269_9bp_3.1U ^d PT4_533269_9bp_3.1U and 07-2642_533269_9bp_3.1U ^d	F-CGTAGCCAATCAGATTCATCCCGCG R-TTTGAAACGGGGTGTGGCGCTG F-ACGATCACCACGGTCACTTC R-CGGATAACAACAGGACGCTTC	Not indicated 135(133)	<i>ushA</i> <i>ushA</i>	0.53 ^a 0.51 ^a
34	SENTR3 (54)	PT4_1697206_93bp_4.4U and 07-2642_1697206_93bp_4.4U ^d	F-CTAAACAAGCCGCTCATCCG R-ACAACCTGCTGCTGTGCTG	494(480)	STM1457 homologue	0.07 ^a
35	NEWPORT-A	SL254_345443_9bp_10.2U ^d	F-ACTGAAAGGAAGGGGAGAGC	429	Hypothetic protein	Na

36	(30) NEWPORT-L	SL254_2530997_51bp_3.1U ^d	R-GTCAGGGTGGGAATAGAATGC F-GAAGTACCGAAGTGGGTGAT	529	<i>XapR</i>	Na
37	(30) NEWPORT-B	SL254_373255_12bp_2.1 ^d	R-CGTCCGTTAGAGGAACGTAT F-GGCCGATATAGCTCAGTTGG	350	<i>tSX</i>	Na
38	(30) NEWPORT-M	SL254_2629198_36bp_2.1U ^d	R-GAACCTCGCTTAGGGTTGTG F- GGTCATAGAGGGTCTGCAT	378	<i>RatB</i>	Na
39	(30) TR4500 (55)	CT18_4500182_6bp_5U ^{d and f}	R-ATGGAGCACAGACCACTAAC F-CGTTGCTGCTCCGAAAT	294-366	STY4635	0.691 ^a
40	TR4699 (55)	CT18_4699223_6bp_23U ^d	R-GCGGTGAAGTGGAAGAAAG F-TATTCTACTTCAGTCCCCC R-AACCTCCCTGTATCTACCAA	163-307	<i>sefC</i>	0.947 ^a

^a DI décrits dans des rapport publiés

^b DI et CI 95% calculés à partir de la page web www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl, quand les alleles sont disponibles

^c Séquence partielle

^d position de TR dans le génome obtenu par le programme TRF

^e Amorces sans position dans les souches de référence

^f Pas de TR trouvé en utilisant les amorces décrites dans la bibliographie et en utilisant le programme TRF

Na : données sur les allèles non trouvées

DI: « Diversity index » ou Indice de diversité

95% CI : Intervalle de confiance à 95 %

MATERIELS ET METHODES

A- MATERIELS

1- Souches de salmonelles

Le total d'échantillons à analyser comporte 206 souches de *S. enterica* isolées chez l'homme, chez l'animal et dans des plats cuisinés. Ces souches proviennent toutes de Phnom Penh, au Cambodge, et sont indépendantes les unes des autres (ANNEXE 1).

La souche de *Salmonella* Typhimurium LT2 de référence (GenBank no.AE006468) provient de la Collection de l'Institut Pasteur (CIP 60.62, ATCC 43971).

1-1. *S. enterica* provenant d'échantillons biologiques humains (n=45)

Les échantillons de salmonelles ne proviennent d'aucun épisode d'intoxication alimentaire collective.

Les salmonelles isolées d'échantillons biologiques humains viennent de deux laboratoires :

- 19 isolats prélevés entre 2004 et 2007, proviennent du Laboratoire de Microbiologie Médicale de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC).
- En 2005, 26 isolats de *S. enterica* ont été obtenus du laboratoire de l'Hôpital National Pédiatrique.

Cette collection de 45 isolats d'origine humaine (appelées H) a été retenue pour l'analyse.

1-2. *S. enterica* provenant d'échantillons biologiques alimentaires crus (n=133)

Les échantillons biologiques alimentaires crus sont de deux sortes, d'une part ceux comportant les souches de *S. enterica* provenant d'échantillons prélevés sur des animaux d'abattoir (porc ou bœuf) ou de marchés (poulets), tous les échantillons ayant été isolés à Phnom Penh. Durant la période 2003-2004, parmi les 82 isolats de *S. enterica* provenant de viande crue (porc et bœuf) des abattoirs municipaux, 27 isolats ont été sélectionnés en considérant ceux dont les sérotypes étaient les plus représentés.

En 2006-2007, 228 isolats de salmonelles provenant de volaille crue et prélevés sur 10 marchés de la ville de Phnom Penh, ont été sélectionnés et 106 isolats dont les sérotypes étaient aussi les plus représentés ont été sélectionnés.

Ainsi une population de 133 isolats (appelées A), a été sélectionnée.

1-3. *S. enterica* provenant d'échantillons alimentaires cuits (n=28)

Les échantillons alimentaires cuits ont été isolés de plats cuisinés à l'avance (plats à base de pâtes, fruits, légume et viandes cuites) par le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Institut Pasteur du Cambodge. En raison du faible nombre d'isolats de *S. enterica* de la collection de ce laboratoire, chaque souche isolée de 2001- 2007, a été retenue. Ainsi, 28 isolats ont été inclus dans l'analyse (appelées F).

2- Choix des marqueurs pour l'étude

L'étude bibliographique des résultats obtenus sur l'utilisation de marqueurs pour un ensemble de souches a conduit à choisir douze marqueurs VNTRs pour tester les isolats sélectionnés au Cambodge (Tableau 5). Ces marqueurs déjà décrits (58) ont été caractérisés par leur capacité de typage élevée, un pouvoir de discrimination et une reproductibilité connus. Après amplification, l'identification des fragments a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose. A partir de la taille des fragments obtenus, le nombre théorique de copies de TR a été déduit en comparant la taille et le nombre de copies de TR déterminés pour un VNTR donné, à partir de la séquence du génome de *Salmonella* Typhimurium LT2 disponible au site <http://minisatellites.u-psud.fr>, en utilisant le programme BLAST. Pour des raisons de commodité, et pour respecter les standards d'utilisation (3), le nombre de copies répétées en tandem des séquences des loci VNTR de LT2 a été arrondi. A la fin d'une séquence, les copies de TR égales ou supérieures à 0,5 unité de répétition ont été considérées comme similaire à une copie de plus et une copie inférieure à 0,5 unité de TR a été notée comme dépourvue de TR (0 copie). De même, une amplification sans TR ou aucune amplification a été notée comme dépourvue de TR (0 copie) (3, 59), ce qui correspond toutefois à une perte d'information.

Le tableau 5 donne la liste et la spécificité des 12 marqueurs choisis.

Tableau 5: VNTR sélectionnés à partir du génome de la souche de référence *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (GenBank accession no. AE006468)

Nom du VNTR	Amorces sens et antisens	fragment (pb) _ nombre de copie _ TR	Gène associé	Position dans LT2	Fonction
Sal 06	L-TGGTCGCGGAACATAACTG R-CTTCGTCTGATTGCCACTCC	162_3U_6pb	STM 0724	789137-789298	Glycosyltransferase putative, biogenèse de membrane cellulaire
Sal 10	L-AAGCGACGTTCTTCTGCAAC R-TGGAATATGATGGCATGACG	208_3U_12pb	<i>amyA</i>	2053093-2053300	α -amylase, protéine cytoplasmique
Sal 15	L-GTGACCGGTTGAGTTTGCAT R-GGCAGGTTGTACCAGTTCGT	201_3U_12pb	<i>nlpD</i>	3067414-3067614	Lipoprotéine
Sal 20	L- CAGCCGACACAACCTTAACGA R-ACTGTACCGTGCGCGTTT	175_10U_3pb	<i>ftsN</i>	4301685-4301511	Semblable à la protéine de division cellulaire essentielle chez E. coli
Sal 23	L-CCCGCACACTAAGGAGAGAC R-ACCGCGTTAGTGGCTAACAT	250_4U_12pb	STM4518	4774034-4774283	Protéine putative innée membranaire
STTR3	L- CCCCCTAAGCCCGATAATGG R-TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	490_14U_33pb	<i>bigA</i>	3629458-3629947	Protéine de virulence exposée en surface, putative
STTR 4	L- GCGCGCCGCTATGGGTGGTGA R-CAAAAGCGGTAGCGATGAGC	1138_6U_189pb Et 1831_6U_189pb	<i>shdA</i>	2630499-2631636 et 2629806-2631636	Facteur de colonisation et de destruction putatifs de la plaque de Peyer
STTR5 (Sal16)	L- ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT R-GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	259_15U_6pb	<i>yohM</i>	3184503-3184761	Protéine putative innée membranaire
STTR 7	L-CGCGCAGCCGTTCTCACT R-TGTTCCAGCGCAAAGGTATCTA	594_9U_39pb	<i>ftsK</i>	1039431-1040024	Protéine putative de division cellulaire
STTR 8	L-TTATGTCACCACGGCTGTCAAT R-AAGGCCAAATAGGGGTTTCATAAGG	925_6U_116pb	Intergénique	3414008-3414932	Non codant
TR1 (Sal11)	L-AGAACCAGCAATGCGCCAACGA R-CAAGAAGTGCGCATACTACACC	191_2U_7pb	<i>yedD</i>	2053579-2053769	Lipoprotéine membranaire externe putative
TR5 (Sal22)	L-TGAAAACCGGCTCGTAGCAGTG R-CATACGGTTACTGCGGGATTGG	173_3U_7pb	Intergénique	4645085-4645257	Non codant

B- METHODES

2-1. Sérotypage

C'est une méthode indispensable, devenue un outil majeur pour la caractérisation des salmonelles. En effet, la technique a été particulièrement bien étudiée et approfondie pour les *Salmonella* et un schéma de sérotypage a été défini par Kauffmann et White, puis revu par Le Minor (60, 61). Ce schéma tient compte de la structure antigénique des *Salmonella* : il repose principalement sur la présence et la mise en évidence de facteurs antigéniques reliés aux antigènes somatiques « O » de type polysaccharidique, et flagellaires « H » constitués de polymères de flagelline, et possédant le plus souvent deux spécificités antigéniques. Le schéma de Kauffmann-White permet une classification des sérotypes selon leurs formules antigéniques. La classification se fait par groupe antigénique « O » : groupe O2, O4, O9 et au sein de chacun d'entre eux, selon les antigènes flagellaires de phase 1 et 2. Quatre vingt sept facteurs antigéniques « O » et 96 facteurs antigéniques « H » ont été répertoriés, mais seuls ceux ayant une importance pour le diagnostic sont notés dans le schéma de Kauffmann-White (20). Depuis 1996, des noms, basés sur l'origine géographique de la première souche isolée, sont donnés uniquement aux sérotypes de la sous-espèce *enterica* et, lorsque la formule antigénique de la souche est incomplète, un nom de sérotype ne peut être attribué (61).

2-2. Sensibilité aux antibiotiques

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé et la lecture par le système OSIRIS (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), les CMI ($\mu\text{g/ml}$) et les diamètres de zone d'inhibition (mm) ont été répertoriés (62). La souche de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium LT2 de référence (GenBank no.AE006468) a été achetée à la Collection de l'Institut Pasteur (CIP 60.62, ATCC 4397).

2-3. Préparation d'ADN et amplification par PCR

Les ADN de toutes les souches et de *Salmonella* Typhimurium LT2 ont été extraits par la méthode au phénol-chloroforme et à l'alcool (63). La concentration en ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nano Drop Technologies, DE 19810, USA).

Les amplifications ont été réalisées dans 20 μL de mélange contenant 2 μL d'ADN, 0,1 μL de Taq ADN polymérase (Promega, Madison WI, USA), 0,6 μL d'amorces sens et antisens (Eurogentec SA, Seraing, Belgique), 3,2 μL désoxynucléosides triphosphates (Promega, Madison WI, USA) et 4 μL de tampon. Une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min a été suivie par 35 cycles d'un protocole de trois étapes (94°C pendant 30 s, 58°C pendant 30 s et 72 °C pendant 1

min) et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 7 min. Les produits de PCR (5 µl) ont été déposés sur gel d'agarose à 2% contenant 0,1% de bromure d'éthidium. La taille des allèles a été déterminée par comparaison à la taille de marqueurs de poids moléculaire standard (marqueurs EZ Load™ moléculaire à 20pb, à 100pb et à 1000pb, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). L'ADN de référence extrait de la souche *Salmonella* Typhimurium LT2 a été déposée simultanément.

2-4. Analyses statistiques

Pour faciliter l'appellation et l'analyse, les marqueurs Sal06, Sal10, Sal15, Sal20, Sal23, STTR3, STTR4, STTR5, STTR6, STTR7, STTR8, TR1 et TR5 sont libellés et connus sous le nom respectif de M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6, M_7, M_8, M_9, M_10, M_11 et M_12 dans un fichier Excel et en BioNuméric (version 3.5; Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgique). Pour chaque échantillon, les fragments obtenus par PCR ont été répertoriés dans un tableau Excel (Microsoft world), les tailles des allèles en paires de bases (pb) sont converties en nombre de copies de TR, multipliés par le nombre arabe 10 pour éviter la virgule après le premier chiffre, puis importées dans le logiciel BioNuméric. Les échantillons ont été ensuite analysés et les résultats présentés sous forme d'arbre phylogénétique avec racine en utilisant le coefficient catégoriel, le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA), et sous forme d'arbre minimum couvrant sans racine (MST). Pour conduire ces analyses, la création de génotypes hypothétiques a été réalisée. Lorsque plusieurs souches de même sérotype présentent le même génotype, les souches sont groupées sous forme de cercles dont la taille est proportionnelle au nombre de souches.

2-5. Evaluation de la diversité génétique

La diversité génétique a été évaluée par l'indice de Hunter et Gaston, dérivé de l'indice de Simpson. Cet indice est calculé en utilisant le page web suivant <http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>. Les indices de diversité polymorphique totaux de 206 isolats et chacune des origines des isolats (humaine, aliments crus et aliment cuit) [ou indice de diversité de Nei ou index de Hunter - Gaston (HGDI)] sans intervalle de confiance à 95%, sont définis par le logiciel BioNumerics sous le terme d'indice de Simpson, pour déterminer l'effet discriminant des marqueurs. Un marqueur est très discriminant quand il présente un indice de diversité (DI) proche de 1 (3). L'indice de diversité polymorphique et l'intervalle de confiance à 95% de chaque marqueur sont calculés en utilisant la page web cité dessus. Deux valeurs de diversité évaluées par le HGDI sont considérées comme significativement différentes si leurs intervalles de confiance à 95% ne se chevauchent pas.

RESULTATS

Chapitre 1-Resultats : Caractéristiques générales de la population étudiée

1- Diversité antigénique (sérotypes)

Les 19 souches de salmonelles isolées d'échantillons biologiques humains entre 2004 et 2007 et provenant du Laboratoire de microbiologie médicale de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC), sont réparties en quatre sérotypes dont cinq *Salmonella* Typhi, cinq *Salmonella* Choleraesuis, huit *Salmonella* Derby, et un *Salmonella* Typhimurium. Parmi les *S. enterica* obtenues en 2005 du laboratoire de l'Hôpital National Pédiatrique, 24 isolats sont de sérotype *Salmonella* Typhi et deux souches sont de sérotype *Salmonella* Stanley.

Cette collection comporte donc 45 souches d'origine humaine (appelées H). Il est à noter que *Salmonella* Typhi est un sérotype isolé exclusivement chez l'homme.

En 2006-2007, 228 souches de salmonelles isolées de volaille crue provenant de 10 marchés de la ville de Phnom Penh, ont été isolées et 106 souches dont les sérotypes étaient aussi les plus représentés ont été sélectionnées.

Ainsi une population de 133 souches de salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires (appelées A), provenant d'abattoirs (porc ou bœuf) ou de marchés (poulets) a été sélectionnée. Les sérotypes les plus représentés sont *Salmonella* Anatum (n = 14), *Salmonella* Derby (n = 13), *Salmonella* Enteritidis (n = 11), *Salmonella* Schwarzengrund (n = 9), *Salmonella* Typhimurium (n = 9), *Salmonella* Corvallis (n = 8) et d'autres sérotypes (n = 69).

28 souches de *S. enterica* provenant d'échantillons alimentaires cuits (n=28) (appelées F) ont été isolées de 2001 à 2007 à partir de plats cuisinés à l'avance (plats à base de pâtes, fruits, légumes et viandes cuites) et proviennent du laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Institut Pasteur du Cambodge. Ces échantillons comprennent les sérotypes suivants: *Salmonella* Weltevreden (n = 4), *Salmonella* Derby (n = 3), *Salmonella* Lexington (n = 3), *Salmonella* Newport (n = 3), *Salmonella* Hvitittingfos (n = 3) et d'autres sérotypes (n = 12).

Le tableau 6 présente la liste des sérotypes, leur formule antigénique selon le schéma de Kauffmann-White (18), ainsi que la répartition du nombre de souches et leur nom par ordre alphabétique de 206 souches sélectionnées pour l'analyse. Parmi toutes les souches recueillies, 31 sérotypes ont été identifiés.

Tableau 6 : Répartition par ordre alphabétique des 206 souches de *Salmonella enterica* selon les sérotypes.

Serotype	Formule antigénique	Nombre d'isolats
Albany	8, <u>20</u> : z4, z24 : -	5
Anatum	3, 10 : e, h : 1, 6	16
Bovismorbifican	6, 8, <u>20</u> : r[i] : 1,5	3
Braenderup	6, 7, <u>14</u> : e, h : e, n, z	7
Choleraesuis	6,7 : c : 1, 5	6
Corvallis	8, <u>20</u> : z4, z23 :-	9
Derby	1, 4, 12 : fg :-	24
Enteritidis	1, 9,12 : g, m :-	11
Give	3,10 : [15] [15, 34]: [d], l, v:1, 7	1
Hvittingfos	16 : b : e, n, x	8
Indiana	<u>1</u> , 4, 12 : z : 1,7	3
Itami	9, 12 : l, z13 :1, 5	6
Kentucky	8, <u>20</u> : i : z6	2
Lexington	3,10 : [15][15, 34]: z10:1,5	6
London	3, 10[15]: l, v:1,6	4
Mbandaka	6, 7, 14 : z10: e, n, z15	1
Newport	6,8, <u>20</u> : eh : 1,2	8
Ohio	6, 7, 14 : b : l, w	4
ParatyphiB	4, 5 : b : 1, 2	2
Poona	1, 3, 22 : z : 1, 6	1
Rissen	6, 7, <u>14</u> : f, g : -	3
Sandiego	4, [5], 12 : eh : e, n, z15	1
Schleissheim	4, 5, 12 : b : -	6
Schwarzengrund	4, 5 : d : 1, 7	9
Stanley	4, 5 : d : 1, 2	6
Typhi	9, 12 [Vi], d : -	29
Typhimurium	1, 4, 5,12 : i : 1,2	10
Virchow	6,7, <u>14</u> : r : 1, 2	3
Wansworth	39 : b : 1, 2	1
Weltevreden	3, 10[15] : r : z6	9
Monophase 4, 5: gft	4,5 : fgt	1
Nombre total : 31 sérotypes		206

Les 133 souches d'échantillons biologiques crus sont issues de deux études : (1) une première étude effectuée en 2003-2004, par le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'IPC et le département de santé animale du Ministère de l'Agriculture, de la Forêt et de la Pêche ; ce sont des souches isolées de viande de bœuf/porc des étalages de marchés de la ville de Phnom Penh ; (2) une deuxième étude a permis de sélectionner des souches de salmonelles de poulet cru vendu dans 10 marchés de la ville de Phnom Penh au cours des années 2006-2007.

Les 45 souches d'origine humaine sont des isolats originaires de patients de la ville de Phnom Penh. 26 souches sont issues d'enfants de l'hôpital National Pédiatrique, en 2005 (hémocultures

et coprocultures) et 19 souches sont issus de patients adultes provenant du laboratoire de biologie médicale de l'IPC (hémocultures et coprocultures), en 2004-2007.

28 souches sont issues des aliments et de l'environnement dans le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'IPC entre 2001 et 2007. Le tableau 6 décrit les 206 souches en fonction de la date d'isolement, la répartition en sérotype selon les origines des isolats sélectionnés.

2- Antibiorésistance

La sensibilité des isolats aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (62). Les antibiotiques suivants ont été testés à la concentration indiquée (en pg / disque, sauf si spécifié) pour les isolats de *Salmonella*: amoxicilline, amoxicilline / acide clavulanique, ticarcilline, céfalotine, céfoxitine, céfotaxime, gentamicine, streptomycine, chloramphénicol, sulfamides, cotrimoxazole, acide nalixidique, ciprofloxacine et tétracycline. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des agents antimicrobiens contre les isolats et les points d'arrêt ont été déterminés par des critères du NCCLS et lus par le système de lecture Osiris (Biorad).

Parmi les 31 sérotypes, huit sérotypes isolés à la fois d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus, appelées F et A) et humains (appelée H) ont montré des souches résistantes à cinq antibiotiques mineurs, à savoir ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, sulfamide et tétracycline appelés résistance à ACSSuT. Ainsi on retrouve trois souches d'origine A résistantes à ACSSuT sur cinq isolats de *Salmonella* Albany, une souche d'origine A sur 15 isolats de *Salmonella* Anatum, cinq souches d'origine H sur six de *Salmonella* Choleraesuis, huit souches d'origine H et une souche d'origine A sur 24 isolats de *Salmonella* Derby, une souche d'origine A sur 11 isolats de *Salmonella* Enteritidis, trois *Salmonella* Indiana d'origine A, deux souches d'origine H sur 6 isolats de *Salmonella* Stanley, et une souche d'origine H et une souches d'origine A sur 10 isolats de *Salmonella* Typhimurium. Parmi 81 souches, 26 isolats le plus souvent d'origine A et H sont résistantes à ACSSuT.

Chapitre 2- Résultats : Diversité génotypique

1- Caractéristique des marqueurs utilisés

Marqueur STTR5: LT2_259pb_6pb_15U

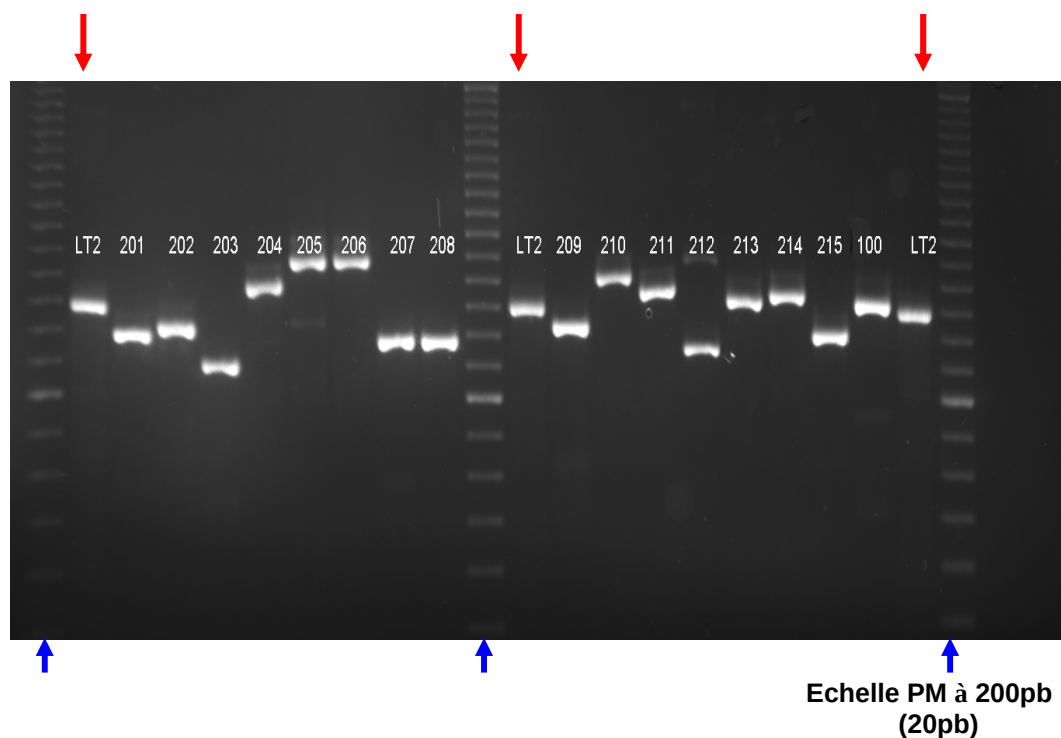


Figure 10 : Fragments de *S. enterica* obtenus en utilisant l'amplification par le marqueur STTR5. Echelle de PM à 200pb. La souche de référence LT2 produit des fragments à 259pb_6pb_15U attendus. Pour déterminer le nombre de TR pour les souches n° 201 et n° 202, les fragments sont comparés avec les fragments de la souche de référence LT2 et le marqueur de PM.

Les caractéristiques des marqueurs ont été étudiées en particulier par la répétabilité et la reproductibilité (figure 10), ainsi que le contrôle de la nature et du nombre de répétitions des fragments obtenus à l'aide des marqueurs par séquençage.

Douze marqueurs de VNTRs sélectionnés dans le génome de la souche de référence Typhimurium LT2, ont été testés sur une collection de 206 souches, pour la taille des fragments amplifiés obtenus par PCR, le nombre de tandem répétés (TR) contenus dans les fragments, le profil de dispersion d'allèles et le polymorphisme. Un marqueur est reproductible quand un allèle (fragment d'amplification) est toujours obtenu pour la même souche (tableau 4). L'absence

de fragment peut être due à l'absence du marqueur (locus VNTR) dans la souche, vérifié par comparaison avec une souche de référence, ou à un défaut d'amplification.

Les résultats obtenus pour chaque marqueur sont les suivants :

- Le marqueur Sal06 présente des absences d'allèle pour les sérotypes Albany, Braenderup, Choleraesuis, Corvallis, Hvittingfos, Kentucky, et Ohio. Et tous les sérotypes Typhi présentent un allèle à 174pb (5TR), les autres sérotypes présentant une bande à 162pb.
- Le marqueur Sal10 est peu polymorphique et présente trois allèles allant de 184pb à 208 pb.
- Le marqueur Sal15 produit des fragments sans motif répété, pour les sérotypes Choleraesuis et Typhi.
- Le marqueur Sal20, amplifie l'ensemble des souches de façon très polymorphique et la taille des allèles est de 175pb (10TR) à 217pb (24TR).
- Le marqueur Sal23 différencie les sérotypes Albany, Braenderup, Corvallis, London, Rissen et Stanley par rapport aux autres sérotypes et Typhi présente un fragment d'amplification de 262pb.
- Le marqueur STTR3 est très discriminant. Il présente une distribution allélique à 12 allèles variant de 160-754pb avec un motif de répétition de 33pb.
- Pour le marqueur STTR4, la taille du motif de répétition est importante (189pb), et la taille des fragments obtenus est supérieure à 1000pb, ce qui nécessite un marqueur de poids moléculaire, d'échelle supérieure à celle utilisée pour les autres marqueurs.
- Le marqueur STTR5, a permis l'amplification de toutes les souches. Il est très discriminant à l'intérieur de la collection de souches produisant 17 allèles de tailles comprises entre 205pb pour six TR jusqu'à 319pb pour 25TR.
- Le marqueur STTR7 avec des TR de 39pb, est assez polymorphique et disperse les souches en sept allèles différents de 360pb (deux TR) à 672pb (10TR).
- Le marqueur STTR8 avec des TR de 116pb est aussi très polymorphique. Il disperse les souches entre 229pb (un TR) et 1389pb (10 TR). Il produit des fragments sans TR pour Choleraesuis (cf <http://minisatellites.u-psud.fr>).
- Le marqueur TR1 ayant des TR à 7pb, est très peu polymorphique, et il dissocie les souches en deux allèles. Cependant, il différencie les souches de Typhi présentant des fragments d'amplification à 205pb (cinq TR), des autres sérotypes dont les fragments ont une taille de 191pb (3TR).
- Le marqueur TR5 présente les mêmes caractéristiques que TR1. Cependant, il différencie les souches de Typhi en un fragment d'amplification à 180pb (quatre TR) par rapport aux autres sérotypes à 173pb (trois TR).

Ainsi, après une première approche, un panel de 12 marqueurs de VNTRs est retenu pour l'étude du polymorphisme de dispersion d'allèles de 206 souches comprenant 31 sérotypes. Ce panel est constitué de marqueurs très discriminants pour certaines souches, peu discriminants pour d'autres, mais discriminants pour l'ensemble des souches. Toutefois une réserve de praticabilité de la technique pour STTR4 est émise.

2- Vérification des résultats MLVA par détermination de la séquence d'ADN de fragments amplifiés

Afin de valider l'existence de séquences répétées en tandem dans des bandes inattendues obtenues avec certains marqueurs après migration sur le gel, le séquençage des fragments d'amplification a été réalisé. Cinquante fragments amplifiés obtenus pour huit marqueurs ont été purifiés (Qiagen, Hilden, Allemagne) et séquencés (Eurofins MWG Operon, Rossey CDG, France). Une séquence consensus a été réalisée à partir des séquences obtenues avec les amorces sens et antisens. Les alignements des séquences consensus avec la séquence de la souche de référence pour chaque locus ont été effectués par le logiciel BioNumerics.

Afin de valider la présence de TR dans des fragments amplifiés, une analyse de séquences a été réalisée sur des fragments dont la taille est identique ou différente par rapport à l'ADN de la souche de référence LT2.

Cinquante fragments correspondant à 19 sérotypes, ont été amplifiés en utilisant les marqueurs suivants: Sal06, Sal15, Sal20, STTR3, STTR4, STTR5, STTR7 et STTR8 (ANNEXE 2). Cinq sérotypes avaient déjà été testés par la technique MLVA dans des études publiées (*Salmonella* Anatum, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Paratyphi B et *Salmonella* Typhimurium (14, 15, 31, 32) et 14 autres sérotypes n'avaient pas encore été analysés, ni séquencés dans les études utilisant la technique MLVA (*Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Itami, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* London, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Sandiego, *Salmonella* Schleissheim, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Wansworth et *Salmonella* Monophase 4, 5: gft).

- une des six souches de *Salmonella* Schleissheim et deux isolats de *Salmonella* Monophase 4, 5 : gft en utilisant le marqueur Sal20 ;
- deux des 11 isolats de *Salmonella* Enteritidis pour le marqueur STTR3;
- pour le marqueur STTR5, respectivement trois des six souches de *Salmonella* Schleissheim et deux isolats de *Salmonella* Paratyphi B ;
- pour le marqueur STTR7, deux *Salmonella* Monophases 4, 5 : gft et l'une des six souches de *Salmonella* Schleissheim ;

- pour le marqueur STTR8, 14 sérotypes ont été concernés : un isolat sur 16 de *Salmonella* Anatum, un sur 24 de *Salmonella* Derby, un sur 11 de *Salmonella* Enteritidis, un sur trois de *Salmonella* Indiana, deux sur six de *Salmonella* Itami, un sur trois de *Salmonella* London, un sur huit de *Salmonella* Newport, deux isolats de *Salmonella* Monophase 4, 5 : gft, un isolat de *Salmonella* Sandiego, deux sur six de *Salmonella* Stanley, trois sur six de *Salmonella* Schleissheim, un sur neuf de *Salmonella* Schwarzengrund, deux sur 10 de *Salmonella* Typhimurium et un sur trois de *Salmonella* Virchow.

La composition des loci de VNTR a été révélée comme suit : ce sont soit des fragments d'ADN composés de motifs répétés en tandem (TR) portant le nombre de motifs répétés attendus, soit des fragments composés de copies de motifs répétés associées avec des motifs répétés partiels, soit des fragments présentant des insertions (tel est le cas des isolats de *Salmonella* Sandiego et de *Salmonella* Typhimurium pour lesquels un fragment de 733pb a été inséré dans la 3ème copie de motifs répétés) (figure 11A), soit des fragments n'ayant aucun motif répété.

```

3414053
5' CGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCA[CCGGCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTG
AAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGTGTCGTGGACAGTCATTTCATCCTGT][CGCCCTGTAAAAGCA
AAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGGTTTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGC
GTCGTGGACAGTCATTTCATCCTG][CCGCCCTGTAAAAGCAATAAATATCCTCCGGCATAGCCGGAGGTTTTTCTGA
TGCGCCTGTAAAGGCTCTCTTACCAGCCGCGCCCTAACAGGCGCATACGATCTGACATTTGCATCAAACCTTCGTTACT
TACGGCCCGTAAACGGGCTGCCCGGATAAGGGATCGATAATTGCTCACCCATTTTATCCTCTTCAAGCTGGTGCTTT
ATGTAGTCCCTGTATCTTCGCCGTGTTCTTACCCACCGTATCGACATAGTACCCTCTGCACCAGAACTCTCTGTTCTT
GTATTTGAATTTTAGATCCCCAACTGCTCGTAAAGCATCAGACTACTTTTACCCTTCAGATATCCCATGAAGCTCG
ACACACTCATCTTCGGCGGGATCTCCAGAAGCATGTGAATATGATCTGCACAACATTCCGCTTCCAGGATTCGTACG
TTTTTCCATTCACACAATTTTCTTAATATGCTACCTACTGCCCTACGCTTCTCTCCATAGAACGCTTGTCTTCGGTA
TTTGGGCGCGAAAACATGTGATATTTACAGTTCCATCGGGTGTGCGCTAAGCTCTTTTCGTCCCCATTGGGACCC
CCTTTTGATTTCTTGTTGAACTTTTGCAGTTGCCAGACCGCAAGATGTTTTAACAAATCAAAAGGGTTTTAATAAC
TGGCTTAAAGCTGAAAGCTTTCCGGAACCCCGAGCTAGCTGGGGGTTTTCCATAGACAAAAAACCCGCCAGCTTAC
ACTGA[CGGGTTTTATGAAGAGATGATACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATT
CATCCTGC][CGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGC
TTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTTCATCCTGC]CGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTT
TTATGAAGAAGTGAAGCTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCTGGACAGTCATT 3'
3415328

```

Figure 11: Validation des marqueurs par séquençage des produits PCR.

Figure 11A: Séquence de l'isolat *Salmonella* Sandiego (SA_01_06A) obtenue en utilisant le marqueur STTR8. Les séquences entre guillemets sont des motifs TR. La séquence insérée est soulignée. La position du fragment a été obtenue par comparaison de la séquence avec celle de la souche de référence *Salmonella* Typhimurium LT2 en utilisant le programme Blast dans le site NCBI.

202	1	AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAA	ACCATC	ATCACG	ACCACG	ACCACG	GCC	-----	48	
LT2	3145657	AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAAACCATCATCACGACCACGACCACGGCCATGACCATGACC								
202	49	ATG	ACCATG	ACCATG	ACCATG	ACCATG	ACCATG	ACCATG	ATGGTCACA	108
LT2	3145717	ATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATCATGGTCACA								
202	109	TACATCCGGAAGGCGCAACGTCAAAAGCGTATCAGGATGCCCATGAACGCGCCCATGCTG							168	
LT2	3145777	TACATCCGGAAGGCGCAACGTCAAAAGCGTATCAGGATGCCCATGAACGCGCCCATGCTG								
202	169	CCGATATTCAACGCCGTTTTGATGGTCAAACAGTGACTAATGGACAGATCCT	220							
LT2	3145837	CCGATATTCAACGCCGTTTTGATGGTCAAACAGTGACTAATGGACAGATCCT	3145888							

202 (séquence consensus 202 L et 202 R)

AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAAACCATCATCACGACCACGACCACGGCCATGACCATGACCATGACCA
TGACCATGACCATGACCATGACCATGACCAATCATGGTCAACATACATCCGGAAGGCGCAACGTCAAAAG
CGTATCAGGATGCCCATGAACGCGCCCATGCTGCCGATATTCAACGCCGTTTTGATGGTCAAACAGTG
ACTAATGGACAGATCCTGCTAT

Figure 11B: Mise en évidence de nouvel allèle pour des souches de Paratyphi B. Séquence consensus de l'isolat 202 (SA_03_01B) de *Salmonella* Paratyphi B obtenue en utilisant le marqueur STTR5. La séquence est composée de 12,7 soit 13 TR. La comparaison de la séquence de cet isolat avec celle de la souche de référence, *Salmonella enterica* LT2 (259_15U_6bp) par le programme BLAST ncbi, révèle 13TR dans le génome de l'isolat 202 (SA_03_01B). La séquence principale de la répétition est: ACCACG. Les séquences soulignées sont les séquences flanquantes.

Une caractéristique particulière a été observée pour deux isolats de *Salmonella* Paratyphi B. Les produits amplifiés de ces isolats présentent respectivement 13 et 17 TR alors que le programme Blast dans <http://minisatellites.u-psud.fr> ne montre aucune similitude de séquence avec la souche de référence *Salmonella* Paratyphi SBP7 (figure 11B).

La règle de transformation en nombre de TR exige que les sérotypes ne présentant aucune amplification ou ayant été amplifiés mais ne présentant aucun motifs TR, sont considérés comme présentant "0" allèle, bien que les loci VNTR soient tout de même porteurs d'information (2, 54). Le séquençage des fragments amplifiés avec le marqueur STTR4 donne des résultats peu probables. En effet, l'amplification varie d'une souche à l'autre et le fragment amplifié par ce marqueur étant relativement grand, le séquençage donne des fragments variables de 866 à 960pb et il est nécessaire de synthétiser des amorces à l'intérieur des séquences répétées ce qui entraîne des amplifications non spécifiques. Sept sérotypes sont concernés : sur les quatre isolats de *Salmonella* Derby, deux présentaient une bande à 1043,5pb et deux à 1138pb, le séquençage de deux isolats a échoué ; un isolat sur six de *Salmonella* Schleissheim à 1138pb a échoué ; ainsi qu'un isolat sur six de *Salmonella* London à 1138pb. Un isolat de *Salmonella* Wansworth à 382pb contient 2TR. De plus, pour les sérotypes *Salmonella* Bovismorbifican, *Salmonella* Itami

et *Salmonella* Ohio, des fragments d'amplification dont la taille est bien supérieure à 1000pb (1831pb) ont été obtenus et le séquençage a été impossible à réaliser.

Pour ces diverses raisons, le marqueur STTR4 a été enlevé pour la suite de l'étude.

3- Evaluation de la population étudiée par mesure de l'indice de diversité de Hunter et Gaston selon l'origine des isolats

La variabilité allélique pour toutes les souches et toutes origines confondues a été évaluée pour les 11 marqueurs utilisant la technique MLVA. Les loci VNTR ont présenté une vaste gamme polymorphique allant de deux à 17 allèles (tableau 5). L'Indice global de diversité, $DI = 0,988$, est proche de 1, ce qui signifie un effet discriminatoire élevé des 11 marqueurs sur la population étudiée (Tableau 7.1).

L'Indice de diversité est élevé pour toutes les souches issues des trois sources : aliments ($DI = 0,989$), animaux ($DI = 0,985$) et hommes ($DI = 0,894$) (Tableau 7.2, Tableau 7.3, Tableau 7.4). Quatre parmi les 11 marqueurs testés dans cette étude (Sal20, STTR3, STTR5 et STTR8), sont très polymorphiques et discriminants pour toutes les souches (respectivement $DI: 0.807$, $DI: 0.828$, $DI: 0,882$ et $DI: 0.829$). Le locus STTR5 du gène *YohM* a des copies répétées courtes (6 pb) et montre la plus forte variation de la taille des allèles avec 17 allèles allant de 6-25 TR. Il a un pouvoir discriminant important pour toutes les souches ($DI = 0,882$) et quelle que soit l'origine de souches: animaux ($DI = 0,848$), aliments ($DI = 0,905$) et hommes ($DI = 0,855$). Les marqueurs Sal20, STTR3 et STTR8 sont peu discriminants pour les souches humaines ($DI < 0,8$). Le marqueur STTR3 est discriminant pour les souches alimentaires ($DI = 0,815$) et le marqueur STTR8 l'est pour les souches animales ($DI = 0,831$). Le marqueur Sal20 présente un Indice global discriminant ($DI = 0,807$), alors que le DI pour chaque origine était non discriminant ($DI < 0,80$). Sept autres marqueurs, Sal06, Sal10, Sal15, Sal23, STTR7, TR1 (Sal11) et TR5 (Sal22), sont très peu discriminants, quelle que soit l'origine des souches.

Tableau 7.1. Diversité génétique de 206 *Salmonella enterica* obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	Souche LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (Echelle de taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats totaux (n= 206)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	2	3, 5 (162 - 174)	0.491	0.421-0.561
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	3	1, 2, 3 (184 - 208)	0.128	0.068-0.188
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.367	0.304-0.429
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	12	10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24 (175 - 217)	0.807	0.771-0.843
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.520	0.501-0.539
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	12	4, 9, 10, 11.5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22 (160 - 754)	0.829	0.802-0.852
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	17	6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25 (205 - 319)	0.882	0.858-0.905
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	7	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (360 - 672)	0.739	0.709-0.768
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 (229 - 1389)	0.829	0.806-0.852
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	2	3, 5 (191 - 205)	0.243	0.175-0.311
TR5(Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	2	3, 4 (173 - 180)	0.243	0.175-0.311
Total				0.988	
Genotypes				107	

^a Indice de Diversité de Hunter- Gaston

Tableau 7.2. Diversité génétique de 45 *Salmonella enterica* d'origine humaine obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	Souche LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (Echelle de taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats humains (n= 45)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	2	3, 5 (162 - 174)	0.506	0.378-0.635
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	2	2, 3 (196- 208)	0.000	0.000-0.148
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.394	0.255-0.534
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	6	10, 15, 16, 17, 18, 19(175 - 202)	0.610	0.475-0.744
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.210	0.059-0.362
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	4	4, 9, 14, 15 (160 -523)	0.646	0.531-0.761
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	7	8, 10, 11, 13, 16, 17, 20 (217 - 289)	0.848	0.805-0.891
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	2	7, 8 (555-577)	0.460	0.371-0.549
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	5	1, 2, 3, 4, 5 (229 - 693)	0.530	0.383-0.676
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	2	3, 5 (191 - 205)	0.460	0.371-0.549
TR5(Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	2	3, 4 (173 - 180)	0.460	0.371-0.549
Total				0.894	
Genotypes				16	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Tableau 7.3. Diversité génétique de 133 *Salmonella enterica* d'origine animale obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	Souche LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (Echelle de taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats animaux (n= 133)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	3 (162)	0.255	0.163-0.346
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	2	2, 3 (196 - 208)	0.167	0.085-0.248
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.127	0.053-0.201
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	12	10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24 (175 - 217)	0.742	0.676-0.807
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.483	0.449-0.517
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	9	10, 11.5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 (358 - 622)	0.781	0.736-0.826
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	14	8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 25 (217 - 319)	0.849	0.809-0.888
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	7	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (360 - 672)	0.780	0.736-0.810
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 (229 - 1389)	0.831	0.806-0.856
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.053
TR5(Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.053
Total				0.985	
Genotypes				75	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Tableau 7.4. Diversité génétique de 28 *Salmonella enterica* d'origine alimentaire obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	Souche LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (Echelle de taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats alimentaires (n= 28)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	3 (162)	0.349	0.176-0.523
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.000	0.000-0.216
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.304	0.122-0.487
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	7	10, 12, 15, 17, 18, 19, 20 (175 - 205)	0.775	0.655-0.895
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.519	0.519-0.519
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	8	9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 22 (325 - 754)	0.815	0.727-0.903
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	9	8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 19, 20 (217 - 289)	0.931	0.895-0.967
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	4	7, 8, 9, 10 (555 - 672)	0.725	0.628-0.822
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	7	1, 2, 3, 5, 6, 9, 10 (229 - 1389)	0.783	0.663-0.903
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.216
TR5(Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.216
Total				0.989	
Genotypes				24	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Chapitre 3-Résultats : Epidémiologie moléculaire

L'épidémiologie moléculaire est la confrontation des données bactériologiques ou épidémiologiques (temps, lieu, population) aux données génotypiques. Cette étude comprend l'origine des souches, et renseigne sur l'évolution temporelle de la population bactérienne.

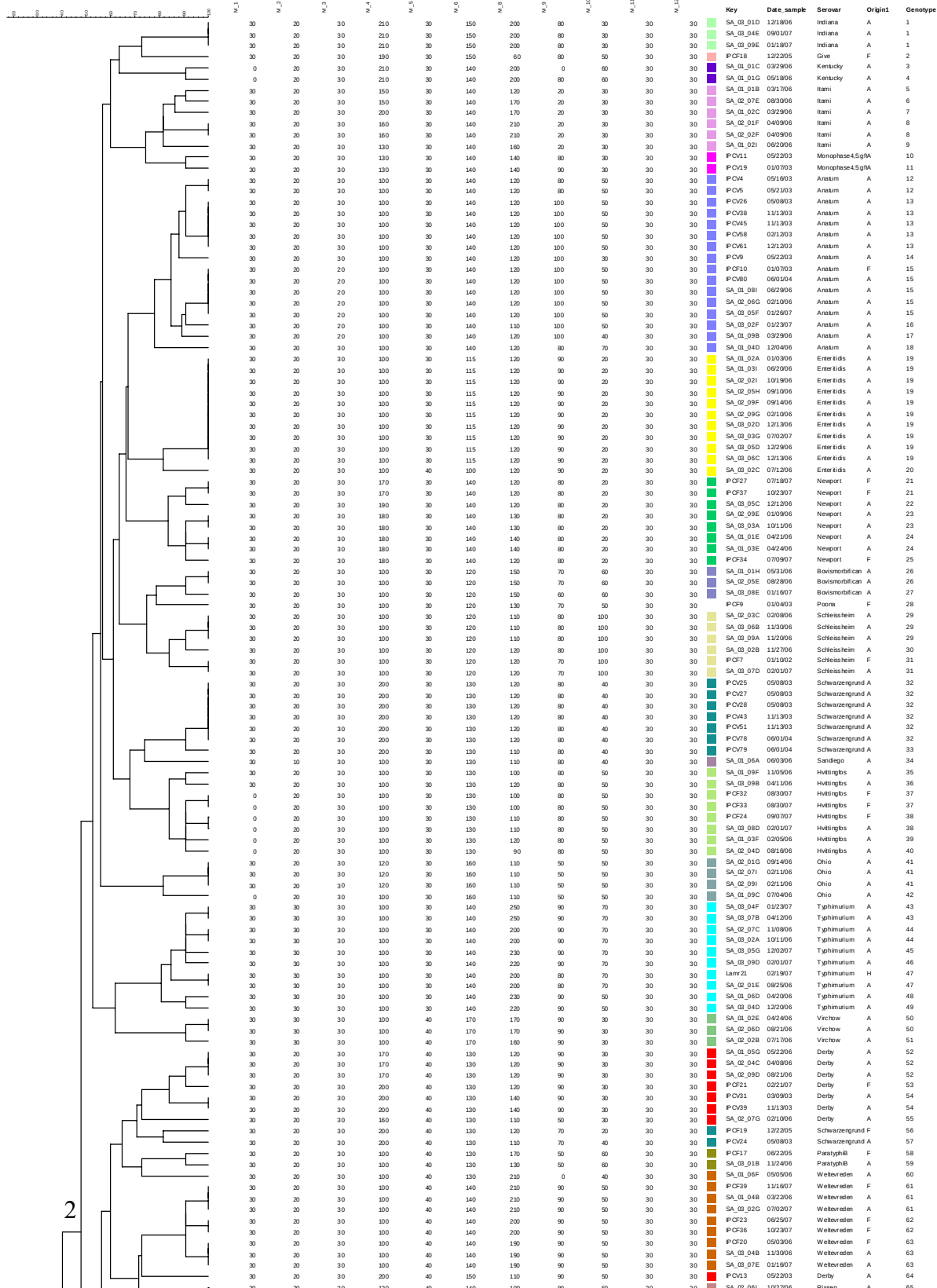
1. Diversité génotypique de salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=206)

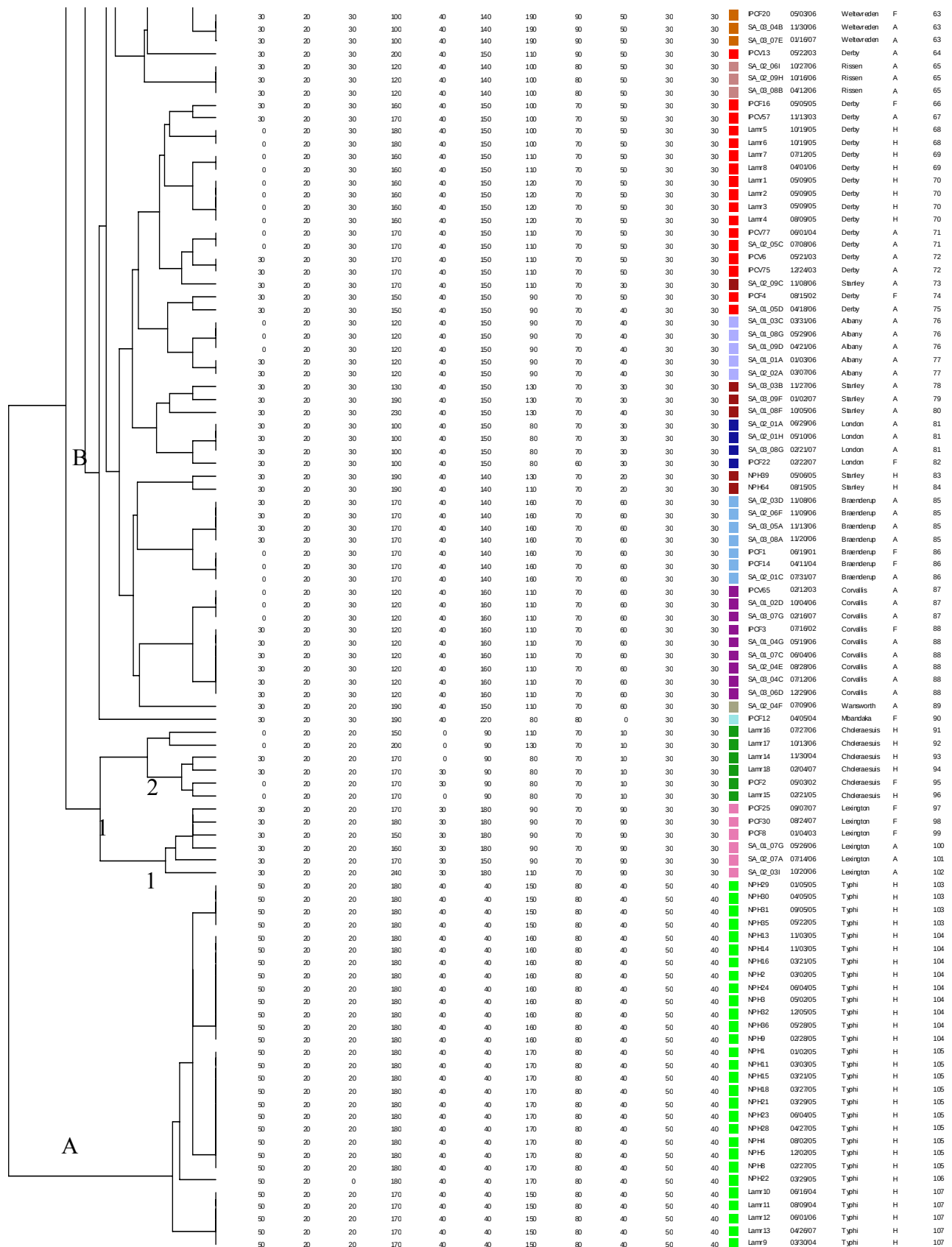
1-1. Dendrogramme

Les souches ont été distribuées en 75 génotypes pour 133 isolats d'animaux crus, 24 génotypes pour 28 isolats alimentaires cuits et 16 génotypes pour 45 isolats humains. Il existe une surreprésentation de la population animale (A) par rapport aux populations des deux autres origines (H et F).

La population de génotypes des souches alimentaires cuits est la plus diverse, avec près d'un génotype par isolat ; suivie par les isolats d'animaux, ayant un génotype pour deux isolats ; puis des isolats de souches humaines avec un génotype pour quatre isolats.

La méthode des coefficients catégoriels, et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme avec toutes les souches (Figure 1-1A) et un dendrogramme simplifié groupant les souches de même sérotype (Figure. 1-1B). Le complexe de clones génétiques de sérotype *Salmonella* Typhi exclusivement isolés à partir de l'homme, diverge très tôt. Le groupe principal B, comprenant 30 sérotypes de *S. enterica*, est réparti en deux principaux groupes, B1 et B2, indépendamment de l'origine des isolats. Le groupe B1 inclut *Salmonella* Choleraesuis et *Salmonella* Lexington. Le groupe B2 montre une plus grande complexité génétique, avec 28 sérotypes répartis en deux sous-groupes B2.1 et B2.2, plutôt équivalents dans leur distribution avec respectivement 11 et 17 sérotypes. Le sérotype Schwarzengrund comprend des clones dispersés dans les groupes B2.1 et B2.2. Dans le sous-groupe B2.1, à l'exception de la souche unique Mbandaka, deux populations inégales en nombre de génotypes peuvent être distinguées. Dans ce 1^{er} sous-groupe, *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Derby et *Salmonella* Stanley présentent plusieurs sous-clones. Le 2^{ème} sous-groupe B2.2 est plus hétérogène. Ces résultats montrent que le profil antigénique des isolats de *S. enterica* appartient à plusieurs lignées clonales et présentent des modèles évolutifs différents.





MLVA
Categorical coefficient

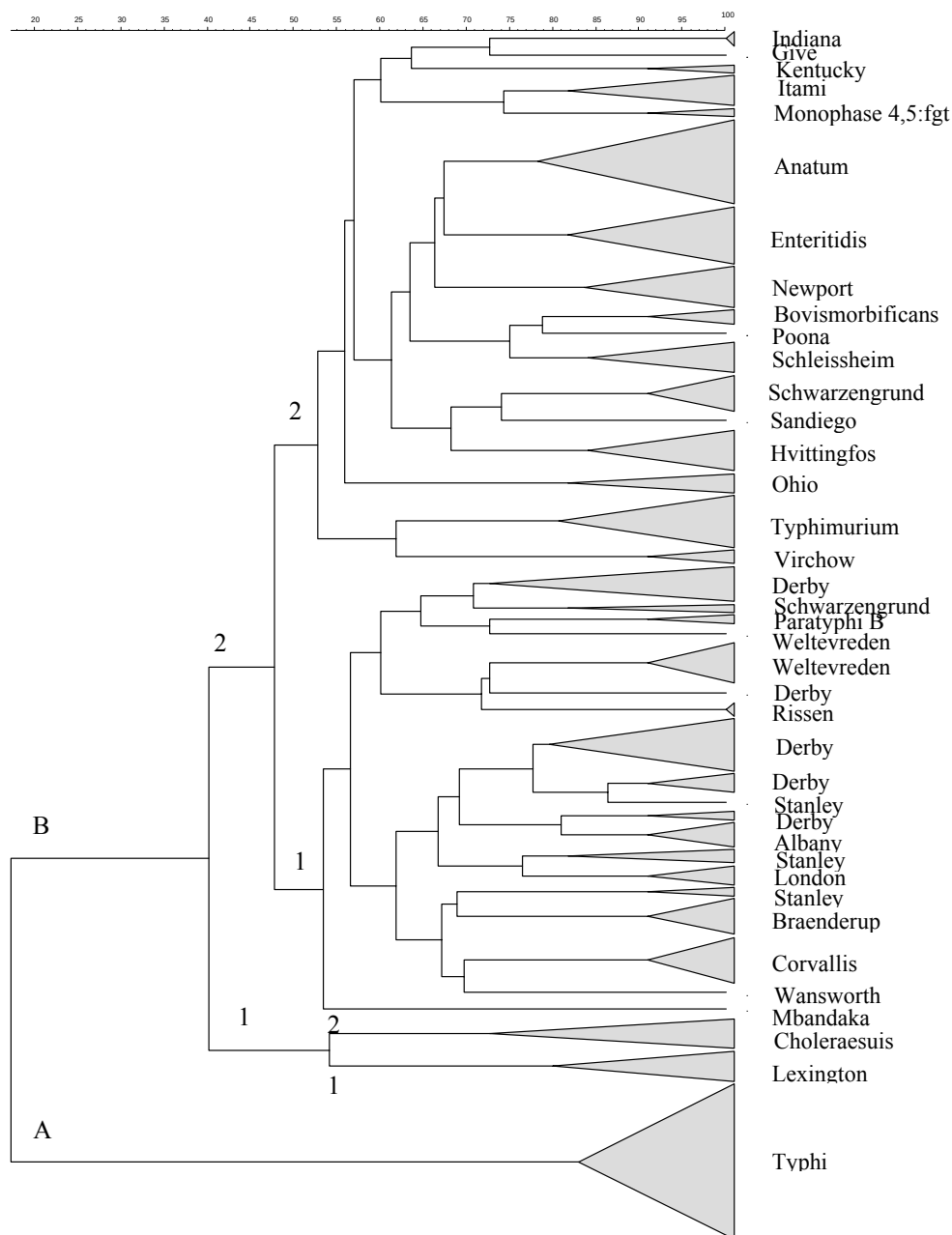


Figure 1-1B : Distribution phylogénique par MLVA de 31 sérotypes de *S. enterica* en utilisant le coefficient catégoriel et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA). Les souches de mêmes sérotypes ont été groupées.

1-2. Arbre minimum couvrant

A partir de la distribution de la composition allélique obtenue par une modélisation phylogénétique des souches, la construction d'un arbre minimum couvrant sans racine a été déduite (MST) (Figure 1-2).

L'étendue de la diversité génétique de la population composée par les 206 isolats a été définie par la répartition des souches en 107 génotypes, chaque génotype groupant des isolats de même sérotype ayant même nombre de copies d'allèle.

Dans cette étude, un groupe de salmonelles est défini comme un complexe clonal lorsque chaque isolat de ce groupe est relié à un autre isolat avec une différence d'un seul locus (Figure 1-1C). Dans d'autres cas, la définition d'un complexe clonal peut être moins stringente, notamment dans un objectif « macroépidémiologique » (dans ce cas, les variants à deux loci peuvent être inclus dans le complexe clonal).

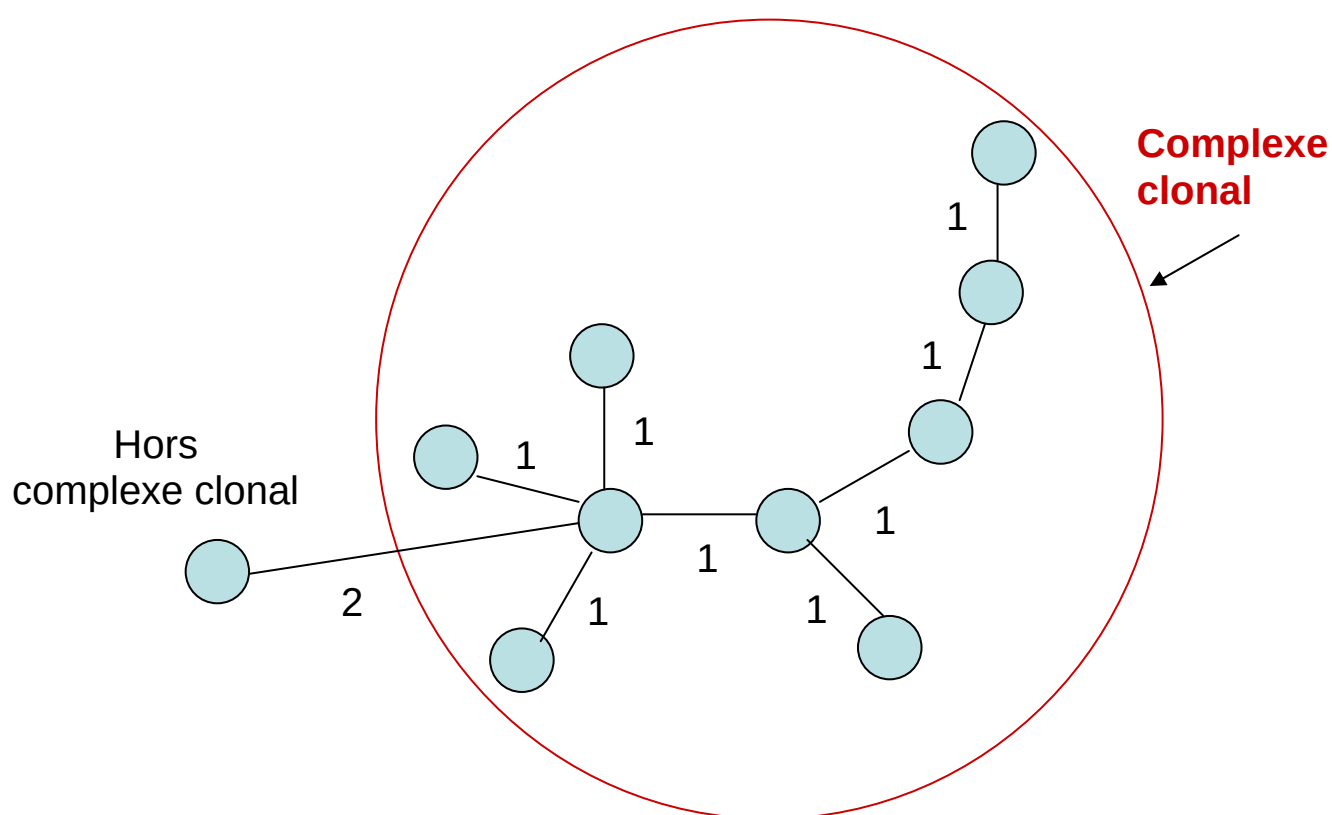


Figure 1-1C : Schéma d'un complexe clonal.

La distribution des génotypes est différente selon les sérotypes. Et la diversité à l'intérieur d'un complexe donné est variée. Il est à noter une bonne concordance entre génotypes et sérotypes. Cinq types de dispersion génétique sont observés pour les 31 sérotypes de *S. enterica* :

-Le premier type est constitué d'un seul génotype groupant plusieurs isolats. Cela est illustré par les *Salmonella* Indiana et *Salmonella* Rissen.

-Le deuxième type répond à la définition du complexe clonal défini précédemment. Il contient des génotypes différents appartenant au même sérotype et différents par un seul locus (SLVs). Il comprend les *Salmonella* Albany, *Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* London, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Paratyphi B, *Salmonella* Schleissheim, *Salmonella* Virchow, et *Salmonella* Monophase 4,5: gft.

-Le troisième type groupe des variants différents par deux loci (DLVs) comprenant les *Salmonella* Ohio et *Salmonella* Enteritidis.

-Le quatrième type de dispersion est composé de variants regroupant SLVs et DLVs pour huit autres sérotypes : *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Hvitittingfos, *Salmonella* Itami, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Typhimurium.

-Le cinquième comprend les *Salmonella* Derby, *Salmonella* Stanley, et *Salmonella* Weltevreden. Le sérotype Weltevreden présente un complexe clonal à SLV et possède un autre génotype différent par trois loci. Les *Salmonella* Derby et *Salmonella* Stanley présentent deux groupes génétiques distincts: un grand complexe clonal comprenant les génotypes de l'homme (68, 69, 70 pour *Salmonella* Derby, et 83, 84 pour *Salmonella* Stanley) et des animaux; un seul clone de *Salmonella* Stanley et de plusieurs clones de *Salmonella* Derby isolés des aliments cuits et des aliments crus.

Les souches de *Salmonella* Typhi exclusivement d'origine humaine ont été regroupées en un complexe monoclonal de cinq variants MLVA (génotypes 103 à 107) qui diffère de huit loci du génotype 25 de *Salmonella* Newport.

Cinq sérotypes (*Salmonella* GIVE, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Poona, *Salmonella* Sandiego, et *Salmonella* Wansworth) ont des isolats uniques inclus dans l'analyse. Le sérotype *Salmonella* GIVE isolé de l'animal (poulet) diverge du sérotype *Salmonella* Anatum (génotype 12 à partir de viande de porc/boeuf) par trois allèles ainsi que *Salmonella* Rissen (génotype 65 à partir de la volaille); le sérotype *Salmonella* Mbandaka isolé des aliments est différent du génotype de *Salmonella* Newport 22 (poulet) par quatre loci ; le sérotype *Salmonella* Poona isolé d'aliments diverge de *Salmonella* Schleissheim génotype 31 (poulet et aliments) par deux loci, et le génotype de *Salmonella* Bovismorbificans 26 (isolé de poulet) diverge de ce génotype de *Salmonella* Schleissheim par deux loci ; *Salmonella* Sandiego génotype 34 (origine poulet) se distingue du génotype de *Salmonella* Schwarzengrund 33 (porc/bœuf) par deux loci.

La divergence génétique entre les sérotypes de *S. enterica* inclus dans l'analyse est très importante et les sérotypes sont différents les uns des autres de deux à huit loci VNTR. Il n'existe pas de type MLVA génétique où deux sérotypes différents présentent un profil génétique identique. Entre les sérotypes, les génotypes MLVA varient de un ou deux loci et rarement plus de trois. Toutefois, des sous-clones de *Salmonella* Derby, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Stanley et *Salmonella* Weltevreden présentent un nombre de loci différents compris entre un et sept. Ces résultats sont concordants avec la représentation des génotypes sous forme de dendrogramme.

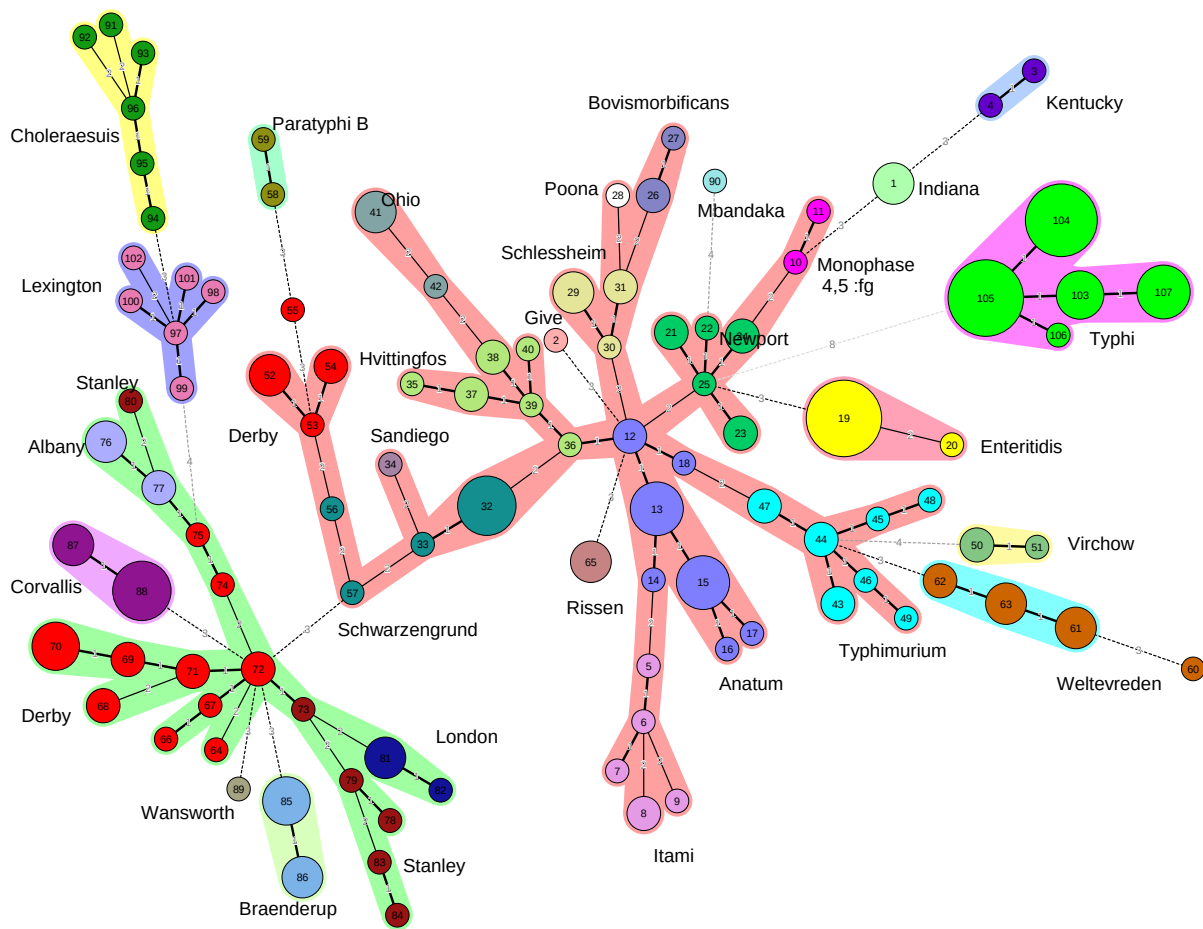


Figure 1-2A. Genotypage en fonction des sérotypes. Arbre Minimum couvrant des 206 salmonelles étudiées. Chaque cercle représente un type de MLVA ou génotype. Chaque sérotype est ombré avec une couleur différente.

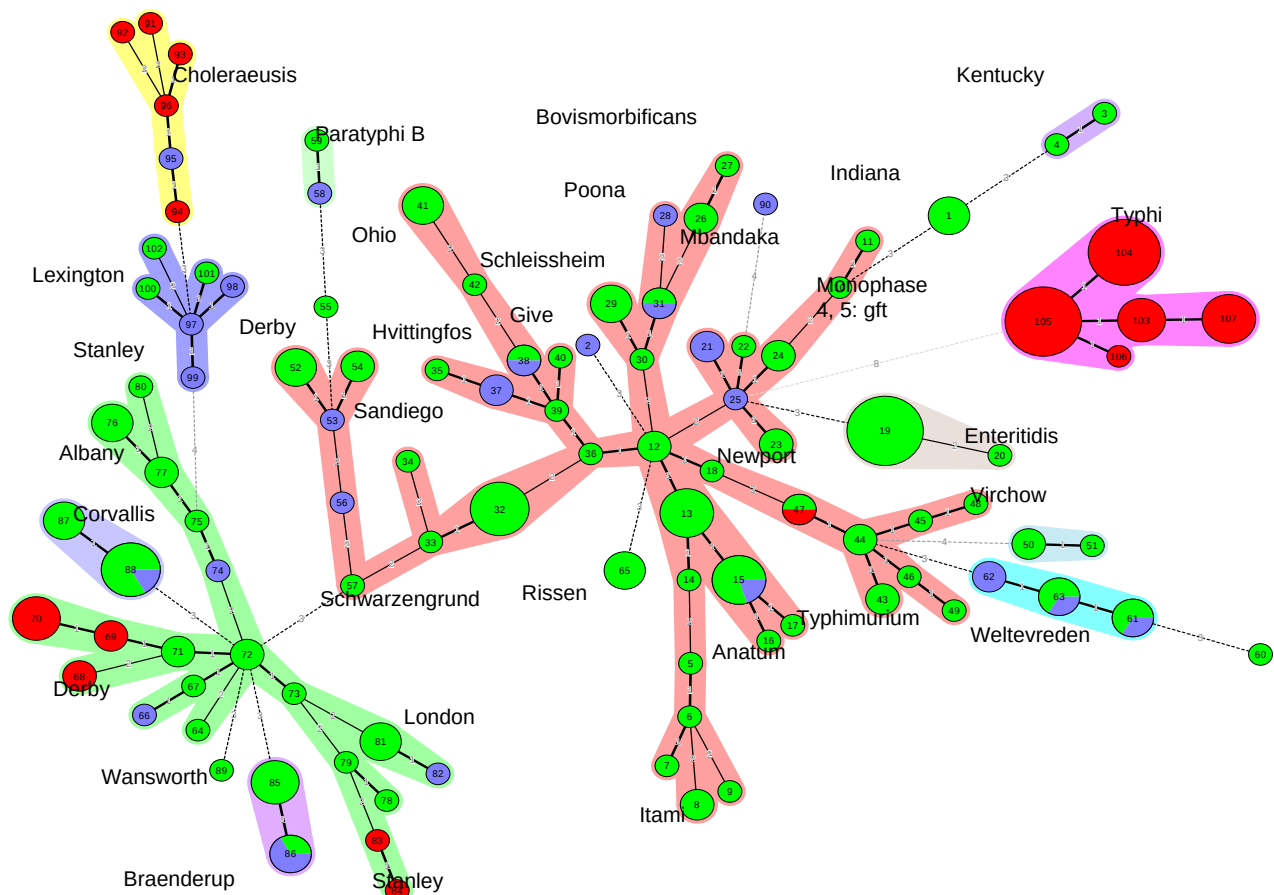


Figure 1-2B : Distribution des génotypes en fonction de l'origine de la souche : humaine, de couleur rouge ; animale, de couleur verte ; aliment, de couleur bleu violet.

Figure 1-2 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 206 souches de *S. enterica* en 107 types de MLVA. La construction de MST a été faite en utilisant le coefficient catégoriel et une différence de deux marqueurs pour constituer les complexes clonaux. La taille des cercles reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (les lignes épaisses connectent des variants à un seul locus, la ligne fine représente la liaison entre deux variants différents par deux loci et les lignes en pointillé indiquent la distribution entre deux types de distributions alléliques). Le nombre dans chaque cercle indique le génotype. La couleur entourant plusieurs génotypes, est définie comme complexe clonal dont les clones sont différents par deux marqueurs.

La branche A contient uniquement *Salmonella* Typhi et la branche B, les quatre autres sérotypes (*Salmonella* Derby, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Stanley, et *Salmonella* Typhimurium) et le marqueur STTR5 est le seul discriminant pour les quatre sérotypes. Les complexes clonaux de *Salmonella* Typhi sont assez homogènes, et le marqueur STTR5 différencie à lui seul les souches de Typhi en cinq complexes clonaux distincts. Ces clones se sont différenciés très tôt par rapport aux complexes clonaux des autres sérotypes.

La souche Typhimurium de génotype 47 existe toute seule dans la branche B et se différencie par le marqueur STTR5 des clones *Salmonella* Derby, *Salmonella* Choleraesuis et *Salmonella* Stanley. Le sérotype Choleraesuis comprend 5 souches groupées en trois groupements clonaux. Les marqueurs Sal20 et STTR5 différencient les génotypes *Salmonella* Stanley 83 et 84 du reste des autres sérotypes. Les huit souches de *Salmonella* Derby sont groupées en trois complexes clonaux/génotypes distincts 68, 69, et 70. Les marqueurs Sal20 et STTR8 différencient le clone 68 (deux *Salmonella* Derby), et le marqueur STTR5 différencie le clone 69 (deux *Salmonella* Derby) par rapport au clone *Salmonella* Derby 70.

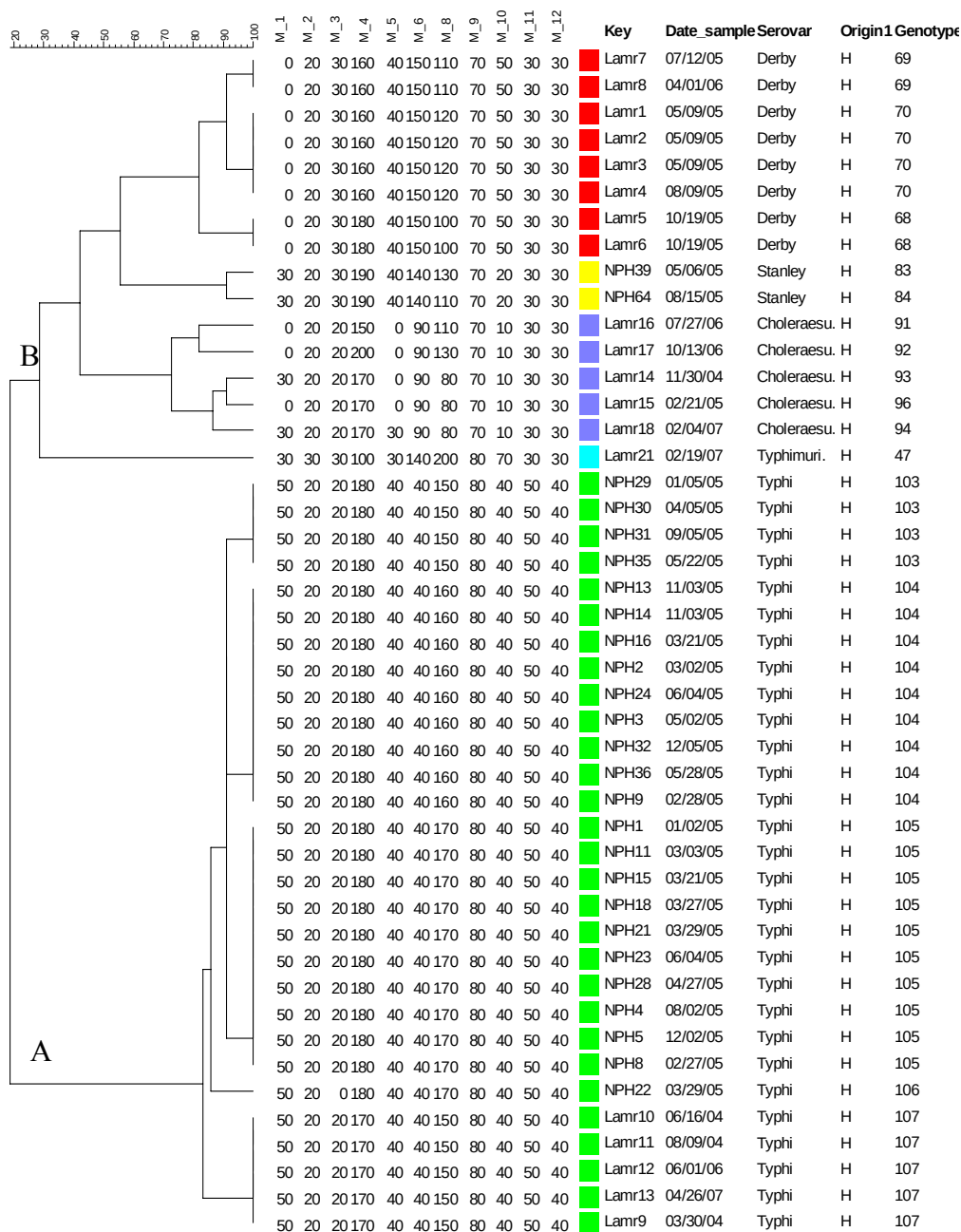


Figure 2-1A : Distribution phylogénétique des 45 isolats de *S. enterica* par MLVA utilisant 11 marqueurs VNTR. Les 45 isolats étudiés ont été obtenus à partir de deux sources : des cas humains (H) du laboratoire de microbiologie médicale, 2004-2007, IPC, et des patients de l'Hôpital National Pédiatrique, 2005.

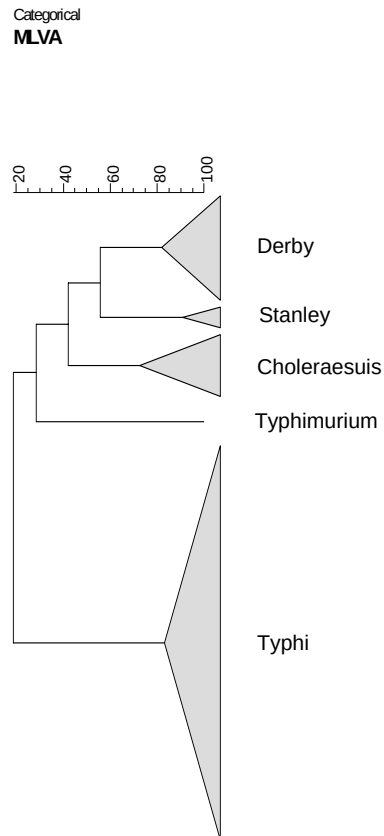


Figure 2-1B : Distribution phylogénique par MLVA de cinq sérotypes de *S. enterica* d'origine humaine en utilisant le coefficient catégoriel et l'analyse de groupage par paire des moyennes arithmétiques non pondérés (UPGMA). Les souches de même sérotype sont groupées.

2-2. Arbre minimum couvrant

Les 45 souches d'origine humaine incluses dans l'analyse, sont distribuées en 16 génotypes pour 29 souches de *Salmonella* Typhi, huit de *Salmonella* Derby, cinq de *Salmonella* Choleraesuis, deux de *Salmonella* Stanley et une souche de *Salmonella* Typhimurium (Figure 2-2).

Cinq complexes clonaux de *Salmonella* Typhi (103-107) se sont différenciés très tôt de huit loci par rapport aux autres complexes clonaux dont le plus proche est *Salmonella* Derby (génotype 68). Ce sérotype comprend trois complexes clonaux qui se sont différenciés, d'une part de cinq loci du complexe clonal de *Salmonella* Choleraesuis (génotype 91), et d'autre part de quatre loci par rapport au complexe clonal de *Salmonella* Stanley, génotype 84. Ce génotype se différencie lui même de six loci de *Salmonella* Typhimurium d'origine humaine (génotype 47).

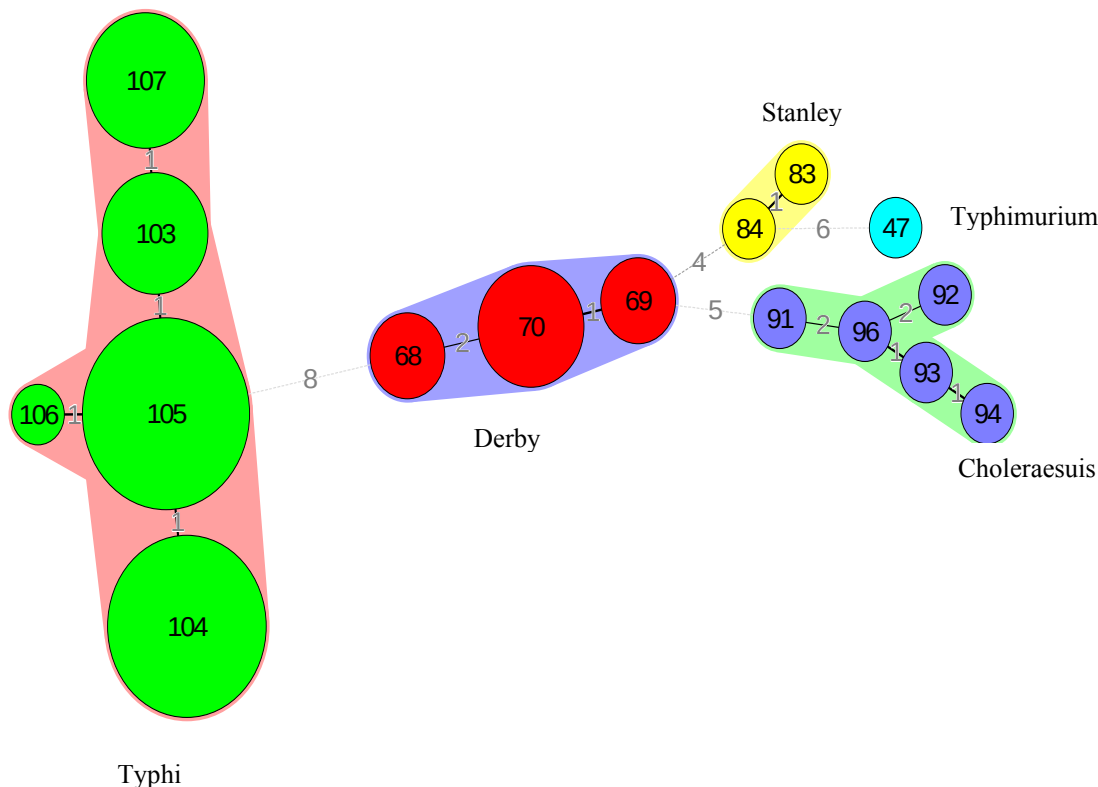


Figure 2-2 : Arbre minimum couvrant obtenu en utilisant 11 marqueurs représentant le profil de 45 souches de *S. enterica* d'origine humaine distribuées en 16 types de MLVA. La construction de MST a été faite en utilisant le coefficient catégoriel. La taille du cercle reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (les lignes épaisses connectent des variants différents pour un locus, les lignes fines représentent la liaison entre deux cercles différents pour deux loci et les lignes en pointillé indiquent la distribution entre deux types de distributions alléliques. Le nombre dans chaque cercle indique le génotype.

3-Diversité génotypique de salmonelles isolées d'échantillons biologiques alimentaires crus (n=133)

3-1. Dendrogramme

La méthode des coefficients catégoriels et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme de répartition phylogénique des 133 souches d'origines animales crues représentées par 26 sérotypes (Figure 3-1A et 3-1B). Ces 26 sérotypes se sont différenciés en deux branches de complexes clonaux distincts A et B.

Le complexe de clones génétiques de sérotype Lexington diverge très tôt par rapport aux autres sérotypes, et la branche A contient uniquement le génotype de *Salmonella* Lexington groupant 3 souches.

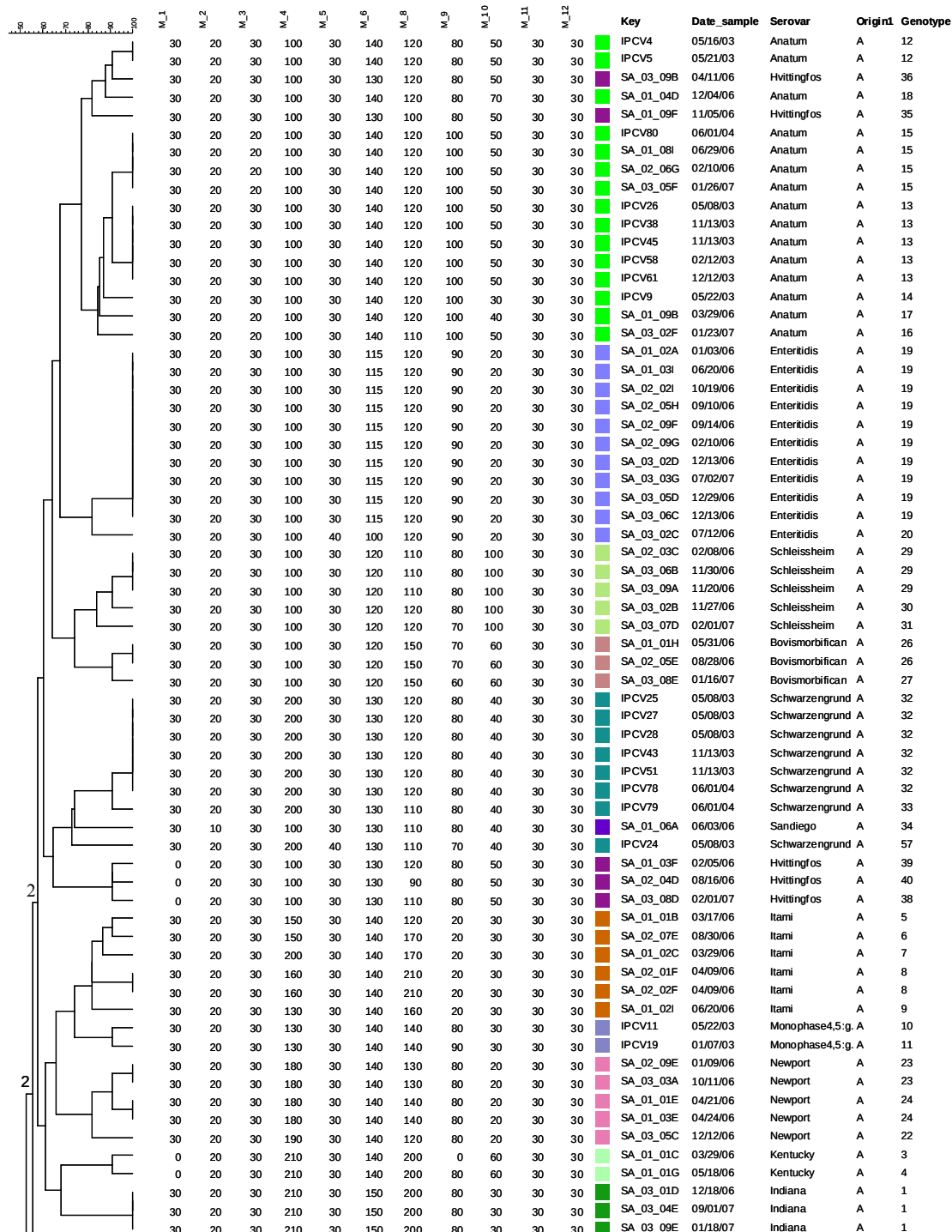
La branche principale B contient 25 autres sérotypes (*Salmonella* Albany, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Hvitittingfos, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Itami, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* London, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Paratyphi B, *Salmonella* Rissen,

Salmonella Sandiego, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Schleissheim, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Wansworth, *Salmonella* Weltevreden, et *Salmonella* Monophase 4, 5 : gft) et se subdivise en deux principaux groupes B.1 et B.2, qui sont plutôt équivalents dans leur distribution avec respectivement 10 et 15 sérotypes.

Le groupe B.1 montre une complexité génétique presque homogène en sous groupe B.1.1 et B.1.2, et *Salmonella* Derby présente des sous-clones à la fois dans les deux sous groupes. A l'intérieur du sous-groupe B.1.1, *Salmonella* Derby et *Salmonella* Stanley présentent plusieurs sous-clones, puis dans le sous-groupe B.1.2, *Salmonella* Weltevreden présente également plusieurs sous-clones.

Le groupe B.2 montre une complexité génétique clonale très hétérogène, le sous- groupe B.2.1 comprenant les clones de *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Virchow qui divergent très tôt de ce groupe B.2.2, puis dans ce dernier les sérotypes *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Hvitittingfos et *Salmonella* Schwarzengrund présentent plusieurs sous-clones.

Ces résultats montrent que le profil antigénique de 133 isolats de *S. enterica* d'origine animale appartient de loin à plusieurs lignées clonales et présentent des modèles évolutifs différents.



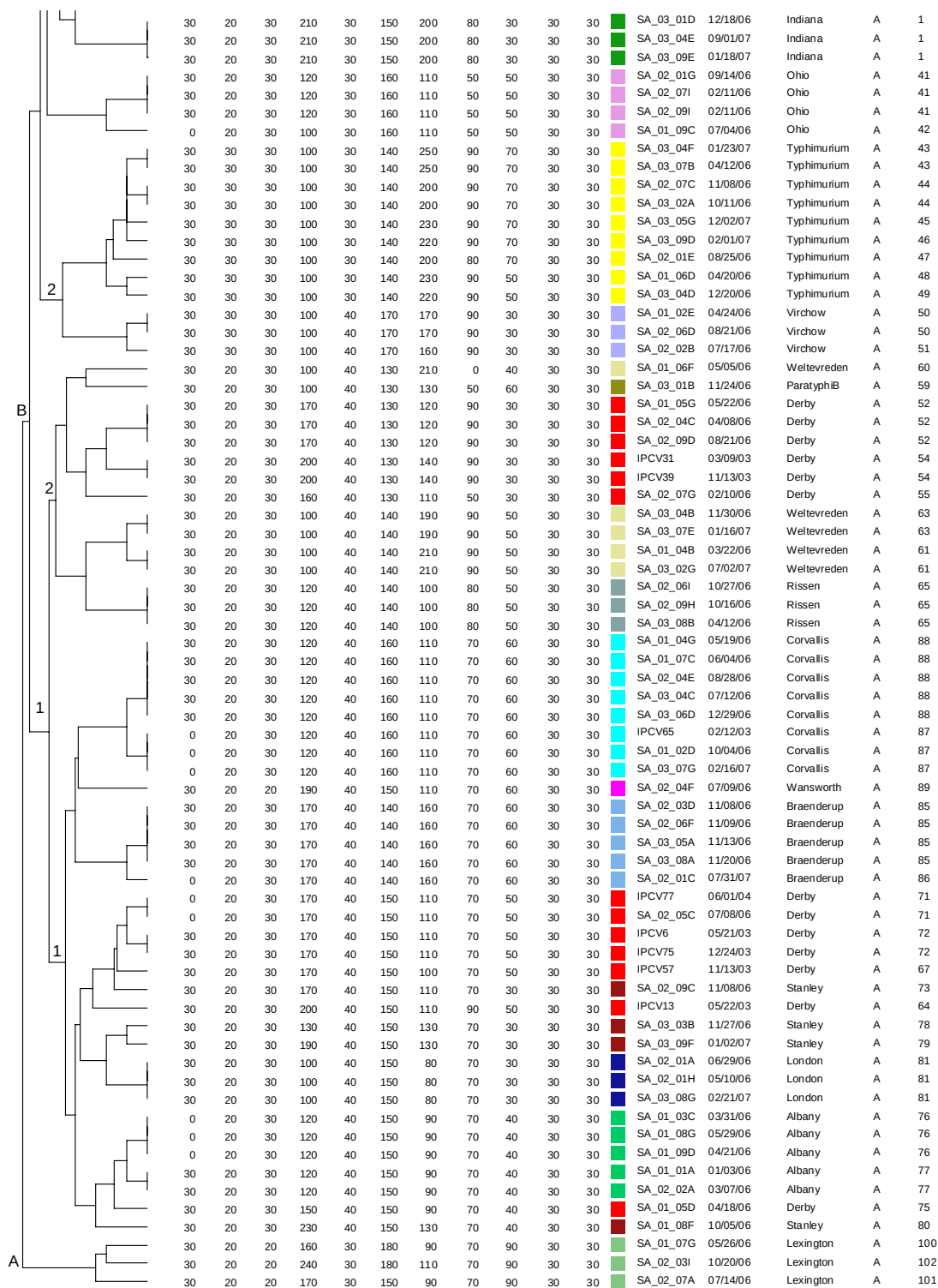


Figure 3-1A : Distribution phylogénétique de 133 isolats de *Salmonella enterica* par MLVA en fonction des 11 marqueurs VNTR. Les 133 isolats étudiés sont d'origines alimentaires crus (A) (une étude du laboratoire de microbiologie alimentaire, IPC, et du laboratoire de santé animale, ministère de l'Agriculture, de la Forêt et de la Pêche du Cambodge, 2003-2004, et d'un projet poulet, Action de concertation inter-Pasteurienne, 2006-2007). Les sérotypes sont identifiés par une couleur différente.

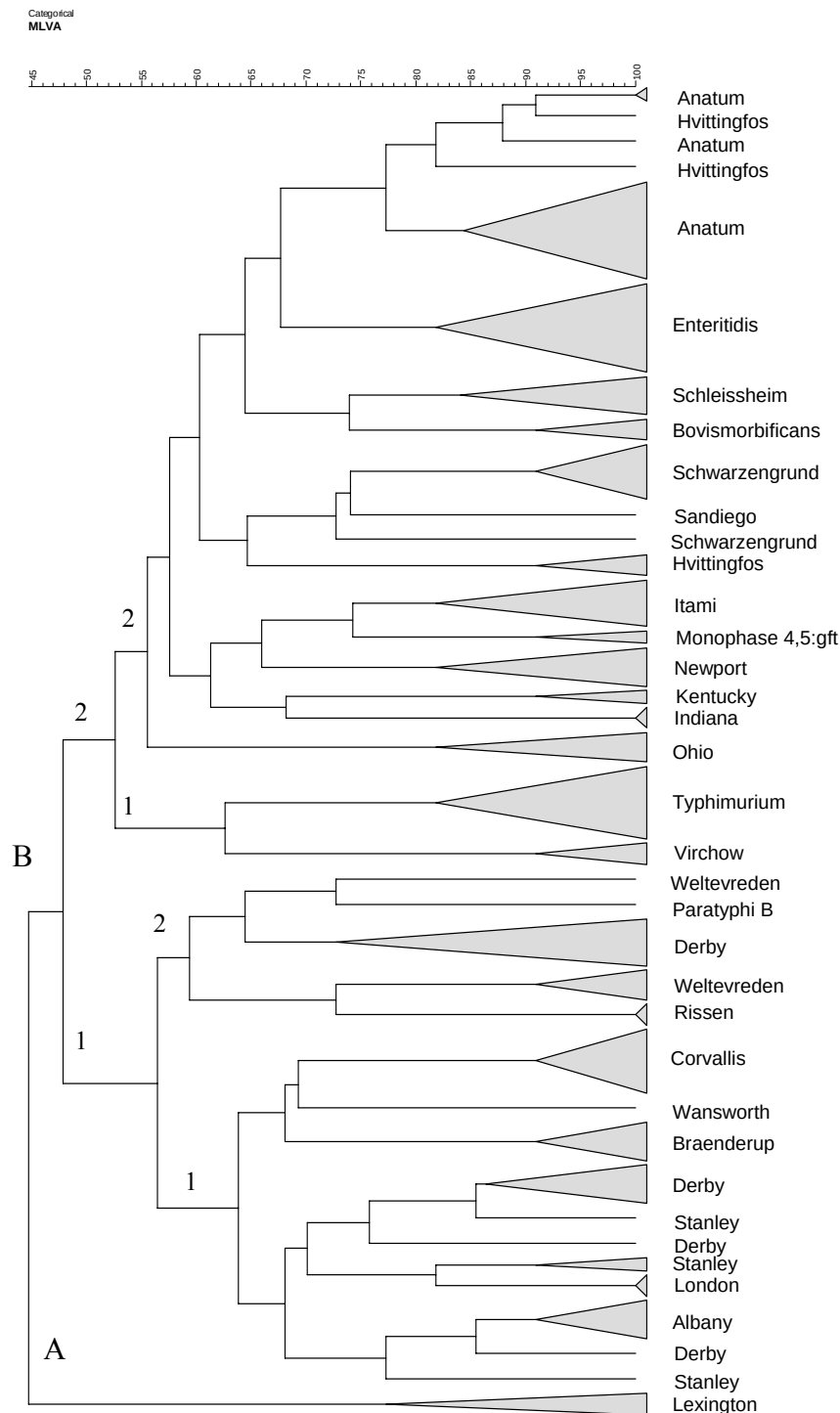


Figure 3-1B : Distribution phylogénique de 26 sérotypes de *Salmonella enterica* en utilisant le coefficient catégoriel et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA). Les souches de même sérotype sont groupées.

3-2. Arbre minimum couvrant

L'étendue de la diversité génétique de la population composée par les 133 isolats alimentaires crus avec 26 sérotypes différents, est répartie en 70 génotypes (Figure 3-2). Cinq types de dispersion génétique de variants MLVA sont observés :

-Le MLVA type 1 contient une distribution de variants alléliques définis comme un même génotype illustré par les sérotypes Indiana et Rissen.

-Le MLVA type 2 contient des génotypes différents appartenant au même sérotype et différents par un seul locus (SLVs). Il comprend les *Salmonella* Albany, *Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* London, *Salmonella* Paratyphi B, *Salmonella* Schleissheim, *Salmonella* Virchow, et *Salmonella* Monophase 4,5: gft.

-Le MLVA type 3 groupes des variants différents par deux loci (DLVs) comprenant les *Salmonella* Ohio et *Salmonella* Enteritidis.

-Le MLVA type 4 de dispersion est composé de variants regroupant SLVs et DLVs pour six autres sérotypes : *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Hvittingfos, *Salmonella* Itami, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Stanley, et *Salmonella* Typhimurium.

-Le MLVA type 5 comprend les sérotypes Derby, et *Salmonella* Weltevreden. Le sérotype *Salmonella* Weltevreden est structuré en SLV et possède un autre génotype différent par trois loci. Le sérotype *Salmonella* Derby présente trois groupements génétiques distincts: un complexe clonal présentant des SLV et des DLV (génotype 64, 67, 71 et 72), un complexe clonal présentant des DLV (génotype 52 et 54), et deux génotypes 55 et 75 ayant une seul clone.

Deux sérotypes (*Salmonella* Sandiego et *Salmonella* Wansworth) ont des isolats uniques inclus dans l'analyse. Le sérotype Sandiego génotype 34 (origine poulet) se distingue du génotype *Salmonella* Schwarzengrund 33 (porc/bœuf) par deux loci, et *Salmonella* Wansworth génotype 89 diverge de *Salmonella* Derby génotype 72 par trois loci.

La divergence génétique entre les sérotypes de *S. enterica* inclus dans l'analyse est très variable et les sérotypes sont différents les uns des autres de un à quatre loci VNTR.

Il n'existe pas de type MLVA génétique où deux sérotypes différents présentent un profil génétique identique. Entre les sérotypes, les différents types de MLVA entre les génotypes varient de un ou deux loci et rarement de plus de trois loci.

Weltevreden) sont assez homogènes dans leur répartition. Ce sont les marqueurs suivants : Sal 20, STTR5, STTR7 et STTR8, qui différencient les souches dans cette branche. Trois souches de Derby sont groupées en 2 complexes clonaux/génotypes distincts 54, 66, et 74.

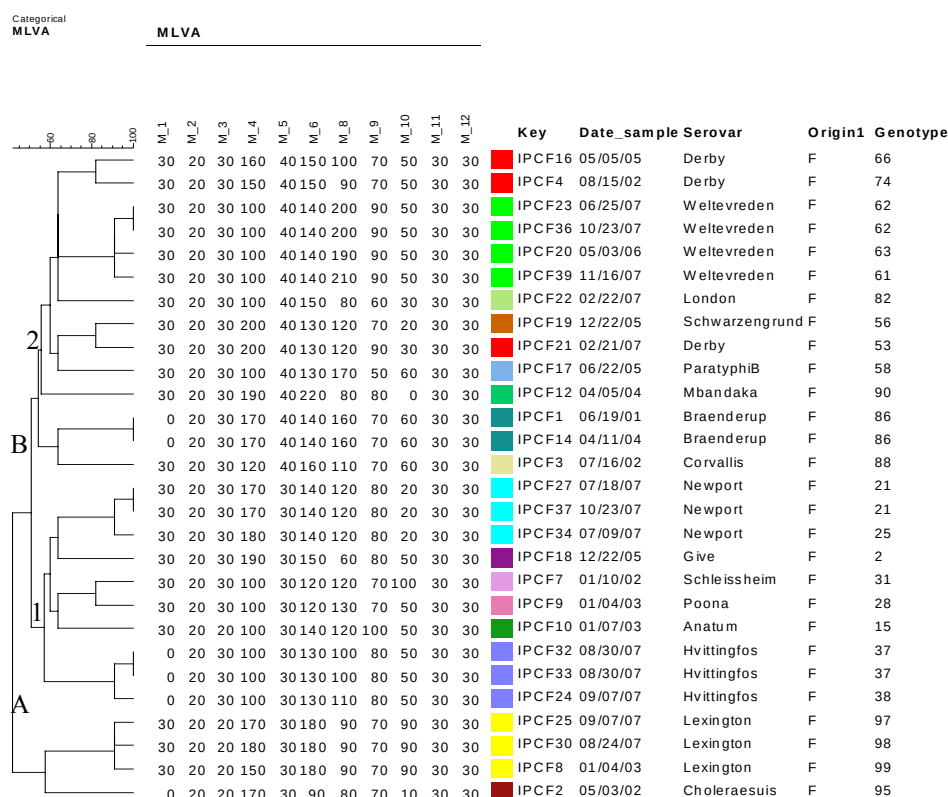


Figure 4-1 : Distribution phylogénétique des 28 isolats de *S. enterica* utilisant 11 marqueurs VNTR. Les 28 isolats étudiés sont originaire d'aliments cuits (F) (collection du laboratoire de microbiologie alimentaire, IPC, 2001-2007). Les sérotypes sont identifiés par une couleur différente.

4-2. Arbre minimum couvrant

L'étendue de la diversité génétique de la population composée par les 28 isolats alimentaires cuits, est répartie en 24 génotypes. Trois types de dispersion génétique (variants MLVA) sont observés pour les 16 sérotypes de *Salmonella enterica* (Figure. 4-2) :

- Le premier type MLVA contient une distribution de variants alléliques définie comme ayant un même génotype illustré par *Salmonella* Braenderup, génotype 86.
- Le deuxième type MLVA contient des génotypes différents appartenant au même sérotype et différents par un seul locus (SLV). Il comprend les *Salmonella* Hvittingfos, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Newport, et *Salmonella* Weltevreden.

-Le troisième type MLVA groupe des variants différents par deux loci (DLVs) comprenant *Salmonella* Derby.

-Tout le reste des sérotypes sont inclus avec une souche unique dans cette analyse.

La divergence génétique entre les sérotypes de *S. enterica* est très variable, et ils sont différenciés les uns des autres par deux à quatre loci VNTR ou marqueurs.

Il n'existe pas de type MLVA génétique où deux sérotypes différents présentent un profil génétique identique.

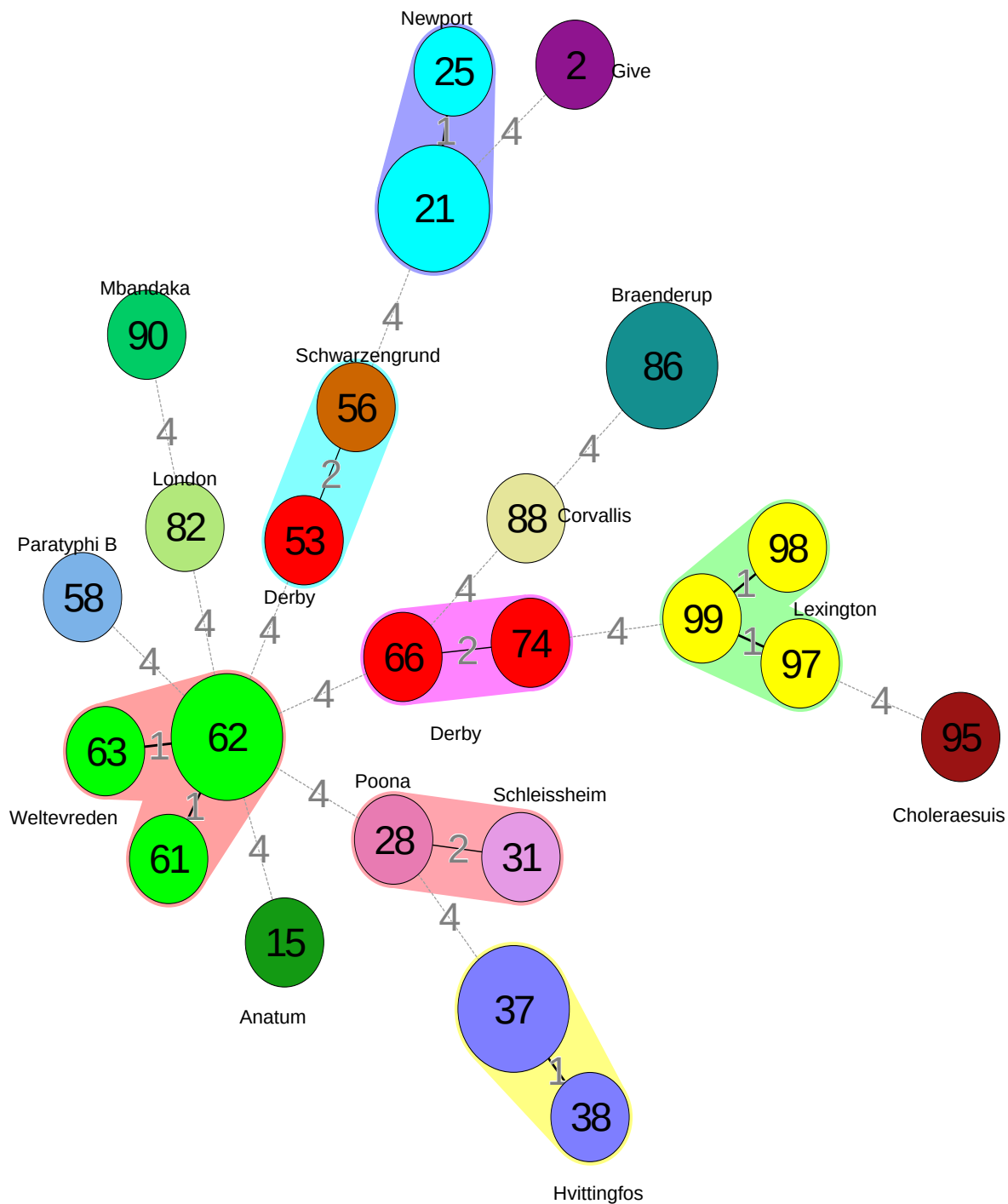


Figure 4- 2 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 28 souches de *S. enterica* en 24 types de MLVA. La construction MST a été faite en utilisant le coefficient catégoriel. La taille du cercle reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (les lignes épaisses connectent les variants différents par un seul locus, les lignes fines représentent la liaison entre deux cercles différents par deux loci et les lignes en pointillé indiquent la distribution entre deux types de distribution alléliques). Le nombre dans chaque cercle indique le génotype. Chaque sérotype est ombré avec une couleur différente.

5- Diversité génotypique de salmonelles ACSSuT résistantes de même sérotype isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=81)

5-1. Variations alléliques

Les 11 marqueurs provenant de région VNTR du génome de *Salmonella* Typhimurium LT2 (Tableau 5) ont été utilisés pour tester 81 souches de salmonelles représentées par 8 sérotypes différents (*Salmonella* Albany, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Stanley, et *Salmonella* Typhimurium) dont 26 souches sont résistantes à ACSSuT. Ces souches ont été isolées à partir de trois sources (animaux, aliments et hommes).

Quarante cinq variants ont été discriminés par la technique MLVA en 9 génotypes pour 16 souches d'origine humaine, 5 génotypes pour 5 souches issues d'aliments cuits et 31 génotypes pour 60 souches isolées de viande crue.

Le tableau 8.1 présente la variabilité allélique de 81 souches de *S. enterica* évaluée par les 11 marqueurs. L'analyse présente une gamme de polymorphisme allant 1 à 11 allèles. L'indice global de diversité polymorphique, $DI = 0,972$ est proche de 1, ce qui signifie un pouvoir discriminatoire élevé de ces 11 marqueurs pour toutes les souches de manière indépendante de l'origine (Tableau 8.1).

L'indice de diversité a été constaté du plus élevé vers le plus faible respectivement pour les souches alimentaires ($DI = 1.000$), animales ($DI = 0.956$) et les isolats d'origine humaine ($DI = 0,933$) (Tableau 8.2, Tableau 8.3, et Tableau 8.4).

Chacun des marqueurs utilisés dans cette étude présente un faible indice polymorphique pour toutes les souches ($HGDI < 0,80$). Le marqueur Sal20 avec de petits motifs répétés (3pb) dans le gène *ftsN* présente une distribution allélique de 11 allèles, allant de 10 à 23 TR pour toutes les souches et un indice discriminatoire élevé pour des souches alimentaires (respectivement $DI = 1.000$). Le marqueur STTR5 de gène *yohM* présente des unités répétées courtes (6pb) et dispose d'une grande variation de 11 allèles abritant de huit à 25 TR et un indice discriminatoire important pour les souches alimentaires (respectivement $DI = 0,900$). Le marqueur STTR3 dans le gène *bigA* est très discriminant pour les souches alimentaires ($DI = 0.900$), mais ce marqueur est peu discriminant pour les souches humaines et animales ($DI < 0,80$).

Huit autres marqueurs (Sal06, Sal10, Sal15, Sal 23, STTR7, STTR8, TR1, et TR5) sont peu discriminants pour toutes les souches (entre un à six allèles). L'indice de diversité de Hunter et Gaston (HGDI) correspondant a été trouvé moins polymorphique au sein de toutes les origines de souches ($DI < 0,80$).

Tableau 8.1. Diversité génétique de 81 *S. enterica* ACSSuT résistantes de même sérotypes isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains.

Locus (alias)	LT2_position dans le génome _ TR (pb) _ unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions et fragment (pb)	HGDI ^a	
				Total (n= 81)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	162	0.440	0.348-0.531
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	2	2, 3 (196 - 208)	0.000	0.000-0.123
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.372	0.254-0.491
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	11	10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23 (175 - 214)	0.798	0.738-0.858
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.559	0.486-0.633
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	6	9, 10,11.5, 13, 14, 15 (325 -523)	0.739	0.676-0.801
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	11	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 22, 23, 25 (217 - 319)	0.718	0.620
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	5	6,7, 8, 9, 10 (477 - 672)	0.667	0.581-0.753
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	6	1, 2, 3, 4, 5, 7 (229 - 925)	0.669	0.557-0.782
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.123
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.123
Total Genotypes				0.972 45	

^a Indice de diversité de Hunter-Gaston

Tableau 8.2. Diversité génétique de 16 *S. enterica* ACSSuT résistantes d'origine humaine de même sérotype que celles isolées d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus)

Locus (alias)	LT2_position dans le génome _ TR (pb) _unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions et fragment (pb)	HGDI ^a	
				Isolats humains (n= 16)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	162	0.419	0.210-0.628
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.000	0.000-0.341
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.000	0.000-0.341
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	4	16, 17, 19, 20 (193- 205)	0.810	0.675-0.944
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.514	0.299-0.729
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	3	9, 14, 15 (325 -523)	0.629	0.484-0.773
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	4	8, 11, 12, 13 (217 -247)	0.829	0.748-0.910
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	1	7 (555)	0.000	0.000-0.341
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	3	1, 2, 5 (229 - 693)	0.629	0.484-0.773
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.341
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.341
Total				0.933	
Genotypes				11	

^a Indice de diversité de Hunter-Gaston

Tableau 8.3. Diversité génétique de 60 *S. enterica* ACSSuT résistantes provenant d'aliments crus de même sérotype que celles isolées d'échantillons biologiques alimentaires cuits et humains.

Locus (alias)	LT2_position dans le génome _ TR (pb) _unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions et fragment (pb)	HGDI ^a	
				Isolats animaux (n=60)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	162	0.171	0.045-0.297
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	2	2, 3 (196 - 208)	0.140	0.021-0.259
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.140	0.021-0.259
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	10	10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 23 (175 - 214)	0.661	0.537-0.785
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.492	0.443-0.541
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	5	10,11.5, 13, 14, 15 (358 -523)	0.723	0.670-0.775
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	9	9, 11, 12, 13, 14, 20, 22, 23, 25 (223 - 319)	0.697	0.583-0.810
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	5	5, 7, 8, 9, 10 (477 - 672)	0.751	0.703-0.798
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	5	2, 3, 4, 5, 7 (345 - 925)	0.761	0.709-0.813
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.123
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.123
Total				0.956	
Genotypes				31	

^a Indice de diversité de Hunter-Gaston

Tableau 8.4. Diversités génétiques de 5 *S. enterica* ACSSuT résistantes d'origine alimentaire cuit de même sérotype que celles isolées d'échantillons biologiques alimentaires crus ou d'origine humaine.

Locus (alias)	LT2_position dans le génome _ TR (pb) _unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions et fragment (pb)	HGDI ^a	
				Isolats alimentaire cuits (n=5)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	162	0.400	0.000-0.821
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.000	0.000-0.499
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189 - 201)	0.600	0.428-0.772
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	5	10, 15, 16, 17, 20 (175 - 205)	1.000	0.745-1.000
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	2	3, 4 (250 - 262)	0.600	0.428-0.772
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	4	9, 13, 14, 15 (325 -523)	0.900	0.728-1.000
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	4	8, 9, 10, 12 (217 - 241)	0.900	0.728-1.000
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	3	7, 9, 10 (555 - 672)	0.700	0.356-1.000
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	3	1, 3, 5 (229 - 693)	0.700	0.356-1.000
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.499
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.499
Total				1.000	
Genotypes				5	

^a Indice de diversité de Hunter-Gaston

5-2. Dendrogramme

Quarante cinq combinaisons d'allèles étaient déduites pour 81 souches permettant de définir l'extension de la diversité phylogénétique de ce groupe (Figure.5-1). Tous les variants de MLVA ont été groupés en deux branches A et B génétiquement liées par un ancêtre en commun.

La première branche A contient le sérotype *Salmonella* Choleraesuis avec six souches, chacune des souches représentant un complexe clonal, dont cinq sont résistantes à ACSSuT. Cette branche A diverge très tôt, et dans la branche B figurent les sérotypes *Salmonella* Albany, *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Stanley, et *Salmonella* Typhimurium.

Dans ce dendrogramme, les sérotypes *Salmonella* Derby et *Salmonella* Stanley présentent chacun trois sous-clones.

La branche B se subdivise en sous-groupes B.1 et B.2 qui sont plutôt homogènes sur le plan de la distribution de complexes clonaux. Le groupe B.1 montre une complexité génétique presque homogène en sous-groupe B.1.1 et B.1.2.

Le sous-clone *Salmonella* Derby dans la branche B.2.1, présente sept souches non résistantes à ACSSuT d'origine A. Dans le sous-groupe B.2.2.2, un sous-clone de *Salmonella* Derby d'origine H et A comprend 14 souches ayant une résistance à ACSSuT. Un autre sous-clone de *Salmonella* Derby d'origine A se situe à l'intérieur du sous-groupe B.2.2.2, dont trois souches ne sont pas résistantes à ACSSuT.

Six souches de *Salmonella* Stanley se répartissent en deux sous-clones avec quatre souches dans la branche B.2.2.2, et deux souches résistantes à ACSSuT dans la branche B.2.2.1.

Le groupe B.1 montre une complexité génétique clonale assez homogène : le sous- groupe B.1.1 comprend plusieurs sous-clones de sérotype *Salmonella* Typhimurium, et le clone 37 regroupe deux souches de *Salmonella* Typhimurium d'origine A et H, qui sont résistantes à ACSSuT.

Dans la sous-branche B.1.2.1, 11 souches de sérotype Enteritidis se subdivisent en deux sous-clones, 31 et 32, parmi les 10 souches du clone 31, une souche (SA_01_02A) est résistante à ACSSuT.

Ces résultats montrent le polymorphisme de 81 isolats de *S. enterica* d'origine H, A et F, dont certains isolats sont résistants à ACSSuT, et appartiennent à plusieurs lignées clonales ayant présentés des modèles évolutifs différents. La résistance à ACSSuT n'a pas d'effet sur le typage moléculaire de *S. enterica* par la technique MLVA.

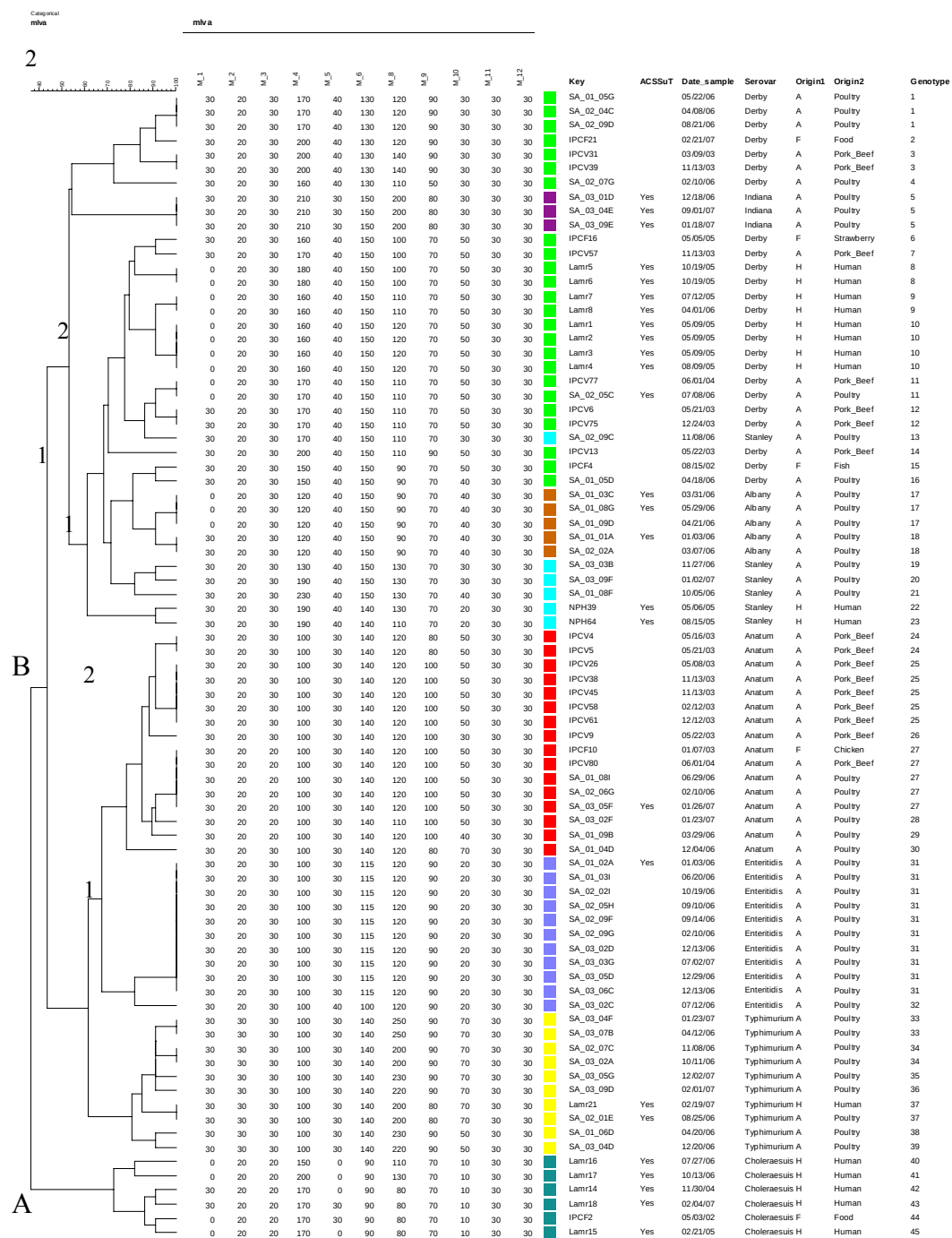


Figure 5-2 : Distribution phylogénétique des 81 isolats de *S. enterica* dont 26 souches sont résistantes a ACSSuT en utilisant 11 marqueurs VNTR. Les 81 isolats étudiés sont originaires d'aliments cuits (n=5, appelés F) et crus (n=60, appelés A) et d'origine humaine (n= 16, appelés H). Les sérotypes sont identifiés par une couleur différente.

5-3. Arbre minimum couvrant

L'arbre minimum couvrant (MST) illustre dans la figure 5-2 la clonalité de souches issues de trois sources (A, F et H) pour chaque sérotype de *S. enterica*. Cinq types de dispersion génétique ont été observés pour les 8 sérotypes de *S. enterica*.

- La première dispersion génétique représente une distribution de variants alléliques définie comme un même génotype groupant plusieurs isolats, cela est illustré par le sérotype Indiana comprenant trois souches qui sont toutes résistantes à ACSSuT (génotype 5).

- La deuxième dispersion génétique représentée par des variants différents dans un seul locus (SLVs). Il comprend *Salmonella* Albany comprenant 5 souches dispersées en génotypes 17 et 18, dont chacun des variants contient des souches de *Salmonella* Albany résistantes à ACSSuT.

- Le troisième type groupe des variants différents par deux loci (DLVs) comprenant le sérotype Enteritidis, comportant 11 souches en deux variants 31 et 32 ; dans le variant 31 comprenant 10 souches, une souche est ACSSuT résistante.

- Le quatrième type de dispersion est composé de variants regroupant SLVs et DLVs pour trois autres sérotypes : *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Choleraesuis, et *Salmonella* Typhimurium. *Salmonella* Anatum comprend 16 souches réparties en SLVs et SDVs, une souche est ACSSuT résistante et classée en génotype 27 avec les autres souches de *Salmonella* Anatum non ACSSuT résistantes. *Salmonella* Choleraesuis comprend 6 souches dont cinq sont ACSSuT résistantes. *Salmonella* Typhimurium comprend 10 souches, dont un variant 37 groupe deux souches Typhimurium ACSSuT résistantes

- Le cinquième comprend *Salmonella* Derby, et *Salmonella* Stanley. *Salmonella* Derby regroupe des variants MLVA organisés en deux distributions alléliques distinctes. La première distribution (variants 1-4) est diversifiée entre les variants de un à trois loci, et est liée à la deuxième distribution par trois loci VNTR (figure 5-2). La deuxième distribution de *Salmonella* Derby est exclusivement en SLVs et SDVs. *Salmonella* Stanley comprend deux distributions, la première distribution est en SLVs et SDVs et la deuxième distribution est placée très loin et liée à *Salmonella* Albany 18.

La divergence génétique entre les différents sérotypes de *S. enterica* inclus dans l'analyse MLVA varie de deux à cinq loci VNTR indépendamment de la sensibilité ou de la résistance à ACSSuT. Les marqueurs ont été choisis parmi les loci ne contenant pas de gène de résistance aux antibiotiques, on peut en déduire qu'il n'y a pas d'ingérence de la réaction croisée entre un marqueur et le gène de résistance à ACSSuT dans le génome.

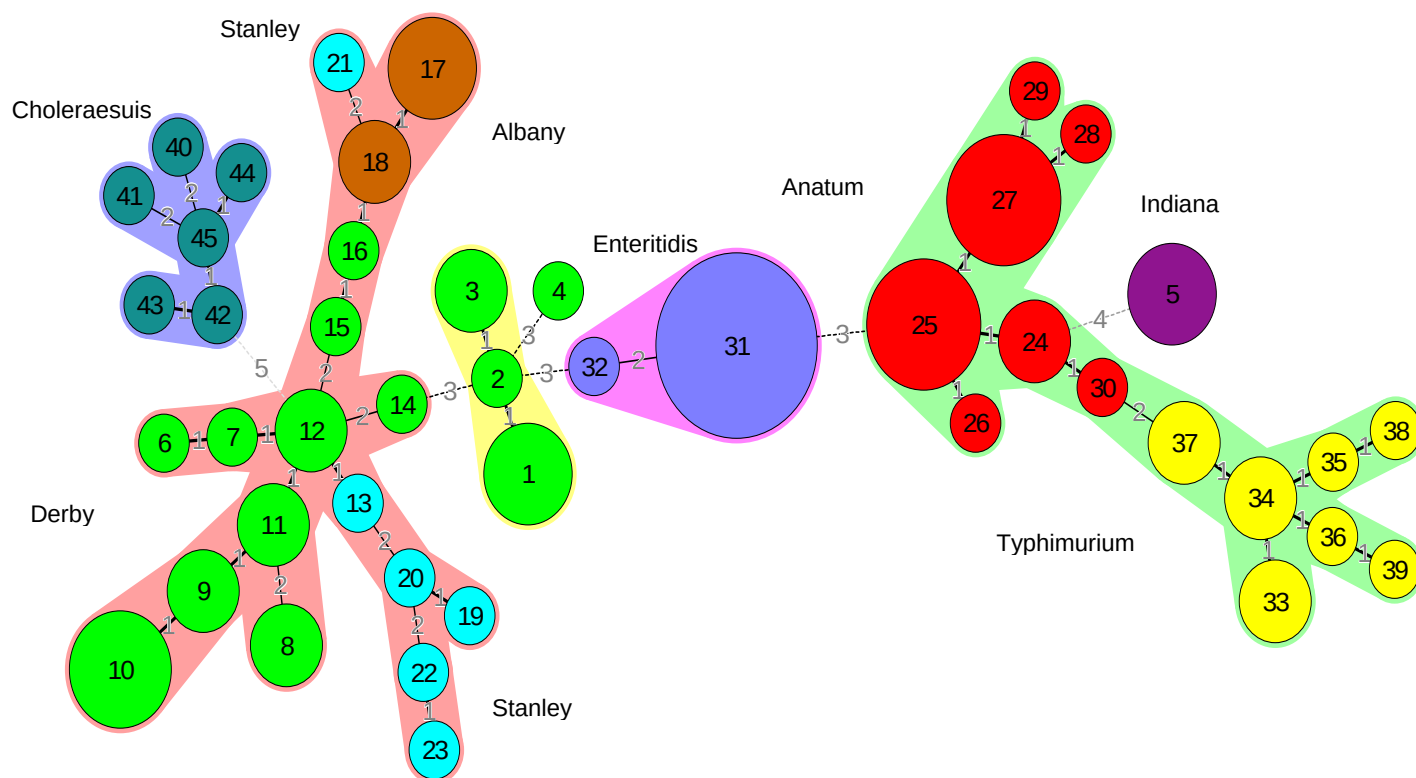


Figure 5- 3 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 81 isolats de *Salmonella enterica* ACSSuT résistants répartis en 45 types de MLVA. La construction MST a été faite en utilisant le coefficient catégoriel. La taille du cercle reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (les lignes épaisses connectent les variants différents par un seul locus, les lignes fines représentent la liaison entre deux cercles différents par deux loci et les lignes en pointillée indiquent la distribution entre deux types de distribution alléliques). Le nombre dans chaque cercle indique le génotype. Chaque sérotype est ombré avec une couleur différente

6- Diversité génétique de sérotypes particuliers

6-1. Diversité génotypique de *Salmonella enterica* Derby isolés d'échantillons biologiques alimentaires (cuits et crus) et humains (n=24)

6-1-1. Diversité génétique

L'Indice de diversité utilisant 11 marqueurs est polymorphique pour le total des souches (DI=0.949), puis pour les souches d'origine A et d'origine F (respectivement DI=0.923, et DI=1.000). Chacun des 11 marqueurs testés n'est pas discriminatoire pour les 24 souches de *Salmonella* Derby, mais l'Indice de diversité global est discriminatoire pour les souches de *Salmonella* Derby d'origine animale et alimentaire (Tableau 9.1, Tableau 9.2, Tableau 9.3, et Tableau 9.4).

Tableau 9.1. Diversité génétique de 24 *S. enterica* Derby obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Total (n= 24)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	3 (162)	0.507	0.441-0.573
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.000	0.000-0.244
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	1	3 (201)	0.000	0.000-0.244
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	5	15, 16, 17, 18, 20 (190-205)	0.779	0.708-0.850
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	1	4 (262)	0.000	0.000-0.244
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	2	13, 15 (457 - 523)	0.431	0.280-0.583
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	5	9, 10, 11, 12,14 (223 - 253)	0.732	0.653-0.811
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	3	5, 7, 9 (477 – 633)	0.489	0.331-0.647
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	3	3, 4, 5 (461 - 693)	0.489	0.331-0.647
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3(191)	0.000	0.000-0.244
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3(173)	0.000	0.000-0.244
Total				0.949	
Genotypes				14	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Tableau 9.2. Diversité génétique de 8 *S. enterica* Derby d'origine humaine obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats humains (n= 8)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	0	0	0.250	0.000-0.594
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.250	0.000-0.594
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	1	3 (201)	0.250	0.000-0.594
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	2	16, 18 (193-199)	0.607	0.323-0.891
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	1	4 (262)	0.250	0.000-0.594
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	1	15 (523)	0.250	0.000-0.594
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	3	10, 11, 12 (229-241)	0.250	0.000-0.594
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	1	7 (555)	0.821	0.707-0.936
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	1	5 (693)	0.250	0.000-0.594
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.466
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.250	0.000-0.594
Total				0.714	
Genotypes				3	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Tableau 9.3. Diversité génétique de 13 *S. enterica* Derby d'origine d'aliments crus obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	LT2 _position dans le génom _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats animaux (n= 13)	Intervalle de confiance 95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	3 (162)	0.410	0.116-0.705
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.154	0.000-0.399
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	1	3 (201)	0.000	0.000-0.372
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	4	15, 16, 18, 20 (190-205)	0.603	0.361-0.844
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	1	4 (262)	0.154	0.000-0.399
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	2	13, 15 (457 - 523)	0.538	0.497-0.580
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	5	9, 10, 11, 12,14 (223 - 253)	0.756	0.588-0.925
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	3	5, 7, 9 (477 – 633)	0.615	0.504-0.727
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	3	3, 4, 5 (461 - 693)	0.538	0.497-0.580
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.000	0.000-0.372
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.372
Total				0.923	
Genotypes				8	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

Tableau 9.4. Diversité génétique de 3 *S. enterica* Derby d'origine alimentaire cuite obtenue par la technique MLVA utilisant 11 marqueurs.

Locus (alias)	LT2 _position dans le génome _ TR (pb) _ nombre d'unités répétées	Nombre d'allèle	Nombre de répétitions (taille d'allèle en pb)	HGDI ^a	
				Isolats	Intervalle de confiance
				alimentaires cuits (n= 3)	95%
Sal06	LT2_789139_6pb_3U	1	3 (162)	0.000	0.000-0.414
Sal10	LT2_2053093_12pb_3U	1	2 (196)	0.000	0.000-0.414
Sal15	LT2_3067414_12pb_3U	1	3 (201)	0.000	0.000-0.414
Sal20	LT2_4301685_3pb_10U	3	15, 16, 20 (190-205)	1.000	0.310-1.000
Sal23	LT2_4774034_12pb_3U	1	4 (262)	0.000	0.000-0.414
STTR3	LT2_3629458_33pb_14U	2	13, 15 (457 - 523)	0.667	0.311-1.000
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6pb_15U	3	9, 10, 12 (223 - 241)	0.667	0.311-1.000
STTR7	LT2_1039431_39pb_8U	2	7, 9 (555 - 633)	1.000	0.310-1.000
STTR8	LT2_3414008_116pb_7U	2	3,5 (461 - 693)	0.667	0.311-1.000
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7pb_3U	1	3 (191)	0.667	0.311-1.000
TR5 (Sal 22)	LT2_4645085_7pb_3U	1	3 (173)	0.000	0.000-0.414
Total				1.000	
Genotypes				3	

^a Indice de Diversité de Hunter Gaston

6-1-2. Dendrogramme

La méthode des coefficients catégoriel, et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme de répartition phylogénique des 24 souches de sérotype Derby d'origines humaines et alimentaires cuits et crus (Figure. 6-1-2).

Dans ce dendrogramme, les souches de *Salmonella* Derby se sont différenciées en deux branches de complexes clonaux distincts A et B.

La branche A contient 7 souches réparties en quatre complexes de Derby de génotypes 52, 53, 54, et 55. La branche B contient plusieurs complexes clonaux de Derby, dont les clones 68, 69 et 70 sont d'origine humaine. Les autres clones sont d'origine d'aliments cuits et crus.

La répartition des complexes clonaux des deux branches est très homogène. Ce sont les marqueurs Sal06, Sal20, STTR5 qui sont discriminatoires pour les génotypes de Derby.

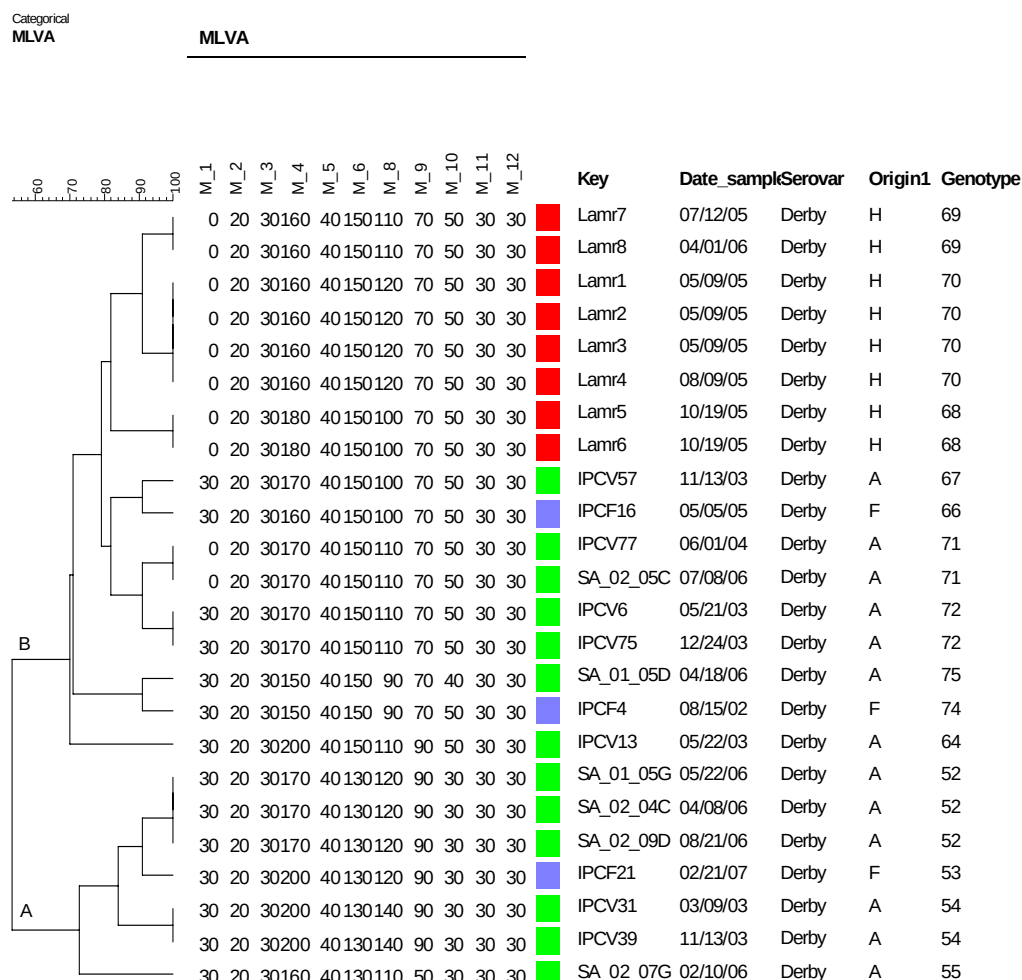


Figure 6-1-2. Distribution phylogénétique des 24 isolats de *Salmonella* Derby en utilisant 11 marqueurs. Les 24 souches sont isolées d'échantillons biologiques alimentaires cuits (F) (collection du laboratoire de microbiologie alimentaire, IPC) et crus (A) (laboratoire de microbiologie alimentaire, IPC, et laboratoire de santé animale, ministère de l'Agriculture, de la Forêt et de la Pêche du Cambodge, 2003-2004, et de l'action de Concertation inter-Pasteurienne, projet poulet, 2006-2007), et humaines (H) (laboratoire de microbiologie médicale, IPC, 2004-2007), L'homme est de couleur rouge. L'animal est de couleur verte. L'aliment est de couleur bleu violet.

6-1-3. Arbre minimum couvrant

La diversité génétique de la population composée par les 24 isolats de Derby d'origine animale, alimentaire et humaine est distribuée en 14 génotypes. La divergence génétique des complexes clonaux de Derby est très variable et ils diffèrent les uns des autres par un à trois loci VNTR ou des marqueurs. Les isolats de *Salmonella* Derby d'origine humaine de génotypes 68, 69, et 70 se sont différenciés du génotype 71 d'origine humaine par un et deux loci. Les souches de *Salmonella* Derby provenant d'aliments cuits de génotype 53, 66 et 74 sont dispersés au sein des complexes clonaux de *Salmonella* Derby d'origine A (différencié entre eux de 1 à 3 loci) ; ceux-ci reflètent une contamination des aliments cuits par des souches issues d'aliments crus et qui, à leur tour contaminent l'homme ; ce phénomène peut aussi exister en sens inverse.

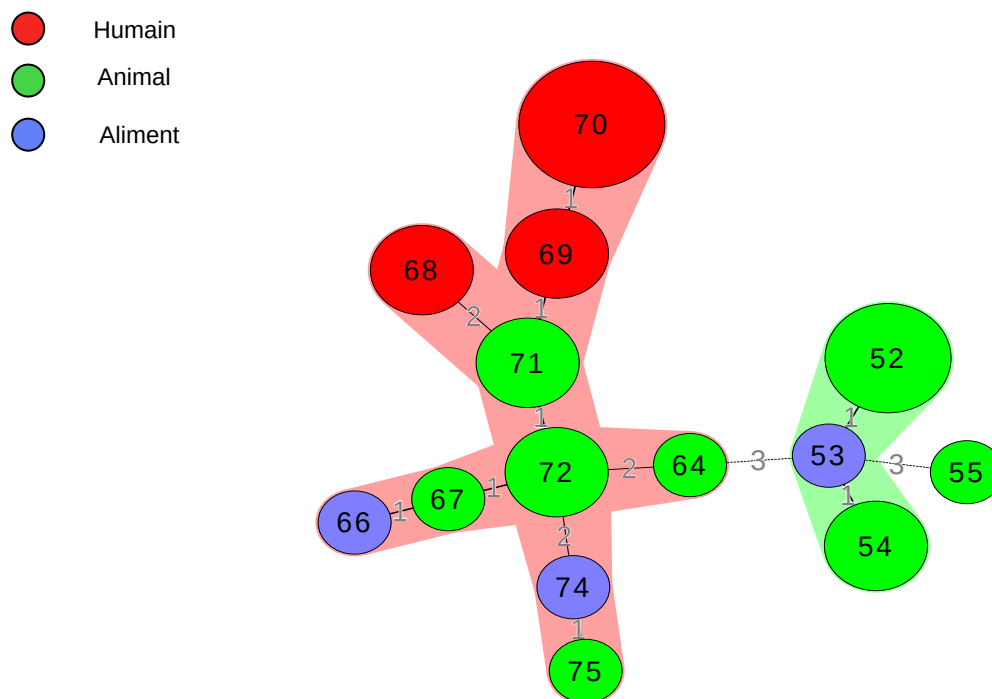


Figure 6-1-3. Arbre minimum couvrant obtenu en utilisant 11 marqueurs représentant le profil de 24 souches de *Salmonella* Derby issues de trois origines H, F et A discriminées en 14 types de MLVA. Le nombre dans chaque cercle indique le génotype.

6-2. Diversité génotypique de *Salmonella enterica* Typhimurium d'échantillons biologiques alimentaires crus et humains (n=10)

6-2-1. Dendrogramme

La méthode des coefficients catégoriels, et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme de répartition phylogénique des 10 souches de *Salmonella* Typhimurium d'origine humaine et animale (Figure 6-2-1). Dans ce dendrogramme, des complexes clonaux de *Salmonella* Typhimurium se sont différenciés en deux branches distinctes A et B.

La branche A contient deux souches de *Salmonella* Typhimurium, de génotype 38 et 39, qui divergent très tôt par rapport aux autres souches, et la branche B contient les cinq autres complexes clonaux de *Salmonella* Typhimurium de génotype 33, 34, 35, 36 et 37. Le complexe clonal 37 groupe deux souches de *Salmonella* Typhimurium dont l'une est origine humaine et l'autre origine alimentaire cru, et toutes les deux sont ACSSuT résistantes.

Seul, le marqueur STTR5 est très discriminant pour toutes les souches de *Salmonella* Typhimurium.

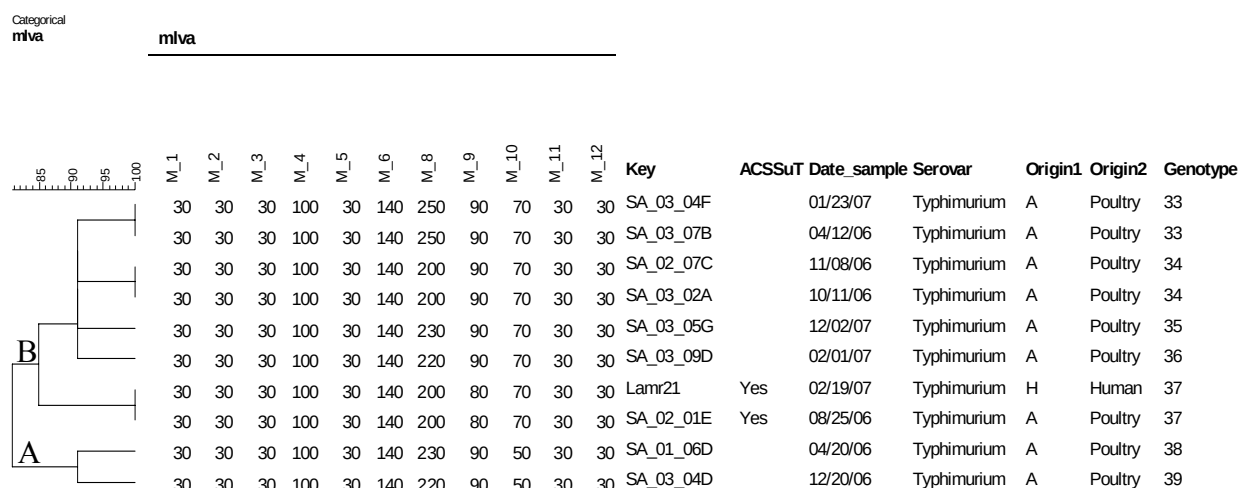


Figure 6-2-1 : Distribution phylogénétique de 10 isolats de *S. enterica* Typhimurium en utilisant 11 marqueurs. Les 10 isolats étudiés sont originaires de l'homme (H) et alimentaires crus (laboratoire de microbiologie médicale, IPC, 2004-2007 et laboratoire de microbiologie alimentaire).

6-2-2. Arbre minimum couvrant

L'étendue de la diversité génétique de la population composée par les 10 isolats de *Salmonella* Typhimurium est répartie en sept génotypes. La divergence génétique des complexes clonaux de *Salmonella* Typhimurium n'est pas très variable et ceux-ci diffèrent les uns des autres par un locus (Figure 6-2-2).

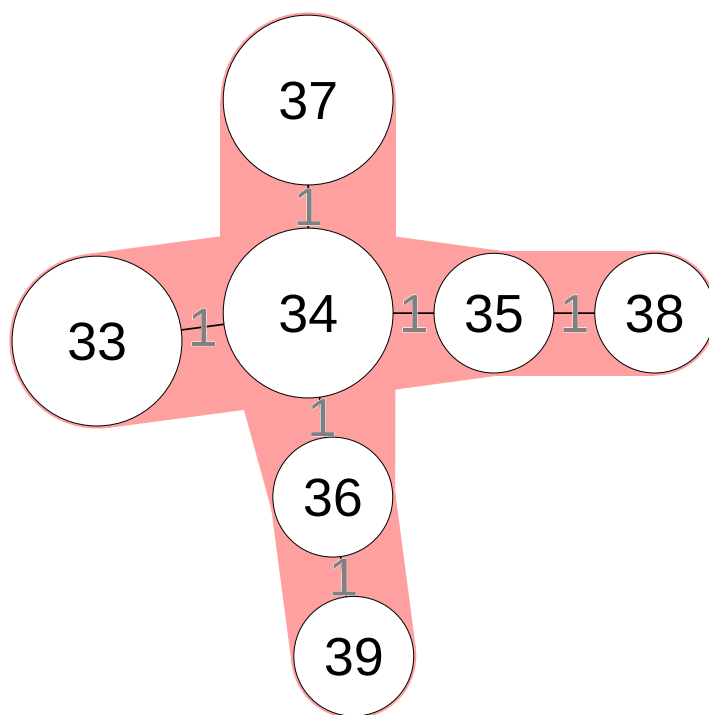


Figure. 6-2-2. Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 10 souches de *S. enterica* Typhimurium. La taille des cercles reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (la ligne épaisse relie les variants différents dans un seul locus). Le nombre dans chaque cercle indique le génotype.

6-3. Diversité génotypique de *Salmonella enterica* Typhi d'échantillons biologique humains (n=29)

6-3-1. Dendrogramme

La méthode de coefficients catégoriels, et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme de répartition phylogénique des 29 souches de *Salmonella* Typhi d'origines humaines (Figure 6-3-1). Dans ce dendrogramme, cinq complexes clonaux de *Salmonella* Typhi sont différenciés en deux branches distinctes A et B.

La branche A contient cinq souches de *Salmonella* Typhi, génotype 107 qui divergent très tôt par rapport aux autres souches, et la branche B contient les quatre autres complexes clonaux de *Salmonella* Typhi génotypes 103, 104, 105, et 106.

Seul, le marqueur STTR5 a un effet discriminatoire pour toutes les souches de *Salmonella* Typhi.

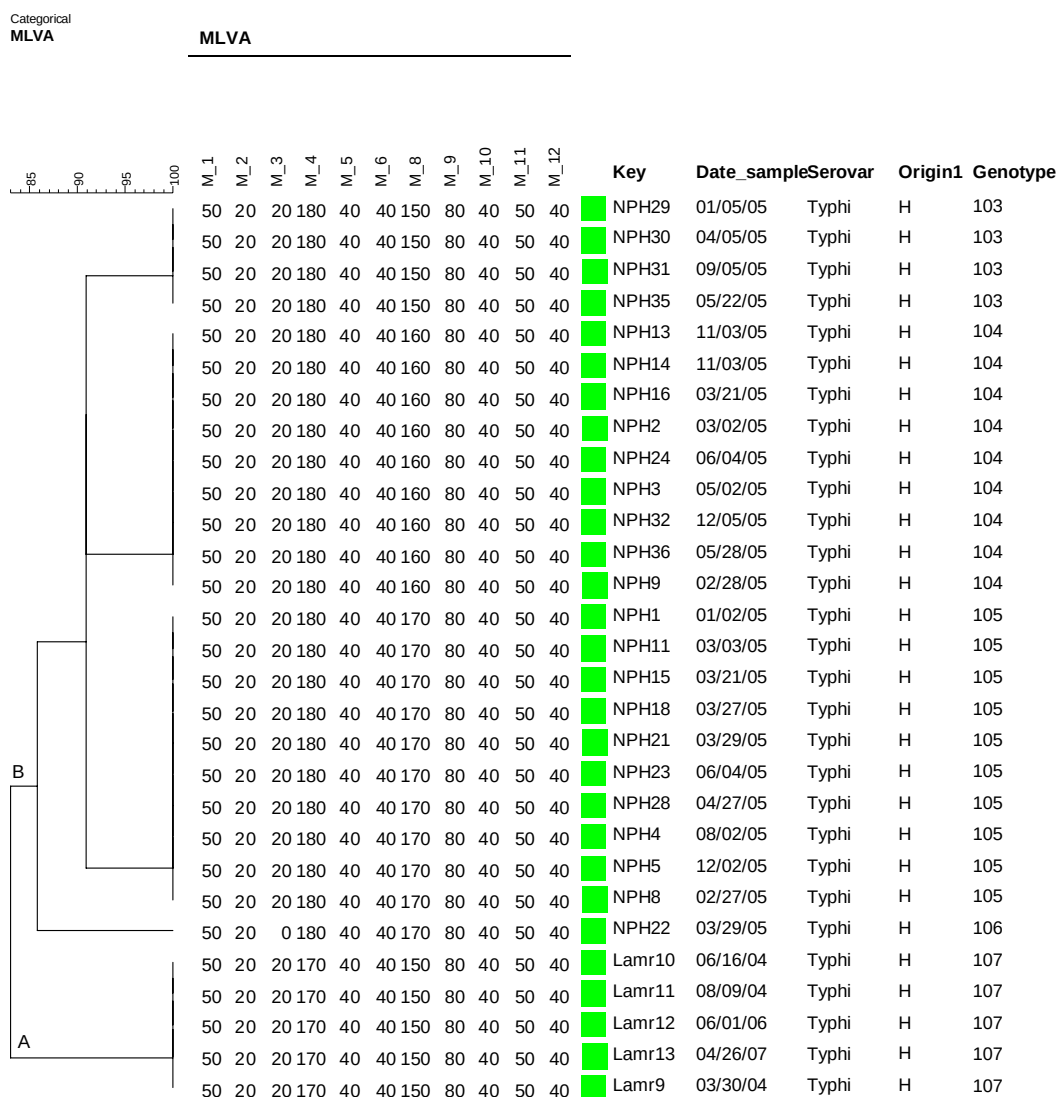


Figure 6-3-1 : Distribution phylogénétique des 29 isolats de *S. enterica* Typhi en fonction des 11 marqueurs. Les 29 isolats étudiés sont originaires de l'homme (H) (laboratoire de microbiologie médicale, IPC, 2004-2007 et laboratoire de l'Hôpital National Pédiatrique, 2005). Les sérotypes sont identifiés par une couleur verte.

6-3-2. Arbre minimum couvrant

L'étendue de la diversité génétique de la population composée par les 29 isolats de *Salmonella* Typhi d'origine humaine est répartie en cinq génotypes. La divergence génétique des complexes clonaux de *Salmonella* Typhi n'est pas très diversifiée et ceux-ci sont différents les uns des autres par un locus (Figure. 6-3-2).

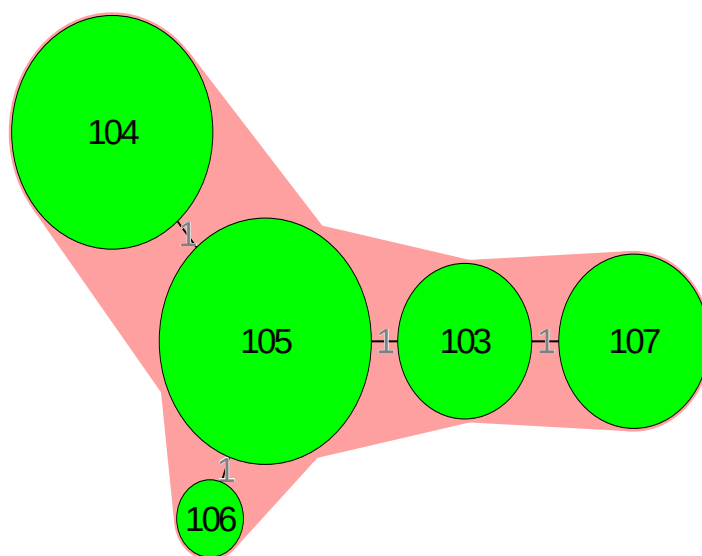


Figure 6-3-2 : Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 11 marqueurs représentant le profil de 29 souches de *S. enterica* Typhi. La construction de MST a été faite en utilisant le coefficient catégoriel. La taille des cercles reflète le nombre d'isolats tandis que la distance entre les cercles représente la divergence génétique (variants différents par un seul locus). Le nombre dans chaque cercle indique le génotype.

7- Comparaison de la diversité génétique d'isolats de *S. enterica* Typhi provenant du Cambodge et d'une étude en France

7-1. Sélection des souches et des marqueurs communs aux deux études

Toutes les souches de *Salmonella* Typhi isolées au Cambodge et d'une étude en France (14) sont regroupées pour produire un dendrogramme utilisant 8 marqueurs en commun : Sal06, Sal10, Sal15, Sal20, Sal23, STTR5, TR1, et TR5 codifiés par BioNumériques sous le nom, M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_8, M_11 et M_12.

7-2. Comparaison des populations de sérotype Typhi provenant des deux études

7-2-1. Dendrogramme

La méthode des coefficients catégoriels, et le groupage des moyennes arithmétiques non pondérées (UPGMA) ont été utilisés pour produire un dendrogramme de répartition phylogénique de 29 souches de *Salmonella* Typhi d'origine humaine cambodgienne sélectionnées à Phnom Penh (nommées C) et de 27 souches étudiées en France (nommées F). Trente génotypes différents ont été obtenus à partir des 56 souches. Le dendrogramme se différencie en deux branches distinctes (Figure 7-2-1) :

- La branche A comprend un seul clone F de génotype 30 qui diverge très tôt par rapport à la branche B.
- La branche B comprend les sous-groupements B1 et B2 ; B1 regroupe toutes les souches C de *Salmonella* Typhi cambodgienne, et B2 toutes les souches F de *Salmonella* Typhi étudiées en France.

Le marqueur STTR5 seul est discriminant pour toutes les souches de *Salmonella* Typhi d'origine C et les marqueurs STTR5 et TR1 sont discriminants pour les souches origine F.

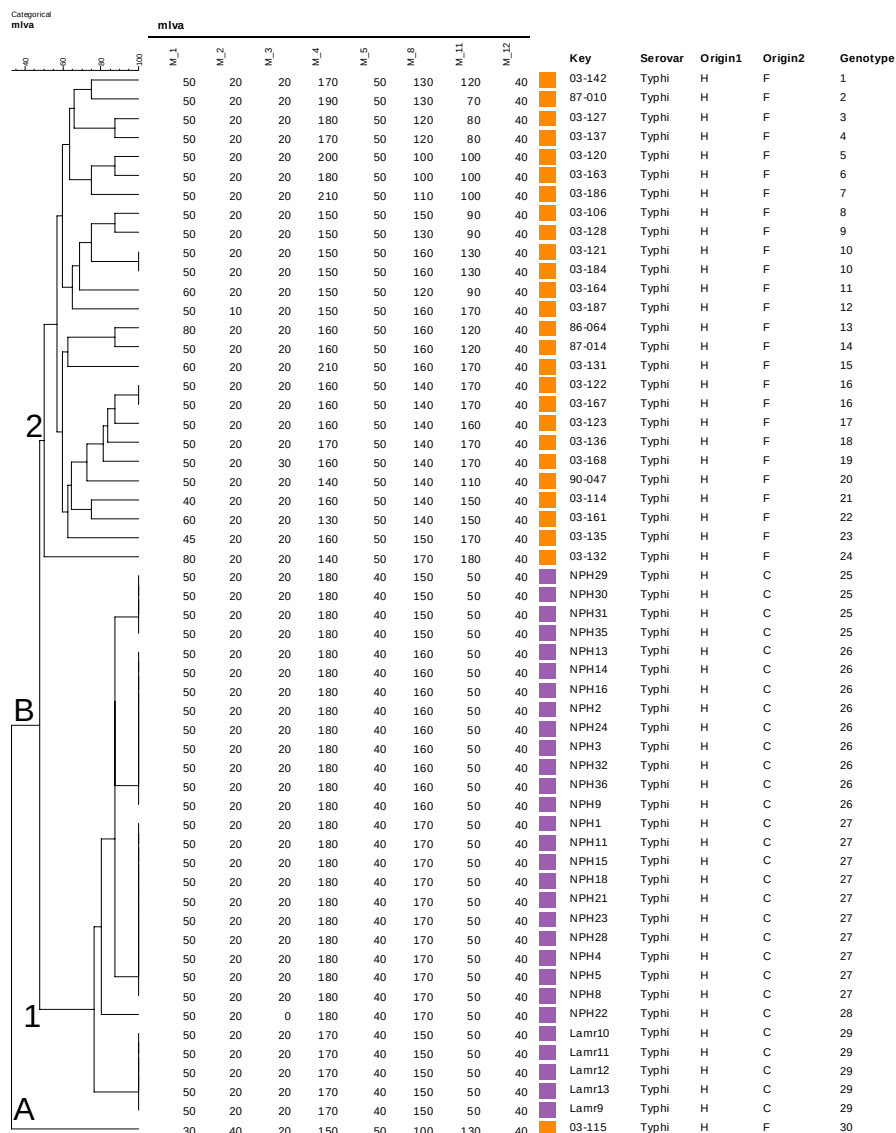


Figure 7-2-1 : Distribution phylogénétique de 56 isolats de *S. enterica* Typhi par MLVA en fonction des 8 marqueurs VNTR. Vingt neuf isolats sont originaires du Cambodge (C) et 27 isolats proviennent d’une étude en France (F). Le regroupement des souches d’origine C est de couleur violette. Le regroupement des souches d’origine F est de couleur jaune foncée.

7-2-2. Arbre minimum couvrant

L’étendue de la diversité génétique de la population composée par les 56 isolats de *Salmonella* Typhi d’origine humaine C et F sont réparties en deux groupement distincts. La divergence génétique des complexes clonaux de *Salmonella* Typhi d’origine C n’est pas très diversifiée et ces complexes sont différents les uns des autres par un seul locus (Figure 7-2-2),

et divergent des complexes clonaux d'origine F de 3 loci. La divergence génétique entre les complexes clonaux de *Salmonella* Typhi d'origine F est très diversifiée, ces complexes sont différenciés les uns des autres de un à trois loci. Les souches d'origine C sont distribuées en 5 génotypes et les souches d'origine F en 25 génotypes.

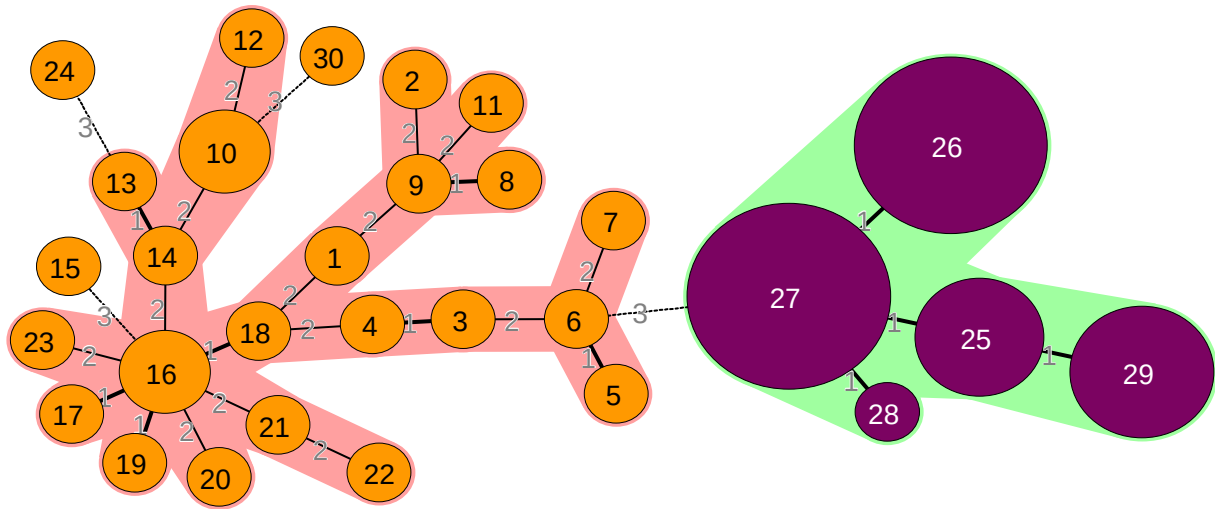


Figure 7-2-2-A

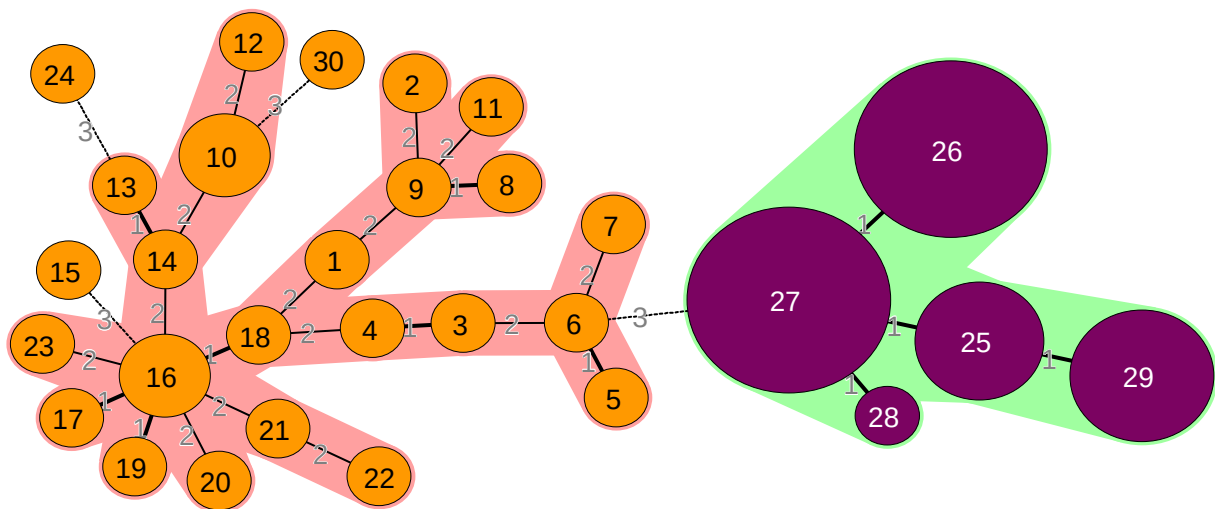


Figure 7-2-2-B

Figure 7-2-2 : A- Arbre minimum couvrant obtenu à l'aide de 8 marqueurs représentant le profil de 56 souches de *S. enterica* Typhi distribuées en 30 génotypes. Le nombre dans chaque cercle indique le génotype. Deux complexe clonaux de Typhi sont différents de deux loci. B- Dans la figure 7-2-2-B- Complexes clonaux de Typhi sont différents de un locus.

Un arbre minimum couvrant a été réalisé. (Figure 7-2-3), de façon à situer les populations de *Salmonella* Typhi par rapport à l'ensemble des autres sérotypes communs aux deux populations (France et Cambodge).

Les deux populations de *Salmonella* Typhi sont groupées chacune sous forme de complexe clonal et sont bien identifiées par rapport à des autres sérovars, quelle que soit l'origine des isolats (France ou Cambodge). Un variant de Newport (origine F) vient grouper avec les population de Derby d'origine C. Deux variants de Virchow viennent grouper avec les variants de Typhimurium d' origine C. La méthode MLVA à partir d' isolat, on peut déterminer l'appartenance à un groupe. La méthode est résolutive, et le niveau de la résolution est adaptable en fonction de l' objectif, soit focalisé sur un sérotype particulier, soit sur une vue plus globale de sérotypes.

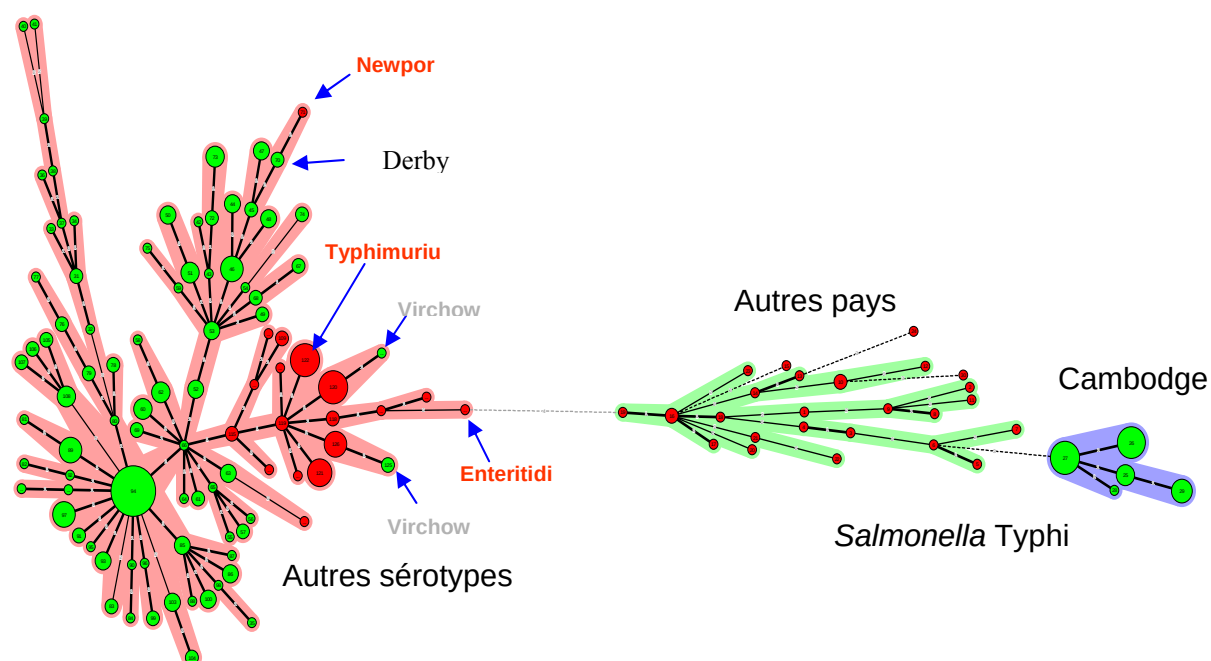


Figure 7 -2 -3 : Arbre minimum couvrant comprenant la totalité des souches de sérotype commun isolées dans les deux études.

DISCUSSION

DISCUSSION

La technique MLVA est une méthode fiable pour le génotypage moléculaire des souches de *S. enterica* ayant causé des salmonelloses chez les humains et les animaux. L'amplification des loci VNTR sélectionnés a été optimisée à partir du génome de la souche de *S. enterica* Typhimurium LT2 de référence. Dans cette étude, elle a été utilisée pour étudier la diversité génétique d'une population de salmonelles isolées en l'absence de situation épidémique connue.

Le présent document rapporte l'étude d'une collection de 206 souches isolées à Phnom Penh, au Cambodge. Les marqueurs MLVA retenus avaient été précédemment décrits pour le typage de seulement six sérotypes de salmonelles (*Salmonella* Anatum, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Paratyphi B, *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Typhimurium) (14, 15, 31). Dans cette étude, 25 autres sérotypes ont été étudiés (*Salmonella* Albany, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Give, *Salmonella* Hvitittingfos, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Itami, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* London, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Poona, *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Sandiego, *Salmonella* Scheissheim, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Weltevreden, *Salmonella* Wansworth et *Salmonella* Monophase 4,5:gft), contribuant à élargir le suivi de la diversité génétique de *S. enterica*. En Asie, ces sérotypes, à l'exception du sérotype Typhi (30), n'avaient encore jamais fait l'objet d'une étude de leur diversité génétique par MLVA.

Le nombre et la diversité des sérotypes étudiés dans ce présent document sont importants en comparaison des études précédentes, qui étaient consacrées à l'étude d'un seul serotype (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Newport) (14, 30, 31, 32) ou de quelques sérotypes (14, 55). Il nous a semblé important de contribuer à définir un panel « universel » de marqueurs capable de différencier les individus d'une population caractérisée par une grande diversité phénotypique.

La reproductibilité et la fiabilité des marqueurs ont été vérifiées par la mesure de la taille des produits d'amplification, par rapport à des souches de référence. En cas de doute, par exemple devant un fragment d'une longueur inattendue, la séquence nucléotidique de ce fragment était amplifiée puis analysée. Cela a permis de valider la présence et le nombre de motifs dans le

fragment amplifié, ou de mettre en évidence des délétions ou des insertions dans un motif. Dans notre étude, le nombre de répétitions est concordant avec des variations alléliques pour les petites unités (< 40 pb). Le marqueur STTR8 a permis de mettre en évidence une insertion de plus de 900 pb dans un motif de 116 pb. D'autres études avaient montré l'existence d'insertions, mais celles-ci étaient localisées soit au début, soit à la fin de la répétition, quel que soit le marqueur utilisé (53). La dispersion des TR au sein du locus STTR8 de *Salmonella* Typhimurium permet de distinguer deux groupes d'isolats. Le premier groupe (deux isolats) comprenait cinq TR (4,9) et le second (huit isolats) en comprenait sept (6,5). Ces résultats confirment les conclusions de deux études rapportées dans la littérature concernant un motif répété de 116 pb décrit avec quatre répétitions (15) ou six répétitions (55).

En ce qui concerne le marqueur STTR4, la séquence du génome de la souche de référence LT2 permet de prédire la présence de deux amplicons comportant 6 TR de 189pb, l'un de 1 138 pb à la position 2630499 et l'autre de 1 831 pb à la position 2629806. La dispersion des allèles pour l'ensemble des souches est telle que ce marqueur est peu polymorphe (7 allèles). L'amplification par PCR produit des fragments d'une taille élevée, supérieure à 1000 pb pour trois sérotypes (*Salmonella* Bovismorbificans, *Salmonella* Itami, et *Salmonella* Ohio). Or la détermination de la séquence de ces grands fragments est plus difficile, car il est nécessaire de synthétiser des amorces à l'intérieur des séquences répétées, ce qui entraîne des amplifications non spécifiques. Ce marqueur a donc été abandonné par la suite, comme l'ont fait d'autres auteurs (15).

Quatre marqueurs (STTR5, STTR3, STTR8 et Sal20) possédaient un pouvoir discriminant élevé pour l'ensemble des souches ($DI > 0,80$) et un nombre élevé d'allèles, respectivement de 17, 12, 9 et 12 allèles. Le pouvoir discriminant des marqueurs Sal06 et Sal10 était moins élevé que dans les études précédentes (12). Les marqueurs TR1 et TR5, contrairement aux études antérieures portant sur *Salmonella* Typhi (12, 28), se sont montrés peu discriminants. Par contre, le marqueur STTR7 a été plus discriminant que décrit précédemment (15). Des résultats identiques ont été observés pour Sal15, TR5 et Sal23, en conformité avec les observations d'autres auteurs (14). L'extension, par rapport aux études précédentes, des sérotypes étudiés, s'est accompagnée d'une augmentation de la variété allélique obtenue pour la plupart des 11 loci VNTR, avec description de nouveaux allèles. Il est remarquable que les marqueurs les plus discriminants soient impliqués soit dans l'interaction hôte-pathogène (antigène de virulence) ou dans l'interaction de l'agent pathogène avec l'environnement (division cellulaire).

La diversité génétique des 206 isolats a été analysée globalement, puis selon l'origine des échantillons ou selon le sérotype. Les sérotypes *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Derby ont fait l'objet d'une analyse détaillée. Pour chaque population ou sous-population étudiée, l'indice de diversité génétique a été calculé. Les diversités génétiques obtenues ont été représentées de manière graphique par un dendrogramme ou un arbre minimum couvrant.

La diversité génétique des isolats des 29 isolats de *Salmonella* Typhi est plus faible que celle rapportée dans d'autres travaux (14, 30, 57). Ceci s'explique probablement par l'origine géographique commune et très localisée de ces isolats, alors que dans les autres études citées, les souches isolées ont des origines géographiques diverses. Les salmonelles typhoïdiques cambodgiennes sont néanmoins génétiquement plus proches des salmonelles typhoïdiques non cambodgiennes que des salmonelles non typhoïdiques. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle la distribution des génotypes obtenus par la technique MLVA reflète de manière exacte la phylogénie des salmonelles.

L'utilisation des 11 marqueurs permet d'observer une très grande diversité génétique des 24 isolats de *Salmonella* Derby ($DI = 0,949$), suggérant une diversification ancienne de ce sérotype. La diversité observée est particulièrement élevée pour les isolats de *Salmonella* Derby provenant d'échantillons alimentaires crus ($DI=0,923$) ou cuits ($DI = 1,000$). Il sera intéressant de suivre l'évolution phénotypique et génotypique de ce sérotype.

Sous l'angle de la génétique des populations, le dendrogramme représentant la diversité génétique des 206 isolats appartenant à 31 sérotypes de *S. enterica* montre une structure clonale (déséquilibre de liaison) (64). Globalement, il existe une bonne concordance entre génotypes et sérotypes.

Pour chaque sérotype, il existe un génotype prédominant (« génotype fondateur ») qui est relié à des génotypes proches (variants à un locus ou à deux loci), l'ensemble constituant un complexe clonal. Le plus souvent, les isolats appartenant à un sérotype particulier sont regroupés au sein d'un même complexe clonal. Cependant, dans certains cas, la diversification ancienne du sérotype a abouti à la formation de complexes clonaux clairement distincts.

L'observation pour certains sérotypes de lignées clonales très divergentes et subdivisées en plusieurs complexes clonaux pourrait être expliquée en partie par la conservation d'un profil antigénique ancestral. Compte-tenu du nombre considérable d'événements mutationnels que nécessiterait la diversification observée, l'hypothèse d'un transfert horizontal est plausible. Une recombinaison de gènes chromosomiques pourrait se produire de manière occasionnelle, sans toutefois entraîner une disparition du déséquilibre de liaison (65). Ainsi, l'hétérogénéité

du dendrogramme reflète la dispersion clonale d'un sérotype donné, prenant l'aspect de branches différentes dans le même groupe (cinq branches pour *Salmonella* Derby, trois branches pour *Salmonella* Stanley, et deux branches pour *Salmonella* Weltevreden. Concernant *Salmonella* Schwarzengrund, la distribution s'est faite en deux sous-groupes différents. L'analyse de la population génétique par la variation allélique dans les gènes de structure chromosomique a montré que les souches de *S. enterica* de même sérotype ont les mêmes génotypes avec une distribution allélique identique ou hétérogène, et dans certains cas, représentent deux ou plusieurs lignées phylogéniques très divergentes, comme cela a été décrit précédemment pour *Salmonella* Derby et *Salmonella* Newport (66).

La dispersion de clones de plusieurs sérotypes de *S. enterica* est en faveur de clones anciens. La population de *Salmonella* Typhi est moins diverse, reflétant un complexe clonal d'apparition plus récente chez l'homme. Cependant, il se pourrait que ces souches de *Salmonella* Typhi proviennent de collections d'isolats à partir d'une zone géographique limitée, Phnom Penh au Cambodge, alors que dans d'autres études les isolats ont été choisis parmi différents pays ou dans le monde entier (14, 30, 57). La différence de dispersion hétérogène du sérotype *Salmonella* Typhi donne une indication sur le choix des VNTR en fonction de la population étudiée. Dans une population homogène, comprenant seulement quelques sérotypes (30, 32), les loci VNTR les plus discriminants doivent être utilisés, alors que dans une population très diversifiée en sérotypes, des marqueurs VNTR moins discriminants peuvent être utilisés. Dans le cas de cette étude, le panel des 11 marqueurs sélectionnés, dont le pouvoir discriminant est variable, représente un compromis acceptable pour l'étude de la diversité génétique d'isolats obtenus dans un contexte épidémique (nécessité de marqueurs très discriminants) ou pour réaliser des études « macroépidémiologiques ».

Le choix des marqueurs en fonction de l'origine géographique et du portage des souches, est illustré par la comparaison des isolats de *Salmonella* Typhi décrits dans cette étude (C) avec des isolats d'origine humaine, d'origines géographiques très diverses, rapportés dans une étude française antérieure (F) (14). Nous avons pour cela sélectionné les 8 marqueurs communs aux deux études. La différence de diversité génétique entre les deux groupes est telle que la technique MLVA produit un génotype pour deux isolats F et un génotype pour trois isoalts C. En d'autres termes, la diversité génétique des salmonelles typhoïdiques cambodgiennes est beaucoup plus faible que celle des salmonelles typhoïdiques étudiées en France (mais d'origines diverses). Cette dispersion de génotypes reflète l'évolution des

souches de *S. enterica* qui suivent leur adaptation à l'hôte (65) et qui sont générées dans la population ayant une structure clonale. Ainsi, le choix des marqueurs est important en fonction du lieu géographique, de la concordance épidémiologique et du pouvoir discriminant des marqueurs (3).

Dans notre étude, l'arbre minimum couvrant représente la population des isolats étudiés en fonction de la distance génétique inter-isolats et du nombre d'isolats. Il permet de visualiser des types MLVA hypothétiques, qui correspondent à des liaisons manquantes entre les complexes clonaux au sein de l'arbre minimum couvrant (14). La dispersion génétique présentant plus de deux loci permet de conclure également à une distribution clonale de la population de *Salmonella*. L'arbre minimum couvrant a permis de comparer le complexe clonal de différents sérotypes et la source (homme, aliment cuit ou cru). Pour les mêmes sérotypes, des génotypes différents peuvent être associés soit dans un complexe clonal, comme pour le sérotype Enteritidis (56), soit dans un complexe clonal plus diversifié (sérotype Typhimurium)(67).

Toutefois, quatre des onze marqueurs étudiés ont présenté un intérêt pour leur pouvoir discriminant et doivent être testés dans d'autres études. Le choix des marqueurs dépendra de l'objectif de l'étude mais surtout de l'origine restreinte ou dispersée (pays ou continent) des isolats, comme cela a été montré pour les isolats de *Salmonella* Typhi (14, 30, 57).

La diversité des génotypes évaluée par le rapport entre le nombre de génotypes et le nombre d'isolats en fonction des origines (H, A, F) est, en ordre décroissant, plus importante dans la population des isolats issus d'aliments cuits (un génotype pour un isolat) que dans celles isolées chez l'animal (un génotype pour deux isolats) ou que dans celles isolées chez l'homme (un génotype pour neuf isolats). Cet effet est peut être dû à la longue période de recueil des isolats provenant d'aliments cuits (2001-2007), d'aliments crus (2003 -2007) et des isolats humains (2004-2007), ainsi qu'à des pressions de sélection différentes ou à une adaptation des isolats à un environnement particulier ou à l'adaptation récente d'un sérotype à un nouvel hôte.

La résistance à ACSSuT n'a pas d'effet sur le typage moléculaire de *S. enterica* par la technique MLVA (12). Les marqueurs MLVA ont été choisis parmi les loci ne contenant pas de gène de résistance aux antibiotiques, on peut en déduire qu'il n'y a pas d'ingérence de la réaction croisée entre un marqueur et le gène de résistance à ACSSuT dans le génome.

Les prochaines études pourraient être orientées sur un choix différent de population bactérienne, en particulier en introduisant plus d'isolats d'origine humaine. L'étude pourrait être orientée également sur la sélection d'une population d'isolats de même sérotype, comme par exemple *Salmonella* Derby ou *Salmonella* Weltevreden, mais d'origines différentes.

La population des isolats de *Salmonella* Typhi a été sélectionnée à Phnom Penh uniquement. Il serait intéressant d'étendre l'étude à la totalité du Cambodge pour mettre en évidence une éventuelle diversification génétique au niveau national de ce sérotype.

La dispersion de génotypes de *Salmonella* d'origine animale et provenant d'aliments cuits est très diversifiée par rapport aux isolats humains. L'absence des sérotypes *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium chez l'homme peut refléter un biais de sélection, avec une surreprésentation des isolats animaux. En outre, une différence de trois loci dans le complexe clonal de *Salmonella* Weltevreden peut signer un chaînon manquant dans la population sélectionnée. Toutefois, dans cette population, deux isolats de sérotypes différents et ayant le même génotype n'ont jamais été retrouvés dans cette étude par la technique MLVA.

L'hypothèse que « *Salmonella* Typhimurium cause des épidémies d'origine alimentaire » a été testée par la technique MLVA et l'inclusion des isolats responsables de l'épidémie a été basée sur différents critères : l'existence d'un groupe de cinq isolats de sérotypes pratiquement identiques, un délai de quatre semaines pour la sélection des isolats ; la spécification de l'origine (de l'homme sain ou malade, et de l'aliment) (56, 67). Dans la présente étude, plusieurs complexes clonaux (*Salmonella* Anatum, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhi, et *Salmonella* Schwarzengrund) répondent à ces critères et pourraient ainsi refléter la diffusion endémo-épidémique d'un sérotype de génotype particulier.

Il serait intéressant d'étudier, dans une situation micro-épidémique ou macro-épidémique impliquant une surveillance par MLVA, des sérotypes souvent à l'origine d'une salmonellose avec une transmission de l'homme à l'animal ou par l'intermédiaire d'aliments (54,66).

CONCLUSION -PERSPECTIVES

CONCLUSION -PERSPECTIVES

En conclusion, l'analyse par la technique MLVA utilisant l'électrophorèse en gel d'agarose est une technique simple, rapide et puissante pour l'analyse génotypique d'isolats de *S. enterica* humains ou provenant d'aliments cuits ou crus.

Les 11 marqueurs utilisés dans cette étude ont permis d'obtenir 107 génotypes à partir de 206 isolats de 31 sérotypes différents de *S. enterica*. Cependant, au moins quatre des onze marqueurs étudiés présentent un intérêt pour leur pouvoir discriminant particulièrement élevé et devraient être utilisés dans les études ultérieures.

A l'avenir, il serait intéressant de développer la technique MLVA pour suivre l'évolution des souches les plus virulentes, responsables au Cambodge de la typhoïde chez l'homme et des salmonelloses mineures chez l'homme ou l'animal (*Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Stanley, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Weltevreden...).

Les avantages de la technique MLVA permettent d'investir tous les champs de l'épidémiologie : identification de l'origine d'une contamination, étude des liens entre le génotype et le sérotype ou d'autres caractères phénotypiques (comme la résistance aux antibiotiques), étude du profil génétique de la structure des populations des micro-organismes. Une caractéristique majeure du MLVA est que son coût total (équipement, consommables, expertise) est suffisamment faible pour permettre d'envisager désormais le typage systématique des isolats recueillis.

Il nous semble important d'assurer la faisabilité de cette technique au Cambodge dans un laboratoire de typage moléculaire utilisant la technique MLVA permettant à la fois d'analyser le polymorphisme des séquences répétées en tandem des principales bactéries (salmonelles, entérobactéries, et non entérobactéries) et de diffuser cette nouvelle technologie dans ce pays au sein de la communauté des bactériologistes, apportant aux cliniciens et aux épidémiologistes un outil précieux applicable aux traitements des malades et aux enquêtes communautaires et hospitalières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Statistique national de santé, Ministère de santé du Cambodge, 2010.
2. Kruiy SL, Yith VT, Ping Song, Khem P, JL SARTHOU. Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. In retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. J Vet Med Scien.19/10/2010.
3. Vergnaud G, and Pourcel C. (2009). Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. Methods Mol Biol. 551:141-158.
4. Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H et al. (1996). Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*saiD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. Mol Microbiol. 20:1211-1220.
5. Jordan P, Snyder LA, and Saunders NJ. (2003). Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp. BMC Microbiol. 3:23.
6. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L et al. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 1:2.
7. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E et al. (2003). DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O 157 based on Multiple-Locus variable number tandem-repeats analysis (MLVA). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2:12.
8. van Belkum A, Scherer S, van Leeuwen W et al. (1997). Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. Infect Immun. 65:5017-5027.
9. Pourcel C, Vidgop Y, Ramiisse F et al. (2003). Characterization of tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. J Clin Microbiol. 41:1819-1826.
10. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF et al. (2002). Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiol. 148:519-528.
11. Liao JC, Li CC, and Chiou CS. (2006). Use of a multilocus variable-number tandem repeat analysis method for molecular subtyping and phylogenetic analysis of *Neisseria meningitidis* isolates. BMC Microbiol. 6:44.
12. Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J et al. (2006). Comparison for PCR-based methods of typing *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol. 44:3804-3807.
13. Koeck JL, Njanpop-Lafourcade BM, Cade S et al. (2005). Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. BMC Microbiol. 5: 66.
14. Ramiisse V, Houssou P, Hernandez E, et al. (2004). Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp *enterica* for typing purpose. J Clin Microbiol. 42:5722-5730.
15. Lindstedt BA, Heir H, Gjernes E et al. (2003). DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem loci. J Clin Microbiol. 41:1469-1479.
16. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L et al. (2004). Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. J Microbiol Methods. 59:163-172.
17. Adair DM, Worsham PL, Hill KK, Klevytska AM, Jackson PJ, Friedlander AM, and Keim P. (2000). Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J Clin Microbiol. 38(4): 1516-1519.
18. Denœud F, and Vergnaud G. (2004). Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. BMC Bioinformatics. 5: 1471-2105.
19. Bricker BJ, Ewalt DR, and Halling SM. (2003). *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol. 11; 3: 15.

20. Popoff MY. (2007). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 9th edition WHO collaborating centre for collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France.
21. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D et al. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 18(10): 1624-1637.
22. Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, and Strockbine NA. (1999). *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover FC (Ed.). *Man Clinic Microbiol* 1st Ed. Am Soc Microbiol . 459-474.
23. Kim S, Kim SH, Park JH, Lee KS, Park MS, and Lee BK. (2009). Clustering analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates in Korea by PFGE, ribotyping, and phage typing. *Foodborne Pathog Dis.* 6(6): 733-738.
24. Hulton CS, Higgins CF and Sharp PM. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol.* 5:825-834.
25. Lan R, Davison AM, Reeves PR, and Ward LR. (2003). AFLP analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates of phage types DT 9 and DT 135: diversity within phage types and its epidemiological significance. *Microbes and Infection.* 5: 841-850.
26. Nath G, Maurya P, and Gulati AK. (2010). Eric-PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades. *Infect Genet Evol.* 10 (4): 530-536.
27. Refsum T, Heir E, Kapperud G, Vardund T, and Holstad G. (2002). Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. *Applied Env Microbiol.* 68:5600-5606.
28. Koh-Luar SI, Chew ST, Lau E, and Chua SB. (1996). Short Communication: Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of *Salmonella* organisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 12: 405-407.
29. Hughes L, Wigley P, Bennett M, Chantrey J, and Williams N. (2010). Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain. *Lett Appl Microbiol.* 51(4): 477-479.
30. Liu Y, Lee MA, Ooi EE, Mavis Y, Tan AL, and Quek HH. (2003). Molecular Typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats. *J Clin Microbiol.* 41:4388-4394.
31. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J, and Bartkus JM. (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol.* 45:536- 543.
32. Davis MA, Baker KNK, Call DR et al. (2009). Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing *Salmonella enterica* serovar Newport. *J Clin Microbiol* 47:1934-1938.
33. Bouvet P. *Salmonella* : Biochimie, Cours International de Microbiologie et Maîtrise de la Sécurité des Aliments, Institut Pasteur de Lille, 27/05/2002.
34. http://www.associatedcontent.com/article/40834/your_health_salmonella.html.
35. Euzeby JP. (2005). *Salmonella* nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html//contents>
36. Verhoye A. *Salmonella* : technique de recherches, Cours International de Microbiologie et Maîtrises de la Sécurité des Aliments, Institut Pasteur de Lille, 27/05/2003.
37. Kam KM. Public Health Laboratory Centre, Centre for Health Protection, Department of Health, Hong Kong. WHO Global Salm Surv, Workshop, Bangkok, January 15, 2007.
38. Maiden, MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and Spratt BG.(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.
39. Bergeron N, Corriveau J, Letellier A, Daigle F, Quessy S. (2010). Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates associated with septicemia in swine.. *The C J of V Research*. 74: 11-17.
 40. Eisgruber H, Wiedmann M, and Stolle A. (1995). Use of plasmid profiling as a typing method for epidemiologically related *Clostridium perfringens* isolates from food poisoning cases and outbreaks. *Letter Appli Microbiol*. 20(5):290-294.
 41. Towbin H, Staehelin T, and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(9):4350-4.
 42. Williams RJ. (2003). Restriction endonucleases: classification, properties, and applications. *Mol Biotechnol*. 23(3):225-243.
 43. Bide P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, and Petit JC. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiol Lett*. 175 (2): 261-266.
 44. Williams JGK (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*.18: 6531-6535.
 45. Dauga C, Zabrovskaja A, and Grimont PAD.(1998). Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol*. 36: 2835-2843.
 46. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 23: 4407-4414.
 47. Lai E, Birren BW, Clark SM, Simon MI, and Hood L. (1989). Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques*. 7: 34-42.
 48. Herschleb J, Ananiev G, and Schwartz DC. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*. 2: 677-684.
 49. Threlfall EJ, Frost JA, Ward LR, and Rowe B. (1990). Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 19 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations. *Epidemiol Infect*. 104:243-251.
 50. Kotetishvili M, Colin Stine O, Kreger A, Glenn Morris J, and Sulakvelidze A. (2002). Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. *J Clin Microbiol*. 40(5): 1626-1635.
 51. Hilton AC, Banks JG, and Penn CW. (1996). Amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J Applied Bacteriol*. 81: 575-584.
 52. Selander RK, Beltran P, Smith NH, Backer RM, Crichton PB, Old D, Musser JM, et Whittam TS. (1990). Genetic population structure, clonal phylogeny, and pathogenicity of *Salmonella* Paratyphi B. *Infect Immun*. 58: 1891-1901.
 53. Murase T, Okitsu T et al. (1995). Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbio Immunol*. 39(9): 673-676.
 54. Shah SA, and Romick TL.(1997). Subspecies differentiation of *Salmonella* by PCR-RFLP of the ribosomal operon using universal primers. *Lett Applied Microbiol*. 25: 54-60.
 55. Witonski D, Stefanova R, Ranganathan A, Schutze GE, Eisinach KD, and Cave MD. (2006). Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport. *J Clin Microbiol*. 44:3849-3854.
 56. Malorny B, Junker E, and Helmuth R. (2008). Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *BMC Microbiol*. 8:84.

57. Octavia S, and Lan R. (2009). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Clin Microbiol.* 47:2369-2376.
58. Kruij SL, van Cuyck H, and Koeck JL. (2010). Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis.* (manuscript accepted 18, 10, 2010).
59. Yazdankhah, SP, and Lindstedt BA. (2007). Variable number tandem repeat typing of bacteria. *Methods Mol Biol.* 396:395-406. Kauffmann F. (1972). *Serological Diagnosis Species*, Munksgaard, Copenhagen.
60. Le Minor L, and Popoff MY. (1987). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 146 pages, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris. France.
61. Popoff MY, and Minor L. (1997). Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*, 151 pages, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris. France.
62. **NCCLS.** 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolates from animal; approved standard, 2nd ed. M31-A2. NCCLS, Wayne, PA.
63. Torres RDC, Oletta CA, and Zlotnik H. (1996). A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *Nocardia* spp. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3: 601-604.
64. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, and Bulling E. (1985). Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun.* 48: 175-182.
65. DuBose RF, Dykhuizen DE, Hartl DL. (1988). Genetic exchange among natural isolates of bacteria: recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 7036-7040.
66. Beltran P, Musser JM, Helmuth R, Farmer JJ, Frerichs WM, Wachsmuth K, Ferri K, McWhorter AC, Wells JC, Cravioto A, and Selander RK. (1988). Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: Genetic diversity and relationships among strains of serotypes *Salmonella enterica* Choleraesuis, *Salmonella enterica* Derby, *Salmonella enterica* Dublin, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Infantis, *Salmonella enterica* Newport, and *Salmonella enterica* Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 7753-7757.
67. Torpdahl M, Sørensen G, Ethelberg S et al. (2008). A regional outbreak of *Salmonella* Typhimurium in Denmark and identification of the source using MLVA typing. *Euro Surv.* 11: 134-136.

ANNEXES

ANNEXE 1

Epidémiologie des souches

N°	Code laboratoire	Sérotype	Résistance	Date de prélèvement	Origine 1	Origine 2
1	SA_01_03C	Albany	ACSSuT	31/03/2006	A (Animal)	Poulet cru
2	SA_01_08G	Albany	ACSSuT	29/05/2006	A	Poulet cru
3	SA_01_09D	Albany	ACSSuT	21/04/2006	A	Poulet cru
4	SA_02_01A	Albany	ACSSuT	07/03/2006	A	Poulet cru
5	SA_02_02A	Albany		07/03/2006	A	Poulet cru
6	IPCV4	Anatum		16/05/2003	A	Porc/boeuf
7	IPCV5	Anatum		21/05/2003	A	Porc/bœuf
8	SA_01_04D	Anatum		12/04/2006	A	Poulet cru
9	SA_01_09B	Anatum		29/03/2006	A	Poulet cru
10	IPCV80	Anatum		06/01/2004	A	Porc/boeuf
11	SA_01_08I	Anatum		29/06/2006	A	Poulet cru
12	SA_01_06G	Anatum		02/10/2006	A	Poulet cru
13	SA_03_05F	Anatum	ACSSuT	26/01/2007	A	Poulet cru
14	IPVV26	Anatum		08/05/2003	A	Porc/bœuf
15	IPCV38	Anatum		13/11/2003	A	Porc/bœuf
16	IPCV45	Anatum		13/11/2003	A	Porc/bœuf
17	IPCV58	Anatum		12/02/2003	A	Porc/bœuf
18	IPCV61	Anatum		12/12/2003	A	Porc/bœuf
19	IPCV9	Anatum		23/01/2003	A	Porc/boeuf
20	SA_03_02F	Anatum		23/01/2007	A	Poulet cru
21	SA_01_01H	Bovismorbifican		31/05/2006	A	Poulet cru
22	SA_02_05E	Bovismorbifican		28/08/2006	A	Poulet cru
23	SA_03_08E	Bovismorbifican		16/01/2007	A	Poulet cru
24	SA_02_03D	Braenderup		08/11/2006	A	Poulet cru
25	SA_02_06F	Braenderup		09/11/2006	A	Poulet cru
26	SA_03_05A	Braenderup		13/11/2006	A	Poulet cru
27	SA_03_08A	Braenderup		20/11/2006	A	Poulet cru
28	SA_02_01C	Braenderup		31/07/2007	A	Poulet cru
29	SA_01_04G	Corvallis		19/05/2006	A	Poulet cru
30	SA_01_07C	Corvallis		04/06/2006	A	Poulet cru
31	SA_01_04E	Corvallis		28/08/2006	A	Poulet cru
32	SA_03_04C	Corvallis		12/07/2006	A	Poulet cru

33	SA_03_06D	Corvallis		29/12/2006	A	Poulet cru
34	IPCV65	Corvallis		12/02/2003	A	Porc/bœuf
35	SA_01_02D	Corvallis		04/10/2006	A	Poulet cru
36	SA_03_07G	Corvallis		16/02/2006	A	Poulet cru
37	SA_01_05G	Derby		22/05/2006	A	Poulet cru
38	SA_02_04C	Derby		08/04/2006	A	Poulet cru
39	SA_02_09D	Derby		21/08/2006	A	Poulet cru
40	IPCV31	Derby		09/03/2006	A	Porc/bœuf
41	IPCV39	Derby		13/11/2003	A	Porc/bœuf
42	SA_02_07G	Derby		10/02/2006	A	Poulet cru
43	IPCV77	Derby		01/06/2004	A	Porc/bœuf
44	SA_02_05C	Derby	ACSSuT	08/07/2003	A	Poulet cru
45	IPCV6	Derby		21/05/2003	A	Porc/bœuf
46	IPCV75	Derby		24/12/2003	A	Porc/bœuf
47	IPCV57	Derby		13/11/2003	A	Porc/bœuf
48	IPCV13	Derby		22/05/2003	A	Porc/bœuf
49	SA_01_05D	Derby		18/04/2006	A	Poulet cru
50	SA_02_02I	Enteritidis		03/01/2006	A	Poulet cru
51	SA_01_03I	Enteritidis		20/06/2003	A	Poulet cru
52	SA_02_05H	Enteritidis		19/10/2006	A	Poulet cru
53	SA_02_09F	Enteritidis		10/09/2006	A	Poulet cru
54	SA_02_09G	Enteritidis		10/02/2006	A	Poulet cru
55	SA_03_02D	Enteritidis		13/12/2006	A	Poulet cru
56	SA_03_03G	Enteritidis		02/07/2007	A	Poulet cru
57	SA_01_02A	Enteritidis	ACSSuT	13/12/2007	A	Poulet cru
58	SA_03_05D	Enteritidis		29/12/2006	A	Poulet cru
59	SA_03_06C	Enteritidis		13/12/2007	A	Poulet cru
60	SA_03_02C	Enteritidis		12/07/2006	A	Poulet cru
61	SA_01_09F	Hvittingfos		05/11/2006	A	Poulet cru
62	SA_01_03F	Hvittingfos		05/11/2006	A	Poulet cru
63	SA_02_04D	Hvittingfos		05/02/2006	A	Poulet cru
64	SA_03_08D	Hvittingfos		16/08/2005	A	Poulet cru
65	SA_03_09B	Hvittingfos		01/02/2007	A	Poulet cru
66	SA_03_01D	Indiana	ACSSuT	18/12/2006	A	Poulet cru
67	SA_03_04E	Indiana	ACSSuT	01/09/2007	A	Poulet cru
68	SA_03_09E	Indiana	ACSSuT	18/01/2007	A	Poulet cru
69	SA_01_01B	Itami		17/03/2006	A	Poulet cru
70	SA_02_07E	Itami		30/08/2006	A	Poulet cru
71	SA_01_02C	Itami		29/03/2006	A	Poulet cru
72	SA_01_02F	Itami		09/04/2006	A	Poulet cru
73	SA_01_01F	Itami		09/04/2006	A	Poulet cru

74	SA_01_02I	Itami		20/06/2006	A	Poulet cru
75	SA_01_01C	Kentucky		29/03/2006	A	Poulet cru
76	SA_01_01G	Kentucky		18/05/2006	A	Poulet cru
77	SA_01_07G	Lexington		26/05/2006	A	Poulet cru
78	SA_02_03I	Lexington		20/10/2006	A	Poulet cru
79	SA_02_03I	Lexington		14/07/2006	A	Poulet cru
80	SA_02_01A	London		29/06/2006	A	Poulet cru
81	SA_02_01H	London		10/05/2006	A	Poulet cru
82	SA_03_08G	London		21/02/2007	A	Poulet cru
83	IPCV11	Monophase 4,5 : gft		22/05/2003	A	Porc/bœuf
84	IPCV19	Monophase 4,5 : gft		07/01/2003	A	Porc/bœuf
85	SA_02_09E	Newport		09/01/2006	A	Poulet cru
86	SA_03_03A	Newport		11/10/2006	A	Poulet cru
87	SA_01_01E	Newport		21/04/2006	A	Poulet cru
88	SA_01_03E	Newport		24/04/2006	A	Poulet cru
89	SA_03_05C	Newport		12/12/2006	A	Poulet cru
90	SA_02_01G	Ohio		14/09/2006	A	Poulet cru
91	SA_02_07I	Ohio		11/02/2006	A	Poulet cru
92	SA_02_09I	Ohio		11/02/2006	A	Poulet cru
93	SA_01_09C	Ohio		04/07/2006	A	Poulet cru
94	SA_03_01B	Paratyphi B		24/11/2006	A	Poulet cru
95	SA_02_06I	Rissen		27/10/2006	A	Poulet cru
96	SA_02_09H	Rissen		16/10/2006	A	Poulet cru
97	SA_03_08B	Rissen		12/04/2005	A	Poulet cru
98	SA_01_06A	Sandiego		03/06/2006	A	Poulet cru
99	SA_02_03C	Schleissheim		08/02/2007	A	Poulet cru
100	SA_03_06B	Schleissheim		30/11/2006	A	Poulet cru
101	SA_03_09A	Schleissheim		20/11//2006	A	Poulet cru
102	SA_03_02B	Schleissheim		27/11/2006	A	Poulet cru
103	SA_03_07D	Schleissheim		01/02/2007	A	Poulet cru
104	IPCV25	Schwarzengrund		08/05/2003	A	Porc/bœuf
105	IPCV27	Schwarzengrund		08/05/2003	A	Porc/bœuf
106	IPCV28	Schwarzengrund		08/05/2003	A	Porc/bœuf
107	IPC51	Schwarzengrund		13/11/2003	A	Porc/bœuf
108	IPCV78	Schwarzengrund		13/11/2003	A	Porc/bœuf
109	IPCV79	Schwarzengrund		01/06/2004	A	Porc/bœuf
110	IPCV43	Schwarzengrund		13/11/2003	A	Porc/bœuf
111	IPCV24	Schwarzengrund		08/05/2003	A	Porc/bœuf
112	SA_02_09C	Stanley		08/11/2006	A	Poulet cru
113	SA_03_03B	Stanley		27/11/2006	A	Poulet cru
114	SA_03_09F	Stanley		02/01/2007	A	Poulet cru

115	SA_01_08F	Stanley		05/10/2006	A	Poulet cru
116	SA_03_04F	Typhimurium		23/01/2007	A	Poulet cru
117	SA_03_07B	Typhimurium		12/04/2006	A	Poulet cru
118	SA_02_07C	Typhimurium		08/11/2006	A	Poulet cru
119	SA_03_02A	Typhimurium		11/10/2006	A	Poulet cru
120	SA_03_05G	Typhimurium		02/12/2007	A	Poulet cru
121	SA_03_09D	Typhimurium		01/02/2006	A	Poulet cru
122	SA_02_01E	Typhimurium	ACSSuT	25/08/2006	A	Poulet cru
123	SA_01_06D	Typhimurium		20/04/2006	A	Poulet cru
124	SA_03_04D	Typhimurium		20/12/2006	A	Poulet cru
125	SA_01_02E	Virchow		24/04/2006	A	Poulet cru
126	SA_02_06D	Virchow		21/08/2006	A	Poulet cru
127	SA_02_02B	Virchow		17/07/2006	A	Poulet cru
128	SA_01_06F	Weltevreden		05/05/2006	A	Poulet cru
129	SA_03_04B	Weltevreden		30/11/2006	A	Poulet cru
130	SA_03_07E	Weltevreden		16/01/2007	A	Poulet cru
131	SA_01_04B	Weltevreden		22/03/2006	A	Poulet cru
132	SA_03_02G	Weltevreden		02/07/2007	A	Poulet cru
133	SA_02_04F	Wansworth		09/07/2006	A	Poulet cru
134	Lamr14	Choleraesuis	ACSSuT	30/11/2004	H (Human)	Coproculture
135	Lamr15	Choleraesuis	ACSSuT	21/01/2005	H	Coproculture
136	Lamr16	Choleraesuis	ACSSuT	27/07/2006	H	Coproculture
137	Lamr17	Choleraesuis	ACSSuT	13/10/2006	H	Coproculture
138	Lamr18	Choleraesuis	ACSSuT	04/02/2007	H	Coproculture
139	Lamr21	Choleraesuis		19/02/2007	H	Coproculture
140	Lamr1	Derby	ACSSuT	09/05/2005	H	Coproculture
141	Lamr2	Derby	ACSSuT	09/05/2005	H	Coproculture
142	Lamr3	Derby	ACSSuT	09/05/2005	H	Coproculture
143	Lamr4	Derby	ACSSuT	09/08/2005	H	Coproculture
144	Lamr5	Derby	ACSSuT	19/10/2005	H	Coproculture
145	Lamr6	Derby	ACSSuT	19/10/2005	H	Coproculture
146	Lamr7	Derby	ACSSuT	12/07/2005	H	Coproculture
147	Lamr8	Derby	ACSSuT	01/04/2006	H	Coproculture
148	NPH39	Stanley	ACSSuT	06/05/2005	H	Hémoculture
149	NPH64	Stanley	ACSSuT	15/08/2005	H	Hémoculture
150	Lam21	Typhimurium		19/02/2004	H	Coproculture
151	Lamr9	Typhi		30/03/2004	H	Hémoculture
152	Lamr10	Typhi		16/06/2004	H	Hémoculture
153	Lamr11	Typhi		09/08/2004	H	Hémoculture
154	Lamr12	Typhi		01/06/2006	H	Hémoculture
155	Lamr13	Typhi		26/04/2007	H	Hémoculture

156	NPH1	Typhi		02/01/2005	H	Hémoculture
157	NPH2	Typhi		02/03/2005	H	Hémoculture
158	NPH3	Typhi		02/05/2005	H	Hémoculture
159	NPH4	Typhi		02/08/2005	H	Hémoculture
160	NPH8	Typhi		27/02/2005	H	Hémoculture
161	NPH9	Typhi		28/02/2005	H	Hémoculture
162	NPH11	Typhi		03/03/2005	H	Hémoculture
163	NPH13	Typhi		03/11/2005	H	Hémoculture
164	NPH14	Typhi		03/11/2005	H	Hémoculture
165	NPH15	Typhi		21/03/2005	H	Hémoculture
166	NPH16	Typhi		21/03/2005	H	Hémoculture
167	NPH18	Typhi		27/03/2005	H	Hémoculture
168	NPH21	Typhi		29/03/2005	H	Hémoculture
169	NPH22	Typhi		29/03/2005	H	Hémoculture
170	NPH23	Typhi		04/06/2005	H	Hémoculture
171	NPH24	Typhi		04/06/2005	H	Hémoculture
172	NPH28	Typhi		27/04/2005	H	Hémoculture
173	NPH29	Typhi		05/01/2005	H	Hémoculture
174	NPH30	Typhi		05/04/2005	H	Hémoculture
175	NPH31	Typhi		05/09/2005	H	Hémoculture
176	NPH32	Typhi		05/12/2005	H	Hémoculture
177	NPH35	Typhi		22/05/2005	H	Hémoculture
178	NPH36	Typhi		28/05/2005	H	Hémoculture
179	IPCF10	Anatum		07/01/2003	F(Food)	Poulet cuit
180	IPCF1	Braenderup		19/06/2001	F	Chocolat
181	IPCF14	Braenderup		11/04/2004	F	Poisson cuit
182	IPCF2	Cholerasuis		03/05/2002	F	Plat cuisiné
183	IPCF3	Corvallis		16/07/2002	F	Plat cuisiné
184	IPCF4	Derby		15/08/2002	F	Poisson cuit
185	IPCF16	Derby		05/05/2005	F	Mousse de Strawberry
186	IPCF21	Derby		21/02/2007	F	Plat cuisiné
187	IPCF18	Give		22/12/2005	F	Poulet cuit
188	IPCF24	Hvittingfoss		07/09/2007	F	Eau de forage
189	IPCF32	Hvittingfoss		30/08/2007	F	Poisson fermenté
190	IPCF33	Hvittingfoss		30/08/2007	F	Poisson fumé
191	IPCF8	Lexington		04/01/2003	F	Viande de boeuf
192	IPCF25	Lexington		07/07/2007	F	Chair de crabe
193	IPCF30	Lexington		24/08/2007	F	Crevette congelée
194	IPCF22	London		22/02/2007	F	Soupe de poulet
195	IPCF12	Mbandaka		05/04/2004	F	Riz cantonais

196	IPCF27	Newport		18/07/2007	F	Chair de crabe
197	IPCF34	Newport		09/07/2007	F	Viande de boeuf
198	IPCF37	Newport		23/10/2007	F	Poisson séché
199	IPCF17	ParatyphiB		22/06/2005	F	Canard cuit
200	IPCF9	Poona		04/01/2003	F	Viande de boeuf
201	IPCF7	Scheissheim		10/01/2002	F	Plat cuisiné
202	IPCF19	Schwarzengrund		22/12/2005	F	Poulet cuit
203	IPCF20	Weltevreden		03/05/2006	F	Poisson congelé
204	IPCF23	Weltevreden		25/06/2007	F	Sol
205	IPCF36	Weltevreden		25/06/2007	F	Poisson cuit
206	IPCF39	Weltevreden		25/06/2007	F	Poisson fermenté

ANNEXE 2

Bilan de résultats de séquençage								
	Marqueurs	Alias PCR	Sérotype et code laboratoire	Fragment attendus (pb) sur LT2	Fragment sur gel (pb)	Résultats de séquence	nombre TR	TR (pb)
1	Sal06_162pb_6pb_3U	166	Derby SA_02_04C	162	162	> 166_SAL06L -- 7..142 of sequence AGATGGTGTCTTAGAGTATTAAAGTAAATTGATTTAACTCGTCATGTA ATATTAGTGATGAGATTGAAATTGATATATCAAAAATAAAATTTGGAT ATATCTATGTGGAGTGGCAATCAGACGAAGAAGGCTGTT	3	TGAGAT
2	“	165	Derby SA_02_09D	162	162	> 165_SAL06L -- 6..144 of sequence AGAGATGGTGTCTTAGAGTATTAAAGTAAATTGATTTAACTCGTCAT GTAATATTAGTGATGAGATTGAAATTGATATATCAAAAATAAAATTTG GATATATCTATGTGGAGTGGCAATCAGACGAAGAAGTTGGTT	3	“
3	Sal15_201pb-12pb-3U	8	Lexington IPCF8	201	189	> 8_SAL15L -- 10..163 of sequence GCTGACGGGTTGATTTGCGGCGCTTGTTGCGGCGTCGCGCCATTTTG GCGGCGGTGTGATCAACATCCCAGGAATTGGTATTTGATGACGACCCAC TGTCACAGACGTACCGGCGCCGAGGGTTTGACGAACTGGTACAAC CTGCACACT	2	TTGCGGCGCTTG
4	“	185	Lexington SA_02_07A	201	189	> 185_SAL15L -- 9..168 of sequence AGCTGTACGGGTTGATTTGCGGCGCTTGTTGCGGCGTCGCGCCATTTT TGCGGCGGTGTGATCAACATCCCAGGAATTGGTATTTGATGACGACCC ACTGTCCACAGACGTACCGGCGCCGAGGGTTTGACGAACTGGTACA ACCTGCCAATCAGGG	2	“
5	Sal20_175pb_3pb-10U	31	Monophage 4,5 :gft IPCV11	175	184	> 31_Sal20-L -- 16..170 of sequence CGCAGACACGCCAGCAAACGCTACAGCGCCAGCGTCAGGCGCAGCA GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTGGGCTCAAACGCAGCCTGTTC AGCAACCACGCACGCAGCCGCGGGTAAACGAACAGCCGCAAACGCGC ACGGTACAGTCAAG	13	CTG
6	“	33	Monophage 4,5 :gft IPCV19	175	184	> 33_Sal20-L -- 422..469 of sequence CAATACATGTAATTTTAAACAGTGTAATAATCATTATATTTCACTACC	13	“
7	“	203	Schleissheim SA_03_02B	175	175	> 203_Sal20-L -- 60..177 of sequence CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGTGGACTCAAACGCA	10	“

						GCCTGTTTCAGCAACCACGCACGCAGCCGCGGGTAAACGAACAGCCGC AAACGCGCACGGTACAGTTATCGG		
8	STTR3_490pb_ 33pb_14U	145	Enteritidis SA_02_09F	490	407.5	> 145_STTR3L -- 10..403 of sequence GATCCGCCCCACGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCACCCGACGAT AGCGGCGATGACGATGTAACCCGCCCCGACGATAGCGGCGATGACGA TGTAACCCCGCCTGATGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCGCCCCGA CGATAGCGGCGATGACGATGTGACCCGCCCCGACGATAGCGGCGATG ACGATGTGACCCCGCCTGACGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCGCG CCGACGATAGCGGCGATGACGATGTGACCCGCCCCGATGATAGCGGCG ATGACGATGTAACCCGCCCCGATGATAGCGGCGATGACGACGACACGC CCCCAGATGACTCTGTTATTACCTTCAGCAACGGCGTCAACGTTTGAAG CTGTGCGAGGTCCCCCTAAGCCCGATAATGG	10.5	CGATGTGACCCC GCCCCGACGATAG CGGCGATGA
9	‘’	146	Enteritidis SA_02_09G	490	407.5	> 146_STTR3L -- 14..389 of sequence GCCGACGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCACCCGACGATAGCGG CGATGACGATGTAACCCGCCCCGACGATAGCGGCGATGACGATGTAAC CCCGCCTGATGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCGCCCCGACGATAG CGGCGATGACGATGTGACCCGCCCCGACGATAGCGGCGATGACGATGT GACCCCGCCTGACGATAGCGGCGATGACGATGTAACCCGCCCCGACGA TAGCGGCGATGACGATGTGACCCGCCCCGATGATAGCGGCGATGACGA TGTAACCCGCCCCGATGATAGCGGCGATGACGACGACACGCCCCCAGA TGACTCTGTTATTACCTTCAGCAACGGCGTCAAAGAGGCTG	10.5	‘’

10	STTR4_ 1138pb_189pb_ 6U and STTR4_1831_1 89-6U	70	Derby Lam3	1138	1043.5	> 70_STTR4-L -- 13..1006 of sequence TTACCGTCTGCGTCCAGCACCAGCGTGGCGTTATTGTCTACCAGACCGG TGCCACGCGCGTCTGTAATGGCGGCGACACGCGTACCCTCATTGATGG TGGTGGCGCGCGTGTAGTCGTTGTGCGCGGAGAGGATCAGCGTGCCTG CGCCTTCTTTGGTACGCGATTTACCGTCCCATCTGCTACCCGGATCCAG CGTGTCATCAACGTCGTGTCAGTGTAGCCGCAACGTTAAAGCTGCCGTC AGGGTCGCTCAGGGTAAAGGTGCCGTGGGCGTCGGTAGTGGCGTTGTC TCTGTCCGCATACCAGGAGAGGGAGGCCGTCAGATCATAGTTGGTGTT GTCCGTTTCATCGACTTTTCCGTCGATAGTCAGGAAGTCAACATCTTCG CGGTTTCATCCCTGCAATGGTTCAGATCGTCGAAATCGCTCGTAATGGCG CTGTGCTGTTAATCAGCGTGTAAGTGATGCCTCAGGCGTCCAA CTGTCTGTAACGCTGCCGATGCCGTAACATTCAGCGTGCCGCCAGC GTGACGCTGTCGGCGATAATGGCGCTTTCACCGTTGGCCTTACTGAGGT CAATATTCAGCGTACTATCGGCTTGCTGAGTCAGCGAGTCGACGTTGA GCGTTGTACCTTTGGCCAGCTCAGTCGTTGCTCCAGACTGGGTCGTGAC ATTCGCAAGGTTGAATTCGCCCTCCGCGTCCAGCTTCAGCGTACCCGCG TTATAGACATCACCGCCGCCAGCGCGTTAACGTTGGCAGCAATCAGC ACACCGTCGTCAATGGTGGTGCCACCGGAGTAAGTGTTATCACCGCTT AACGTCAGCTCGCCCGTACCGGTTTTACCAGCGAACCGCTGCCGGAG AGCGTATTTCCAGTTCGCCCTCGCCGACCTGAAGCACACCGCTGTTGG CAATAGTCCCGTCCCCAGCGAATCCGCATGGTCAGCCGTCAGC GTACCGCCGAAATAGTGGTGCCGCCGAGTAAT	5.5	ACCGCTGTGGC AACAGCGCCGCT ACCCAGCGAATC CGCATGGTCAGC CGTCAGCGTACC GCCGATAATGGT GGTGCCGCCGGA GTAAGTGTATC GCCGCTTAACGT CAGCTCGCCGCT ACCGGTTTTGAC CAGCGAACCGCT GCCGAAAGCGT ATTTTCAGCTC GCCCTCGCCGAC CTGAAGCAC
11	“	71	Derby Lam4	1138	1043.5	> 71_STTR4-L -- 217..450 of sequence CGCAGCCGAGTATCAACAGCCGAGCAGCCGGTAGCGCCGAGCCACAGTATCA GCAGCCGAGCCGAGTATCAGCAGCCGAGCAACCGACAGCGCCGCAAGACAGC CTGATCCACCCGCTGTTGATGCGTAACGGCGACAGTCGTCCATTACAGCGTCCGA CGACGCCGCTGCCCTTCGTTAGATCTTTTGACGCCGCCGCGAGCGAAAGTTGAACC GGTAGATACCTCCC	5.5	“
12	“	164	Derby SA_01_05G	1138	1138	> 164_STTR4-L -- 22..979 of sequence ATCCAGCATCAGCGTACTGCTGTTGTGCGATATTGCCGCTGCCAGCGCG TTGACGTTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTCGCGCATGGTGGTATCGCCG GAGTAAGTGTTGTTGTCCCGCTTAACGTCAGCTCGCCCGTACCGGTTT TCACCAGCGAACCCTGCGGAAAGCGTATTTTCAGCTCGCCCTCGC CAACCTTAAGCACGCCGCTGTTGTGATATCGCCGCTGCCAGCGCGTT GACGCTGGCGCAATCAGCGTACCGCCGGAATAGTGGTGCCGCCG AGTAAGTGTTATCGCCGCTTAACGTCAGCTCGCCCGTACCGGTTTTAC CAGCGAGCCGCTGCCGAAAAGCGTATTTTCAGCTCGCCCTCGCCAAC CTGAAGCACGCCGCTGTTGTGATATCGCCGCTGCCAGCGCGTTGAC GCTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTCGGAATAGTGGTGCCGCCGAGTA ATCGTTATCGCCGTTAACGTCAGCTCGCCCGTGCCGATTTTGACCAGC GAACCGGTGCCGAAAAGCGTATTTTCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGA AGCACGCCGCTGTTATCGATAGCGCCAGTGCCAGCGAATCCGCATGG TTAGCAATCAGCGTACCGTCGGAATAGTGGTGCCGCCGAGTAATCG TTATCGCCGTTTAACGTCAGCTCGCCCGTGCCGATTTTACCAGCGAAC CGGTGCCGAAAAGCGTATTTTCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGAAGCA CGCCGCTGTTGTGATATCGCCGCTGCCAGTGAATCCGCATTGTACG AATCAGCACACCGCTCGTCAATGGTGGTGCCGCCGAGTAATCGTTATC	6	“

						GCCGTTTAACGTCAGTTCGCCGTACCCGGTTTTACCAGCGAACCAGTG CCGGAAAGCGTATTTTCCAGCTCGCCCTCGCCCACTTAG		
13	“	165	Derby SA_02_04C	1138	1138	> 165_STTR4-L -- 56..922 of sequence TGCCGGTGCCAGCGCGTTGACGTTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTGCGCGATGGT GGTATCGCCGGAGTAAGTGTGTTGTCCCGCTTAACGTCAGCTCGCCCGTACCG GTTTTACCAGCGAACCCTGCCGAAAGCGTATTTTTCAGCTCGCCCTCGCCAA CCTTAAGCAGCGCTGTTGTCGATATCGCCGCTGCCAGCGGTTGACGCTGGC GGCAATCAGCGTACCGCCGAAATAGTGGTGCCGCCGGAGTAAGTGTATCGCCG CTTAACGTCAGCTCGCCGTACCGGTTTTGACCAGCGAGCCGCTGCCGAAAGCG TATTTTTCAGCTCGCCCTCGCCAACCTGAAGCAGCGCGCTGTTGTCGATATCGCC GCTGCCAGCGGTTGACGCTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTGCGAAATAGTGGTG CCGCCGGAGTAATCGTTATCGCCGTTTAACTCAGCTCGCCCGTGCCGATTTTCA CCAGCGAACCAGTGCCGAAAGCGTATTTTTCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGAAG CACGCCGCTGTTATCGATAGCGCAGTGCCAGCGAATCCGCATGGTTAGCAATC AGCGTACCGTCGGAAATAGTGGTGCCGCCGGAGTAATCGTTATCGCCGTTTAAAG TCAGCTCGCCCGTGCCGATTTTTCAGCGAACCAGTGCCGAAAGCGTATTTT TCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGAAGCAGCGCGCTGTTGTCGATATCGCCGCTGCC CAGTGAATCCGCATTGTCAGCAATCAGCACACCGTCGTCAATGGTGGTGCCGCCG GAGTAATCGTTATCGCCGTTTAACTCAGTTCGCCGTACCCC	6	“
14	“	178	London SA_02_01A	1138	1138	> 178_STTR4-L -- 162..183 of sequence CCGTGGTCGTGGTCGGGAGGAT	6	“
15	“	201	Wansworth SA_02_04F	1138	382	> 201_STTR4-L -- 10..345 of sequence GCGTTGGCGTCCAGCATCAGCGTACCGCTGTTGTCGATATTGCCGTGCCAGCG CGTTGACGTTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTCAAGTATAGTGGTGCGCGCGAATA GCTGTTGTCGCCGCTTAACGTCAGCTCGCCGCTACCGGTTTTACCAGCGAGCCG CTGCCGAAAGCGTATTTTCCAGCTCGCCTTCGCCGACCTGAAGCAGCGCGCTGT TATCGATAGCGCAGTGCCAGCGAATCCGCATGGTTAGCAATCAGCGTACCGTC GGAAATAGTGGTGCCGCCGCTATAGTCATTAGCGCCGGTCACGATCAGCTCATCG TCACGC	2	“
16	“	203	Schleissheim SA_03_02B	1138	1138	> 203_STTR4-L -- 279..615 of sequence TCAGCACACCGTCGTCAATGGTGCGCCGGAGTAACCTGTTATCGC CGCTTAACGTCAGTTCGCCGTACCGGTTTTGACCAGCGAACCCTGCG GGAAAGCGTATTTTCCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGAAGCACACCGCG TTGGCAACAGCTCCGGTACCCAGCGAATCCGCATGGTCAGCCGTCAGC GTACCGCCGATAATGGTGGTGCCGCCGGAGTAACCTGTTATCGCCGCTT AACGTCAGTTCGCCGTACCGGTTTTGACCAGCGAACCCTGCGCGGA AAGCGTATTTTCCAGCTCGCCCTCGCCGACCTGAAGCAGCCGCTCT	6	“
17	“	188	Ohio SA_02_01G	1138	1831	> 188L_STTR4L -- 29..938 of sequence AGCACAGCGTGCGATTATTGTCTACCAGACCGGTGCCAGCGCCGTGCTACTGG CGGCGACCAGCGTACCTTCATTGATGGTGGTGCCGCCGCTGTAGTCGTTGTCGCC AGAGAGGATCAGCGTGCCCTGCGCCTTCTTTGGTCAGCGATTTACCGTCCCATCTG CTACCCGGATCCAGCGTATCGTCAACGCTGTGTCAGTGTAGCCGCAACGTTAAAGC TGCCGTACGGGTCGCTCAGGGTAAAGGTGCCGTGGGCGTCGGTAGTGGCGTTGTC TCTGTCCGCATACCAGGAGAGGGAGGCCGTAGATCATAGTGGGTGTTGTCTGCT TCATCGACTTTTCCGTCGATAGTCAGGAAGTCAACATCTTCGCGGTTTATCCCTG	9	“

						CAATGGTCAGATCGTCGAAATCGCTCGTAATGGCGCTGTCGCTGTCAATCAGCGT GTAGGTGTATGCCCTCAGGCGTCCAGCTGTCTGTAACATTACCGAT ACCGCT GATG TTGAGCGTGCCGCCAGCGTGACGCTGTACGCGGTAATGGCGCTTTACCGTTGG CCTTACTGAGGTCAATATTCAGCGTACTATCGGCTTGCTGAGTCAGCGAGTCGAC GTTGAGCGTCGTACCTCTGGCCAGCTCAGTCGTTGCTCCAGACTGGGTCTGTACA TTCGCAAGGTTGAATTCGCCCTCCGCGTCCAGCATCAGCGT ACCGCT GTTGTGCGA TATTGCCGCTGCCAGCGGTTGACGTTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTCAGTGAT AGTGGTGCGCCGGAATAGCTGTTATCGCCGCTTAACGTCAGCTCGCCGTAACG GTTTTACACAGCGAACCGCTGCCGAAAGCGTATTTCCAGCTCGCCCTGCCGGA CCTGAAGCACGCCGCTGTTAGCGATAGCGC		
18	“	192	Bovismorbifi cans SA_02_05E	1138	1831	> 192L_STTR4L -- 25..985 of sequence TCAGCACACAGCGTGGCATTATTGTCTACCAGACCGGTGCCAGCGCCG TCGTACTGGCGGCGACCAGCGTACCTTCATTGATGGTGGTGCCGCCG TGTAAGTCGTTGTCGCCAGAGAGGATCAGCGTGCCCTGCGCCTTCTTTGGT CAGCGATTTACCGTCCCATCTGCTACCCGGATCCAGCGTATCGTCAACG TCTGTCAGTGTAGCCGCAACGTTAAAGCTGCCGTACGGGTCGCTCAGG GTAAAGGTGCCGTGGGCGTCGGTAGTGGCGTTGTCTCTGTCCGCATAC CAGGAGAGGGAGGCCGTACATCAGTGGGTGTTGTCTGCTTCATCG ACTTTCCGTCGATAGTCAGAAAGTCAACATCTTCGCGGTTTCATCCCTG CAATGGTCAGATCGTCGAAATCGCTCGTAATGGCGCTGTCGCTGTCAA TCAGCGTATAGGTGTATGCCTCAGGCGTCCAGCTGTCTGTAACGCTGCC GATGCCGTAACATTCAGAGTGCCGCCAGCGTGACGCTGTCGGCGGT AATGGCGCTTTCACCGTTGGCCTTACTGAGGTCAATATTCAGCGTACTA TCGGCTTGCTGAGTCAGCGAGTCGACGTTGAGCGTCGTACCTCTGGCCAGCT CAGTCGTTGCTCCAGACTGGGTCGTGACATTGCAAGGTTGAATTCGCCCTCCGC GTCCAGCATCAGCGTACCGCTGTTGTGATATTGCCGCTGCCAGCGCGTTGACG TTGGCGGCAATCAGCGTGCCGTACGTGATAGTGGTGGCGCCGGAATAGCTGTTGT CGCCGCTTAACGTCAGCTCGCCGTACCGGTTTTACACGCG	9	“
19	“	204	Itami SA_02_07E	1138	1831	> 214L_STTR4L -- 28..933 of sequence AGCACACAGCGTGGCGTTATTGTGTCGACCAGGCCGGTGCCAGCGCCGTC GTACTGGCGGCGACCAGCGTACCTTCATTGATGGTGGTGCCGCCGCTG TAGTCGTTGTCGCCGAGAGGATCAGCGTGCCCTGCGTCTCTTTGGTCA GCGATTTACCGTCCCATGTGCTATTCGGATCAAGCGTGTCGTCAACGTC TGTCAGATTAGCCGCAACGTTAAAGCTGCCGTACGGGTCGCTAAGG GTAAAGGTACCGTGAGCGTCGGTAGAAGCGTTGTCTCTGTCCGCATAC CAGGAGAGGGAGGCCGTACATCAGTGGGTGTTGTCTGCTTCGTCG ACTTTCCGTCGATAGTCAGGAAGTCAACATCTTCTATTCAATCCCG CGACGGTCAGATTGTGCGAAATCGCTGGTAATGGCGCTGTCACTGTCAA TCAGCGTGTAGGTGTATGCCTCAGGCGTCCAGCTGTCTGTAACGCTG CCGATGCCGCTGACGTTACGCGTGCCGCCAGCGTGACGCTGTCGGCG GTAATGGCGCTTTCACCGTTGGCCTTACTGAGGTCAATATTCAGCGTAC TATCGGCTTGCTGAGTCAGCGAGTCGACGTTGAGCGTCGTACCTTTGGC CAGCTCAGTCGTTGCTCCAGACTGGGTTGTGACATTGCAAGGTTGAA TTCGCCCTCCGCGTCCAGCTTCAGCGTACCCGTGTTATCGACATCA CCGCCGCCAGCGCGTTAACGTTGGTGGCAATCAGCACACCGTCGTCA ATAGTGGTGCCGCTGGAGTAAAGTGTGTCGCCGCTTAACGTCAGCTCG CCCGTACCGGTTTTACACAGCAAACCGTGCCGGAAGGGTGTTC AGCTCGCCTTCGCCACCTGAAGTACGCCGCTGTTGGCATAA	9	“

20	“	206	Itami SA_02_01F	1138	1831	> 206L_STTR4L -- 16..985 of sequence GTCCCATCTGCGTCAGCACCAGCGTGGCGTTATTGTGCGACCAGGCCGGTGCCAG CGCCGTCGTA CTGGCGGCGACCAGCGTACCTTCATTGATGGTGGTGCCGCCGCTG TAGTCGTTGTGCGCGGAGAGGATCAGCGTGCCTGCGTCTTCTTTGGTCAGCGATT TACCGTCCCATGTGCTATTTCGGATCAAGCGTGTGCTCAACGCTGTGTCAGATTAGC CGCAACGTTAAAGCTGCCGTGAGGGTTCGTAAGGGTAAAGGTACCGTGAGCGTCG GTAGAAGCGTTGTCTCTGTCCGCATACCAGGAGAGGGAGGCCGTCAGATCATAGT GGGTGTTGTCTGCTTCGTCGACTTTTCCGTCGATAGTCAGGAAGTCAACATCTTC TCTATTCATTCCCGCGACGGTCAGATTGTGAAATCGCTGGTAATGGCGCTGTCA CTGTCAATCAGCGTGTAGGTGTATGCCTCAGGCGTCCAGCTGTCTGTAACGCTGC CGATGCCGGTGACGTTACGCGTGCCGCCAGCGTGACGCTGTGCGCGGTAATGGC GCTTTACCGTTGGCCTTACTGAGGTCAATATTACGCGTACTATCGGCTTGCTGA GTCAGCGAGTCGACGTTGAGCGTCGTACCTTTGGCCAGCTCAGTCGTTGCTCCAG ACTGGGTTGTGACATTCGCAAGGTTGAATTCGCCCTCCGCGTCCAGCTTCAGCGT ACCCGTGTTATCGACATACCCGCCGCCAGCGCGTTAACGTTGGTGGCAATCAGC ACACCGTCGTCAATAGTGGTGCCGCCGAGTAAGTGTTGTGCGCGCTTAACGTC GCTCGCCGTACCGGTTTTACCAGCAA ACCGCT GCCGGAAGGGTGTTCAG CTCGCCTTCGCCACCTGAAGTACGCCGCTGTTGGCAATAACGCCAGTGCCAGC GAATCCGCATGGTCAGCCGTCAGCGTACCGCCGGT	9	“
21	STTR5_259pb_6pb_15U	22	Schleissheim IPCF7	259	241	> 22_STTR5L -- 10..225 of sequence ACCATCAGCACCAGCACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCA TGACCATGACCATGACCATCATGGTCACATACATCCGGAAGGTGCAACGTCAAAA GCGTATCAGGATGCCATGAACGCGCCCATGCTGCCGATATTCAACGCCGTTTTG ATGGTCAAAACAGTGACTAATGGACAGATCCTGCTATTGCGCCTGACCCAAA	12	ACCACG
22	“	23	Paratyphi B IPCF17	259	271	> 23_STTR5-L -- 17..253 of sequence ATCAGCACCACGACCACGGCCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGA CCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATCAT GGTCACATACATCCGGAAGGCGCAACGTCAAAAGCGTATCAGGATGCCATGAAC GCGCCCATGCTGCCGATATTCAACGCCGTTTTGATGGTCAAACAGTGACTAATGG ACAGATCCTGCTATCGG Pas de séquence consensus ; séquence incomplète		ACCACG
23	“	200	Schleissheim SA_02_02B	259	241	Séquençage n'a pas réussi		ACCACG
24	“	203	Schleissheim SA_02_02B	259	235	> 203_STTR5-L -- 17..192 of sequence TTACGACCACGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGGCCATCATGGTCAC ATACATCCGGAAGGTGCAACGTCAAAAGCGTATCAGGATGCCATGAACGCGCCC ATGCTGCCGATATTCAACGCCGTTTTGATGGTCAAACAGTGACTAATGGACAGAT CCTGCTATCCG	11	ACCACG
25	“	202 SA_01_06B	Paratyphi B SA_03_01B	259	247	> 202_STTR5L -- 9..222 of sequence TCATCAGCACCACGACCACGGCCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCAT GACCATGACCATGACCATCATGGTCACATACATCCGGAAGGCGCAACGTCAAAAG CGTATCAGGATGCCATGAACGCGCCCATGCTGCCGATATTCAACGCCGTTTTGA TGGTCAAACAGTGACTAATGGACAGATCCTGCTATTGCGCCTGACCCAA	13	ACCACG

26	STTR7_594pb_39pb_8U	31	Monophage 4,5 : gft IPCV11	594	594	> 31_STTR7-L -- 19..566 of sequence GTGAAGTATTGGTTGATGAAGGTCCGCACGAACCGCTGTTACGCCGGGTGTCAT GCCCAGTCAACGGCTGTTCAAGCAACCGGTAGCGCCGACGCTCAGCCACAGTAC CAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAGCAGC CGGTAGCGCCGCAGCCGCAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCTCAGCC GCAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCG CAACAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGC CGCAGCCACAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGCCGCAGCCACAGTATCA GCAGCCGCAACAGCCGACAGCGCCGCAAGACAGCCTGATCCACCCGCTGTTGATG CGTAACGGCGACAGTCGTCCATTACAGCGTCCGACGACGCCGCTGCCTTCGTTAG ATCTTCTGACGCCGCCGCCGAGCGAAGTTGAACCGGTAGATACCTTTGGCCTG	9	GCCGCAGCCGCA GTATCAGCAGCC GCAACAGCCGGT AGC
27	“	33	Monophage 4,5 : gft IPCV19	594	594	> 33_STTR7-L -- 18..625 of sequence ATTGGTTGATGAAGGTCCGCACGAACCGCTGTTACGCCGGGTGTCATGCCCGAG TCAACGCCCTGTTACAGCAACCTGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAGC AGCCGGTAGCGCCGCAGCCACAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGTCGCA GCCACAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCTCAGCCACAGTACCAAGCAG CCGCAACAGCCGGTAGCGCCGCAACCGCAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAG CGCTCAGCCGCAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGCAGTA TCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAACAG CCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGGTAGCGCCGCAGC CGCAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGACAGCGCCGCAAGACAGCCTGATCCACCC GCTGTTGATGCGTAACGGCGACAGTCGTCCATTGCAGCGTCCGACGACGCCGCTG CCTTCATTAGATCTTCTGACGCCGCCGCCGAGCGAAGTTGAACCGGTAGATACTC CCC	9	
28	“	209	Schleissheim SA_03_07D	594	594	> 209_STTR7-L -- 17..445 of sequence TGATGAAGGTCCGCACGAACCGCTGTTACGCCGGGTGTCATGCCCGAGTCAACG CCTGTTACAGCAACCCGGTAGCGCCGCAACCGCAGTATCAGCAGCCGCAGCAGCCGG TAGCGCTCAGCCGAGTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGCA GTATCAGCAGCCGCAACAGCCGGTAGCGCCGCAGCCGAGTATCAACAGCCGCAG CAGCCGGTAGCGCCGCAGCCACAGTATCAGCAGCCGCAGCCGAGTATCAGCAGC CGCAGCAACCGACAGCGCCGCAAGACAGCCTGATCCACCCGCTGTTGATGCGTAA CGGCGACAGTCGTCCATTACAGCGTCCGACGACGCCGCTGCCTTCGTTAGATCTT TTGACGCCGCCGCCGAGCGAAGTTGAACCGGTAGATACCTGGCA	9	
29	STTR8_925pb_116pb_7U and STTR8_925_108pb_5U (see in TRF program)	14	Newport IPCV27	925	345	> 14L_STTR8L -- 31..327 of sequence CTCTATACCCCTACCGGCTGATAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACAC TGACGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTT GGATATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCTGCGCCCTGTAAAAGCA AAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAA GCCGGGTTCTGTCTGGACAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCA CTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTAGTACGGGCCGTACCTTATGAA CCCCATTCT	2 (108pb)	Starting at position 3414090_ RT_108pb CGGGTTTTATGAA GAGGTGAAACTGA CCGATAAGCCGCT TTCTTTTGGACAT AGCGTCGTGGACA GTCATTATCCTG CCGCCCTGTAAAA GCAAAAACCCGCC GAAG

								And starting at position 3414113_RT_11 6pb CGGGTTTTATGAA GAGATGAACTGA CCGATAAGCCGCT TTCTTTTCGGGTAT AGCGTCGTGGACA GTCATTATCCTG CCGCCCTGTAAAA GCAAAAACCCGCC AGCTTACACTGA
30	“	119	Newport SA_01_01E	925	345	> 119L_STTR8L -- 11..328 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGGACCTCTATACCCCTCACCGGCCTGATAAGCA AAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGA CCGATAAGCCGCTTTCTTTGGATATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATC CTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGA GGTGAAACTGACCGATAAGCCGGGTCTGTCGTGGACAGTCATTCATC TAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTAGTA CGGGCCGTACCTTATACCCCATATGG	2 (108pb)	“
31	“	29	Schwarzengr und IPCF19	925	345	> 29L_STTR8L -- 15..334 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCCTCACCGGCCTGATAAGCA AAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAA GCCGCTTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGC CCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAA GCTGACCGATAAGCCGGGTCTGTCGTGGACAGTCATTCATCTAGGCC AGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTACAGTACGGGCC GTACCTTATGAACCCCTATTTGGCCTATACTA	2 (108pb)	“
32	“	66	Enteritidis SA_01_02A	925	345	> 66L_STTR8L -- 10..320 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCCTCACCGGCCAGATAAGCA AAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGATGAACTGACCGATAA GCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGC CCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAA ACTGACCGATAAGCCGGGTCTGTCGTGGACAGTCATTCATCTAGGCC AGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTACAGTACGGGCC GTACCTTATGAACCCCATTTGGC	2 (108pb)	“
33	“	124	Enteritidis SA_03_02C	925	345	> 124L_STTR8L -- 39..320 of sequence CCCTTCACCGGCCAGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGA AGAGATGAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGT GGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAG CGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGGGTCTGTCGT GGACAGTCATTCATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCC TACCCGGGTTACAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCATTTT	2 (108pb)	“

34	“	114	Stanley NPH39	925	345	> 114L_STTR8L -- 13..322 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCACCGGCCTGATAAGCA AAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAA GCCGCTTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGC CCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAA GCTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCGTGGACAGTCATTATCTAGGCC AGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTTCAGTACGGGCC GTACCTTATGAACCCCATTTCTG	2 (108pb)	“
35	“	115	Stanley NPH64	925	345	> 115L_STTR8L -- 12..322 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCACCGGCCTGATAAGCA AAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAA GCCGCTTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGC CCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAA GCTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCGTGGACAGTCATTATCTAGGCC AGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTTCAGTACGGGCC GTACCTTATGAACCCCATTTGG	2 (108pb)	“
36	“	7	Derby IPCF21	925	461	> 7L_STTR8L -- 15..447 of sequence AGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCACCGGCCTGATAAGCAAAAACCCG CCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGATGAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGG TATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCC AGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGGGTTCT TTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAA CCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTTGCATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAG CCGGGTTCTGTGTCGTGGACAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCA AGCAGCCTACCCGGGTTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTCT	3	“
37	“	18	London IPCF2	925	461	> 18L_STTR8L -- 12..428 of sequence TGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCACCGGCCTGATAAGCAAAAACC CGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGG GGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCG GCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGG ATATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGC CGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGA ACAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGT TCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTACT	3	“
38	“	42	Anatum IPCV9	925	461	> 42L_STTR8L -- 14..450 of sequence GAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCACCGGCCTGATAAGCAAAAACC GCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGATGAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGG GTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGC CAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGGGTTCT TTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAA ACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTTGCATGAAGAGGTGAACTGACCGATAA GCCGGGTTCTGTGTCGTGGACAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTC AAGCAGCCTACCCGGGTTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTTCTGG	3	“

39	“	58	Indiana SA_03_01D	925	461	> 58L_STTR8L -- 14..439 of sequence GAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTGTACCCCTTACCCGGCCTGATAAGCAA AAACCCGCCGAAGCGGATTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAAG CCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGTGCGC CTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACGGACGGGTTTTATGAAGA GGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTCTTTTGGGTATAGTGTCTGTGGA CAGTCATTATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGG GTTTTATGAAGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG CAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTAC CCGGGTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTTTGGC	3	“
40	“	204	Itami SA_03_07E	925	461	> 204L_STTR8L -- 12..436 of sequence GTGAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCCTTACCCGGCCTGATAAGC AAAAACCCGCCGAAGCGGTTTTATGAAGAGCTGACACTGACCGATAA GCCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGC CCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAG AGGTGAACTGACCGATAAGCCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGG ACAGTCATCCATCCTGCCACCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCG GGTTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCTGTGG ACAGTCATTATCTAGGCCAGC AATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACCCGGGTTCAGTACGGGCCGT CCTTATGAACCCCTTTCT	3	“
41	“	213	Itami SA_01_02I	925	461	> 213L_STTR8L -- 12..437 of sequence GAGCTGGCGTCTTCTGCACCTCTATACCCCTTACCCGGCCTGATAAGCAA AAACCCGCCGAAGCGGTTTTATGAAGAGCTGACACTGACCGATAAAGC CGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATCCTGCCGCC TGTAAGAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAG GTGAACTGACCGATAAGCCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGAC AGTCATCCATCCTGCCACCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGG TTTTATGAAGAGGTGAACTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCTGTGGAC AGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCAAGCAGCCTACC CGGGTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTTTGGC	3	“
42	“	210	Virchow SA_01_02E	925	461	> 210L_STTR8L -- 12..448 of sequence GAGCTGGCGTCTTCTGGACCTCTATACCCCTTACCCGGCCTGATAAGCA AAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGGTGAACTGA CCGATAAGCCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTATC CTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGTTTTATGAAGA AGTGAACTGACCGATAAGCCGCTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGA CTGTCATTATCCTGTGCCCCGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTAC ACTGACGGGTTTTTGCATGAAGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG TCTGTCTGTGGACAGTCATTATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCA AGCAGCCTACCCGGGTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCCTTATT GG	3	“
43	“	116	Sandiego	925	1389	> 116L_STTR8L -- 306..909 of sequence	4	“

			SA_01_06A			ATAGCCGGAGGTTTTCTGATGCGCTAGTAAGGCTCTTACCAGCCGC GCCCTAACAGGCGCATACGATCTGACATTTGCATCAAACCTTCGTTACTT ACGGCCCGTAAACGGGCTGCCGGATAAGGGATCGATAATTGCTCACC CATTTTATCCTCTTCAAGCTGGTGCTTTATGTAATCCTGTATCTTCGCCG TGTTCTTACCCACCGTATCGACATAGTACCCTCTGCACCAGAACTCTCT GTTCTGTATTTGAATTTTAGATCCCCAACTGCTCGTAAAGCATCAGA CTACTTTTACCCTTCAGATATCCCATGAAGCTCGACACACTCATCTTCG GCGGGATCTCCAGAAGCATGTGAATATGATCTGCACAACATTCCGCTT CCAGGATTCGTACGTTTTTCCATTACACAATTTTCTTAATATGCTACCT ACTGCCCTACGCTTCTCTCCATAGAACGCTTGTCTTCGGTATTTGGGCG CGAAACTATGTGATATTTACAGTTCCATCGGGTGTGCGCTAAGCTCTT TTCGTCCCCATTGGGACCCCTTTTGATTCTTGTGAACTTTTGCAGT TGCCAGACCGCAGAT Séquence consensus obtenue	+ insertion 733pb	
44	“	121	Typhimurium SA_02_07C	925	925	> 121L_STR8L -- 46..797 of sequence 925pb CTATATCACCGGCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGATTTATG AAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCG TGGACAGTCATTCATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGC TTACACTGACGGGGTTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCT TTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTA AAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTAACGGGTTTTATGAAGAGGTGA AACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTC ATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGA CGGGTTTTATGAAGAGATGATACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGG TATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGTGCGCCCGTAAAAGCAAAA ACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGATGATACTGACCG ATAAGCCGCTTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTG CCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGT GAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGATATAGCGTCGTGGACAG TCATTCATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTT TTATGAAGAAGTGAAACTGACTGATAAGC	7	“
45	“	122	Typhimurium SA_03_02A	925	925	> 122L_STR8L -- 50..800 of sequence ATTCGTACACCGGCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGATTTATG AAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCG TGGACAGTCATTCATCCTGTGCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGC TTACACTGACGGGGTTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCT TTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTA AAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTAACGGGTTTTATGAAGAGGTGA AACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTC ATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGA CGGGTTTTATGAAGAGATGATACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGG TATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGTGCGCCCGTAAAAGCAAAA ACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATGAAGAGATGATACTGACCG ATAAGCCGCTTTCTTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTG CCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGT GAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGATATAGCGTCGTGGACAG TCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTT	7	“

						TTATGAAGAAGTGAAACTGACAGATAAG		
46	“	31	Monophase 4,5 :gft IPC11	925	461	> 31_STTR8-L -- 324..661 of sequence TATGCAATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTC ATCCTGCCGCCCTGTAAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGG TTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATA GTGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGTCGCCCTGTAAAAAGCAAAAACCC GCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAAACTGACCAATAAGCCGGGTT CTGTCGTGGACAGTCATTCATCTAGGCCAGCAATCGCTCACTGGCTCA AGCAGCCTACCCGGGTTTCAGTACGGGCCGTACCTTATGAACCCTTAA	3	
47	“	33	Monophase 4,5 :gft IPC19	925	577	> 33_STTR8-L -- 40..550 of sequence GCACGGCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAAC TGACCTATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTG TCGCCCGGTAAAAGCATAAACC GCCAGCTTACACTGACGGATTTTATGAAGAGG TGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTC ATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGTTTTATG AAGAGATGATACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAG TCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGT TTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGTATAGCGTCGT GGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTT TATGAAGAGGTGAAAA	4	
48	“	203	Schleissheim SA_03_02C	925	1273	> 203_STTR8-L -- 41..1005 of sequence GCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAA ACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGTGTCTGGACAGTCAT TCATCCTGTGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACG GGGTTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTTCGGGT ATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAGCAAAA CCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCAATAAGCCGC TTTCTTTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGT AAAAGCAATAAATATCCTCCGCGCATAGCCGGAGGTTTTTCTGATGCGC CTGTAAGGCTCTCTTACCAGCCGCGCCCTAACAGGCGCATACGATCTG ACATTTGCATCAAACCTTCGTTACTTACGGCCCCGTAACGGGCTGCC GGATAAGGGATCGATAATTGCTCACCCATTTATCCTCTTCAAGCTGGT GCTTTATGTAGTCCTGTATCTTCGCCGTGTTCTTACCCACCGTATCGAC ATAGTACCCTCTGCACCAGAACTCTCTGTTCTGTATTTGAATTTTAGA TCCCCAACTGCTCGTAAAGCATCAGACTACTTTTACCCTTCAGATATC CCATGAAGCTCGACACACTCATCTTCGGCGGGATCTCCAGAAGCATGT GAATATGATCTGCACAACATTCGCTTCCAGGATTCTGACGTTTTTCCA TTCACACAATTTTCTTAATATGCTACCTACTGCCCTACGCTTCTCTCCAT AGAACGCTTGTCTTCGGTATTTGGGCGCAAAAATATGTGATATTTACA GTTCCATCGGGGTGTGCGCTAAGCTCTTTTCGTCCCCCATTTGGGACCCCC TTTTGATTTCTTGTTGAACTTTTCAGTTGCCAGACCGCAAGAT	10	
49	“	208	Schleissheim SA_03_06B	925	1273	> 208_STTR8-L -- 54..988 of sequence GATAAACAAAAACCCGCCAAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTG ACCGATAAGCCGCTTTCTTTTGGGTATAGTGTCTGGACAGTCATTCAT CCTGTCGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACACTGACGGGGT	10	

						TTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCTTCTTTTCGGGTATAG CGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAAAGCAAAAACCCG CCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCAATAAGCCGCTTTC TTTCGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGCCGCCCTGTAAAA GCAATAAAATATCCTCCGGCATAGCCGGAGGTTTTCTGATGCGCCTGTA AGGCTCTCTTACCAGCCGCGCCCTAACAGGCGCATACGATCTGACATT TGCATCAAACCTTCGTTACTTACGGCCCGTAAACGGGCTGCCCGGATAA GGGAGCGATAATTGCTCACCCATTTTATCCTCTTCAAGCTGGTGCTTTA TGATGCTCTGTATCTTCGCCGTGTTCTTACCCACCGTATCGACATAGTA CCCTCTGCACCAGAACTCTCTGTTCTGTATTGAATTTTAGATCCCCA AACTGCTCGTAAAGCATCAGACTACTTTTACCCTTCAGATATCCCATGA AGCTCGACACACTCATCTTCGGCGGGATCTCCAGAAGCATGTGAATAT GATCTGCACAACATTCCGCTTCCAGGATTTCGTACGTTTTTCCATTACAC CAATTTCTTAATATGCTACCTACTGCCCTACGCTTCTCTCCATAGAAC GCTTGTCTTCGGTATTTGGGCGCGAAAACTATGTGATATTTACAGTTCC ATCGGGTGTGCGCTAAGCTCTTTTCGTCCCCATTGGGACCCCTTTTG ATTTCTTGTTGAA		
50	,	209	Schleissheim SA_03_07D	925	1273	> 209_STTR8-L -- 431..976 of sequence TAAGGCACTCTTACCAGCCGCGCCCTAACAGGCGCATACGATCTGACA TTTGATCAAACTTCGTTACTTACGGCCCGTAAACGGGCTGCCCGGATA AGGGATCGATAATTGCTCACCCATTTTATCCTCTTCAAGCTGGTGCTTT ATGTAGTCTGTATCTTCGCCGTGTTCTTACCCACCGTATCGACATAGT ACCCTCTGCACCAGAACTCTCTGTTCTGTATTGAATTTTAGATCCCC AAACTGCTCGTAAAGCATCAGACTACTTTTACCCTTCAGATATCCCATG AAGCTCGACACACTCATCTTCGGCGGGATCTCCAGAAGCATGTGAATA TGATCTGCACAACATTCCGCTTCCAGGATTTCGTACGTTTTTCCATTAC ACAATTTCTTAATATGCTACCTACTGCCCTACGCTTCTCTCCATAGAA CGCTTGTCTTCGGTATTTGGGCGCGAAAACTATGTGATATTTACAGTTC CATCGGGTGTGCGCTAAGCTCTTTTCGTCCCCATTGGGACCCCTTTTG ATTTCTTGT	10	

ANNEXE 3

Publications

- ✚ Krui Sun Lay, Yith Vuthy, Ping Song, Khem Phol and Jean Louis Sarthou (Lay KS, Vuthy Y, Song P, Phol K, Sarthou JL). Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. J.Vet Med Science, 2010 Nov.2.
- ✚ Krui SL, van Cuyck H, Koeck JL. Multilocus variable number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Dec 11.
- ✚ Krui Sun Lay, Hélène van Cuyck, Alexandra Farbos Granger, Philippe Leroy, Yith Vuthy, Ping Song, Jean Louis Sarthou, and Jean Louis Koeck . MLVA Polymorphism of *Salmonella enterica* Subspecies Isolated from, Human, Animal and Food in Cambodia.. BMC Microbiology soumis à publication

Présentations

1- Affiches

- ✚ Krui Sun Lay, Hélène van Cuyck, Alexandra Farbos Granger, Philippe Leroy, Vuthy Yith, Ping Song, Jean Louis Sarthou, et Jean Louis Koeck. MLVA Polymorphism of *Salmonella enterica* Subspecies Isolated from, Human, Animal and Food in Cambodia, 2001-2007. Poster présenté à Baie d’Arcachon le 8 avril 2009.
- ✚ Krui S.L., H. van Cuyck, A. Granger-Farbos, P. Leroy, Yith V., Suy B.H., J.L. Koeck, et J. L. Sarthou. Resistance profile of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* from Human, Animal and Food in Cambodia, 2001-2007. Poster présenté en Thaïlande, the WHO global *Salmonella* Surveillance Advanced Workshop, March 30- April 3, 2009.

1^{ère} publication:

Journal of Veterinary Medical Science - Decision on Manuscript ID JVMS-10-0373.R2

19-Oct-2010

Dear Dr. Kruy:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of Salmonella serovars and Campylobacter spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia" in its current form for publication in The Journal of Veterinary Medical Science.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of The Journal of Veterinary Medical Science, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Mitsumori Kawaminami, PhD

Editor in Chief, The Journal of Veterinary Medical Science

jvmseic_kawa@ipec-pub.co.jp

FULL PAPER: Bacteriology

Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia

KRUY SUN LAY^{1)*}, YITH VUTHY¹⁾, PING SONG¹⁾, KHEM PHOL¹⁾ and JEAN LOUIS SARTHOU¹⁾

¹⁾*Food microbiology laboratory, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia*

RUNNING HEAD: *Salmonella, Campylobacter* spp., prevalence, poultry, Cambodia

* Corresponding author. Present address: Food microbiology laboratory, Institut Pasteur du Cambodge, 5 Bd Monivong, Phnom Penh, Cambodia. Phone: (855) 12 333 576. Fax: (855) 23 725 606. E-mail: ksunlay@pasteur-kh.org

ABSTRACT. *Salmonella* and *Campylobacter* are common bacterial pathogens associated with human gastro-enteritis; and raw poultry is considered to be an important source of these bacteria. To evaluate whether the *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. bacteria could be monitored for the purpose of microbial presence, enumeration and antimicrobial resistance in raw poultry, 152 poultry carcasses were randomly selected from 10 markets in retail outlets of Phnom Penh during March 2006 to February 2007. The majority of poultry samples was contaminated by *Salmonella* serovars (88.2%) and *Campylobacter* spp. (80.9%). A very high contamination of *Salmonella* was found at 3-4 log₁₀ CFU/g for 22.4% of samples and of *Campylobacter* at 7-8 log₁₀ CFU/g for 1.3% of samples. Fifty nine different *Salmonella* serovars contaminated 134 poultry carcasses; five most prevalent serovars covered 29.1% of serovars isolates (Anatum, Typhimurium, Corvallis, Stanley and Enteritidis). Three *Campylobacter* species contaminating 123 raw poultry were *Campylobacter jejuni* (50.0%), *Campylobacter coli* (29.0%) and *Campylobacter lari* (21.0%). High antibiotic resistance percentages were found among *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. isolates. This study revealed that raw poultry at the retail outlets in Phnom Penh markets are contaminated with high prevalences of food-borne pathogens, and communicating the importance of minimizing this risk in reducing human infections.

KEY WORDS: antimicrobial susceptibility, *Campylobacter*, poultry, prevalence, *Salmonella*.

Salmonella and *Campylobacter* are both the most important food-borne diseases and cause substantial medical and economic burdens worldwide. In developing countries, investigations have shown that infection caused by *Campylobacter* spp. may be as serious as those by *Salmonella* serovars, both in frequency and severity symptoms [3]. Poultry is one of the principal reservoirs of non typhoid human *Salmonella* infection and causes potential of food-poisoning hazards [5, 14]. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infecting also poultry carcasses are major causes of gastroenteritis in human [7, 17]. To prevent poultry carcass contaminations, it is crucial to control *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. infections along the food production chain. But in spite of improved hygiene at the farm and slaughterhouse levels, numerous poultry carcasses remain infected in retail outlets [3]. Because of this, a number of actions have been taken to reduce the prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* with public health significance in food-producing animals. Quantitative microbiology risk assessment is still hampered by the lack of quantitative data. The generation of appropriate data with high sensitivity is a challenge for microbiologists since currently used bacteriological quantitation methodologies are laborious. Furthermore, quantitative *Salmonella* data for food associated with severe outbreaks have shown that the type of food plays a major role in the severity of illness. *Salmonella* in fatty food may have an advantage during passage through the acidic environment of the stomach to the intestine, where the cells become invasive regardless the damage caused by the acids.

In Cambodia, very little is known regarding the occurrence of food borne disease caused by enteric bacteria. For this, the authors processed to evaluate prevalence's, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail outlets of Phnom Penh markets during one year period.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Between March 2006 to February 2007, 152 poultry carcasses were collected from retail outlets of 10 markets in Phnom Penh city of Cambodia. Poultry were slaughtered directly in these markets sites. Every week, three samples were selected from each fixed retail outlet within three different markets, and another week, three other markets will be interested. The random was processed like this along 10 markets during one year period. Neck skin of poultry carcasses were selected, because the small hair of poultry neck skin retained micro-organisms.

Isolation and identification of Salmonella: Culture and isolation of *Salmonella* was conducted using standard method ISO 6579 as previously described [11]. Transparent well-isolated colonies with black center typical *Salmonella* morphology were collected from selective media and identified by using biochemical reactions. Isolates with typical *Salmonella* were confirmed to be *Salmonella* serovars based on detection of somatic and flagella antigens.

Enumeration of Salmonella: A semi-quantitative approach using modified semisolid Rappaport Vassiliadis (MSRV) agar was applied [18] by practice successive dilutions and by aspired 0.5 ml of aliquot (1/10) from the 1st serial to 4th serial of wells. After incubation the microplates at 37°C for 20 h, 20 µl of each dilution was peripheral transferred to the 2nd microplate to corresponding wells filling with 2 ml of MSRV media. The 2nd microplate was incubated at 41.5°C for 24-48 h. Wells of agar semisolid-MSRV presenting a range of migration with a discoloration were presumed to be positive. The positive or doubtful wells were cultured onto Hektoen (Difco) agar plate at 37°C for 20 h, for a confirmation of positive *Salmonella* as above. For the *Salmonella* enumeration, the positive and negative result for each sample should be seized in the mask of MNP calculator, the weight of each sample and serials of dilution rates included in the test from 1st to 4th well were noted as 0.2 g at 1/10,

0.04 g at 1/5, 0.008 g at 1/25 and 0.0016 g at 1/125, a number 1 was noted for a positive well and a number 0 for a negative well.

Isolation and identification of Campylobacter: Culture of *Campylobacter* was conducted using standard method ISO 10272-1 as previously described [15] and characteristic colonies (grayish on Karmali and grey on CCDA) were suspended in Brucella broth; *Campylobacter* bacterium was identified as curved bacterium with Gram (-) coloration and a spin movement under the microscope. Biochemical identifications were done on TSI agar (Difco) slant tubes, oxydase test, catalase test, sensibility to nalidixic acid and cefalotin disks, hydrolysis of hippurate and growth test at 25°C in Brucella broth. The sensitivity to nalidixic acid differentiated *C.lari* from *C. jejuni* and *C. lari*.

Enumeration of Campylobacter: The method ISO/CD 10272-2 was used to enumerate *Campylobacter* as previously described [10] and a loopful of suspect positive aliquot was cultured on Colombia plates (Oxoid) in microaerophilic atmosphere at 42°C during 24 h. Biochemical identifications of *Campylobacter* spp. were done identically as above.

Antimicrobial susceptibility test: All *Salmonella* and *Campylobacter* isolates were tested for antimicrobial susceptibilities by the disk diffusion method [16]. The following antimicrobials were tested at the indicated concentration (in µg/disk except where specified) for *Salmonella* isolates: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ticarcillin, cefalotin, cefoxitin, cefotaxim, gentamicin, streptomycin, chloramphenicol, sulfonamide, cotrimoxazol, nalixidic acid, ciprofloxacin and tetracycline. For *Campylobacter* isolates, the disks tested were amoxicillin, cefalotin, gentamicin, erythromycin, azithromycin, nalidixic acid and ciprofloxacin.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the antimicrobial agents against isolates and the breakpoints were determined by NCCLS criteria and read by Osiris system (Biorad).

Statistical analysis: The prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* was calculated by using Microsoft Excel. The general formula for *Salmonella* count (MNP method) and

Campylobacter spp. colonies count using for plates contained between 15 to 150 colonies were applied.

RESULTS

Salmonella were isolated from 134 (88.2%) out of 152 samples processed with 201 isolates, whereas *Campylobacter* were isolated from 123 (80.9%) samples including 139 isolates.

Different quantitative contaminations of *Salmonella* were displayed by 34 samples (22.4%) at 3-4 log₁₀CFU/g, 56 samples (36.8%) at 2-3 log₁₀CFU/g, 32 samples (21.1%) at 1-2 log₁₀CFU/g, and 12 samples (7.9%) at 0-1 log₁₀CFU/g (Fig. 1).

Among 134 positive samples, 7 samples harbored four different species of *Salmonella* (5%), 12 samples of 3 different species (9%), 49 samples of 2 different species (37%) and 66 samples of one specie (49%).

Fifty nine *Salmonella* serovars from positive samples are listed in the Table 1. The most prevalent serotypes are *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Stanley and *Salmonella* Enteritidis that covered 29.1% of all isolated serovars.

The contamination of raw poultry by *Campylobacter* spp. was found successively from high to low quantitative rates: 2 samples (1.3%) at 7-8 log₁₀CFU/g, 6 samples (3.9%) at 6-7 log₁₀CFU/g, 33 samples (21.7%) at 5-6 log₁₀CFU/g, 50 samples (32.9%) at 4-5 log₁₀ CFU/g, 25 samples (16.4%) at 3-4 log₁₀ CFU/g and 8 (5.3%) at 0-1 log₁₀ CFU/g (Fig. 1).

One hundred thirty nine isolates of *Campylobacter* recovered from three species contaminated poultry carcasses; *Campylobacter jejuni* was more frequently isolated (50.0%) than *Campylobacter coli* (29.0%) or *Campylobacter lari* (21.0%).

Table 2 shows the results of antimicrobial susceptibility tests for *Salmonella* serovars circulating among raw poultry in Phnom Penh markets. All *Salmonella* isolates were sensitive to cefotaxim and cefoxitin. About 23.1-53.8% of *Salmonella* Anatum presented high resistant

rates to six antimicrobials (amoxicillin, cefalotin, cotrimoxazol, nalidixic acid, sulfonamid and tetracycline). In other hand *Salmonella* Typhimurium were resistant to four antimicrobials from 15.4-23.1% (amoxicillin, nalidixic acid, sulfonamid and tetracycline). *Salmonella* Corvallis presented high proportions of resistance to nalidixic acid, sulfonamid and tetracycline (respectively 42.0, 75.0 and 75.0%). *Salmonella* Stanley displayed a resistance only to tetracycline (90.0%). The resistance of *Salmonella* Enteritidis was important and varied from 10.0-90.0% to amoxicillin, ticarcillin, nalidixic acid, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline.

The antimicrobial resistance was apparent for *Campylobacter jejuni* (97.1%), *Campylobacter coli* (97.5%) and *Campylobacter lari* (96.7%) displaying to cefalotin. About 90.0%, 69.6% and 15.0% of *Campylobacter lari*, *Campylobacter jejuni* and, *Campylobacter coli* were resistant to nalidixic acid. Three antimicrobial agents (amoxicillin, azithromycin and erythromycin) were completely inhibiting by *Campylobacter coli*. Otherwise, *Campylobacter jejuni* was sensitive to gentamicin (Table 3).

DISCUSSION

The present study conducted over one year period shows high prevalences and numbers of two major enteric bacteria contaminating raw poultry in retail outlets among 10 Phnom Penh city markets. These bacteria resulted from a cross contamination of the kitchen environment bacteria and direct hand-to-mouth exposure of enteric pathogens [6]. The prevalence (88.2%) of *Salmonella* serovars in Cambodia from poultry carcasses was at the same level as the prevalence of *Salmonella* in other developing countries, 72.0% in Thailand from retail chicken meat samples and 80.0% of poultry in open markets [1], although only 4.6% of farming ducks in Taiwan were positive for *Salmonella* [20]. In developed countries, the level of *Salmonella* contamination of raw chicken was 30.8% in poultry layer feces in North

Carolina (USA) [12], a mean of prevalence was 22.4% in reproductive laying hens in Poland, over a 5 year period (2001-2005) [19] and 13.4% of laying hens were positive in the Netherlands [21].

The numbers of *Salmonella* in our study varied from less than 1 to 4 log₁₀ CFU/g for 134 samples. Nevertheless, no spoilage was observed in the poultry meat before processing and it was thought that competition among the micro-organisms in the poultry meat might suppress the growth of *Salmonella* cells [8]. A previous study showed that inoculated 10⁵ CFU/g of *Salmonella* cells in minced meat, they grew to a high population level (10⁹ CFU/g) [13]. Another study in USA showed also same range of *Salmonella* number which varied from <1.00 to 3.76 log₁₀ CFU/g in layer feces hens [12].

A high prevalence of *Campylobacter* spp. was calculated in the study (80.9%). In Thailand a high prevalence rate of *Campylobacter jejuni* was also observed from broilers flocks that correlated with the results of our study (65.0%) [4]. In the Netherlands a previous study showed that *Campylobacter* spp. were positive for 27.1% of chicken broilers [21]. Our results showed high quantitative numbers of *Campylobacter* spp. in Cambodian markets that varied from <1-8 log₁₀CFU/g in poultry carcasses. In Europe *Campylobacter* spp. were found in moderate rates, from less than 1-4.5 log₁₀CFU/g in Belgium chicken meat [9] and in Italian broilers, the mean rates varied from 3.93-6.13 log₁₀CFU/g [14].

High multiple antimicrobial resistance profiles were observed for *Salmonella* Anatum, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Corvallis, *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars to amoxicillin (8.3-90.0%), nalidixic acid (16.9-80.0%), sulfonamide (8.5-75.0%) and tetracycline (15.4-90.0%). Only *Salmonella* Stanley was resistant to tetracycline in a moderate rate (9.0%), all other antimicrobials tested were completely inhibiting by *Salmonella* Stanley. The same level of resistance of *Salmonella* Typhimurium to nalidixic acid (23%) was observed in a study performing in France [2]. Our results on the resistance of

Salmonella Enteritidis to nalidixic acid were higher than what was seen in Europe in raw poultry (15.0%) [2].

Results of this study show important information regarding the contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp in poultry among Phnom Penh markets, and the dissemination of resistance of these bacteria to major antibiotics confirming the crucial role of raw animal as the source of resistance to antimicrobial spread. Thus, it is important to increase the awareness of veterinary authorities to promote the hygiene practices at the slaughter of poultry within Cambodian markets. It is also recommended to monitor the poultry farming as a preventive measure to avoid the micro-organism development in the initial chain of poultry consumption.

ACKNOWLEDGMENT. Special thank to the “Division International” at Institut Pasteur in Paris, who funded the study.

REFERENCES

1. Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornrunnangwong, S., Kaneko, N. M. K. and Ogawa, M. 1998. *Salmonella* in broiler chickens in Thailand with special reference to contamination of retail meat with *Salmonella* Enteritidis. J. Vet. Med. Sci. **71**: 1234-1236.
2. Cailhol, J., Lailler, R., Bouvet, P., La Vieille, S., Gauchard, F., Sanders, P. and Brisbois, A. 2006. Trends in microbial resistance serotypes in non-typhoid *Salmonellae* from human and poultry origins in France. Epidemiol. Infect. **134**: 171-178.
3. Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J. D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E. F. and Salvat, G. 2003. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. Élev. Méd. vét. pays trop. **56**:13-16.

4. Chansiripornchai, N. and Sasipreeyajan, J. 2009. PCR Detection of four virulence associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. J. Vet. Med. Sci. **71**:839-844.
5. Copper, G. L. 1994. Salmonellosis-infection in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccines-a review. Vet. Bull. **64**: 123-143.
6. Cuiwei, Z., Beilei Ge, G., de Villena, J., Sudler, R., Yen, E., Zhao, S. H., White, D. G., Wagner, D. and Meng, J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, and beef from the greater Washington, D. C., area. Appl. and Environ. Microbiol. **67**: 5431-5436.
7. Fredman, C., Neimann, J., Wegener, H. and Tauxe, R. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. 121-138. *Campylobacter*, 2nd ed. (Nachamkin, I. and Blaser, M. eds) AMS Press, Washington, DC.
8. Fujikawa, H. and Shimojima, Y. 2007. Estimation of viable *Salmonella* cell numbers in meat and meat products using real-time PCR. J. Food Hyg. Soc. Japan. **49**: 261-265.
9. Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D. and de Zutter, L. 2008. Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. Appl. Environ. Microbiol. **74**:5483-5489.
10. Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D. and de Zutter, L. 2008. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. Food Microbiol. **25**: 65-74.
11. Koyuncu, S. and Haggblom, P. 2009. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. BMC Vet. Res. **5**: 6.
12. Li, X., Payne, J. B., Santos, F. B., Levine, J. F., Anderson, K. E. and Sheldon, B. W. 2007. *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses

- and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. Poult. Sci. **86**:591-597.
13. Mackey, B. M and Kerridge, A. L. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonella* in minced meat. Int. J. Food microbiol. **6**:57-65.
 14. Manfreda, G., de Cesare, A., Bondioli, V., Stern, N. J. and Franchini, A. 2006. Enumeration and identity of *Campylobacter* spp. in Italian broilers. Poult Sci. **85**: 556-562.
 15. Moran, L., Kelly, C. and Madden, R. H. 2009. Factors affecting the recovery of *Campylobacter* spp. from retail packs of raw, fresh chicken using ISO 10272-1:2006. Lett. Appl. Microbiol. **48**: 628-632.
 16. NCCLS. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolates from animal; approved standard, 2nd ed. M31-A2. NCCLS, Wayne, PA.
 17. Padungton, P. and Kaneene, J. B. 2003. *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and theirs antimicrobial resistance. J. Vet. Med Sci. **65**: 161-170.
 18. Pavic, A., Groves, P.J., Bailey, G. and Cox, J.M. 2009. A validated miniaturized MPN method based on ISO 6579: 2002, for the enumeration of *Salmonella* from poultry matrices. J. Appl. Microbiol. **109**: 25-34.
 19. Trawinska, B., Saba, L., Wdowiak, L., Ondrasovicova, O. and Nowakowicz-Debek, B. 2008. Evaluation of *Salmonella* rod incidence in poultry in the Lublin Province over the years 2001-2005. Ann. Agric. Environ. Med. **5**: 131-134.
 20. Tsai, H. J. and Hsiang, P. H. 2004. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* and *Campylobacter* in ducks in Taiwan. J. Vet. Med. Sci. **67**: 7-12.
 21. van de Giessen, A. W., Bouwknecht, M., Dam-Deisz, W. D. C., van Pelt, W., Wannet, W. J. B. and Visser, G. 2006. Surveillance of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry production flocks in the Netherlands. Epidemiol. Infect. **134**: 1266-1275.

TABLE 1. *Salmonella* (S.) serovars isolated from raw poultry

<i>Salmonella</i> serovars	201 isolates	%
<i>S. Anatum</i>	13	6.4
<i>S. Typhimurium</i>	13	6.4
<i>S. Corvallis</i>	12	5.9
<i>S. Stanley</i>	11	5.5
<i>S. Enteritidis</i>	10	4.9
<i>S. Derby</i>	9	4.5
<i>S. Weltevreden</i>	9	4.5
<i>S. Albany</i>	8	3.9
<i>S. Hvitittingfoss</i>	8	3.9
<i>S. Newport</i>	8	3.9
<i>S. London</i>	7	3.5
<i>S. Braenderup</i>	6	2.9
<i>S. Lexington</i>	6	2.9
<i>S. Bovismobificans</i>	4	1.9
<i>S. Nakuru</i>	4	1.9
<i>S. Ohio</i>	4	1.9
<i>S. Paratyphi B</i>	4	1.9
<i>S. Rissen</i>	4	1.9
<i>S. Schleissheim</i>	4	1.9

Other serovars less than 4 isolates: Amsterdam, Altona, Atakpame, Bareilly, Be, Biafra, Bradford, Chailey, Clackamas, Djugu, Dublin, Eschberg, Give, Hadar, Hayindogo, Hessarek, Indiana, Ituri, Istoria, Javiana, Kentucky, Lamberhurst, Loubomo, Mbandaka, Orientalis, Reading, Regent, Sandow, Saintpaul, Sarajane, Schwarzengrund, Sinchew, Sinstorf, Thompson, Tsevie, Tyresoe, Virchow, Uganda, Wansworth.

TABLE 2. Prevalence of antimicrobial resistance in five most prevalent *Salmonella* (S.) serovars and other serovars isolated from raw poultry ^a

Antimicrobial	Resistant number (%)					
	S. Anatum n=13	S. Typhimurium n=13	S. Corvallis n=12	S. Stanley n=11	S. Enteritidis n=10	Other serovars n=142
Amoxicillin	3 23.1	2 15.4	1 8.3	0 0	9 90.0	19 13.4
Amox./clav. acid	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0.7
Cefalotin	3 23.1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Cefotaxim	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Cefoxitin	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Chloramphenicol	0 0	0 0	1 8.3	0 0	1 10.0	10 7.0
Ciprofloxacin	0 0	0 0	1 8.3	0 0	0 0	4 2.8
Cotrimoxazol	3 23.1	0 0	0 0	0 0	1 10.0	10 7.0
Gentamicin	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 1.4
Nalidixic acid	7 53.8	3 23.1	5 41.7	0 0	8 80.0	24 16.9
Streptomycin	0 0	1 7.7	0 0	0 0	6 60.0	1 0.7
Sulfonamid	3 23.1	2 15.4	9 75.0	0 0	1 10.0	12 8.5
Tetracycline	7 53.8	2 15.4	9 75.0	1 9.0	1 10.0	23 16.2
Ticarcillin	1 7.7	0 0	1 8.3	0 0	9 90.0	21 14.8

^a Antimicrobial susceptibility testing was performed according to NCCLS guidelines [16]. *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as the quality control organism for *Salmonella* serovars.

TABLE 3. Prevalence of antimicrobial resistance of *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* isolated from raw poultry in markets^a

Antimicrobial	Resistant number (%)					
	<i>C. jejuni</i> n=69		<i>C. coli</i> n=40		<i>C. lari</i> n=30	
Amoxicillin	9	13.0	0	0	6	20.0
Azithromycin	1	1.4	0	0	4	13.3
Cefalotin ^b	67	97.1	39	97.5	29	96.7
Ciprofloxacin	14	20.3	3	7.5	19	63.3
Erythromycin	2	2.9	0	0	4	13.3
Gentamicin	0	0	1	2.5	1	3.3
Nalidixic acid	48	69.6	6	15.0	27	90.0

^aAntimicrobial susceptibilities testing was performed according to NCCLS guidelines [16]. *C. jejuni* ATCC 33560 was used as the quality control organism for *Campylobacter*.

^bCefalotin resistance is one a most key properties identify these three species, and Nalidixic acid sensibility differentiated *C. lari* from *C. jejuni* and *C. coli*.

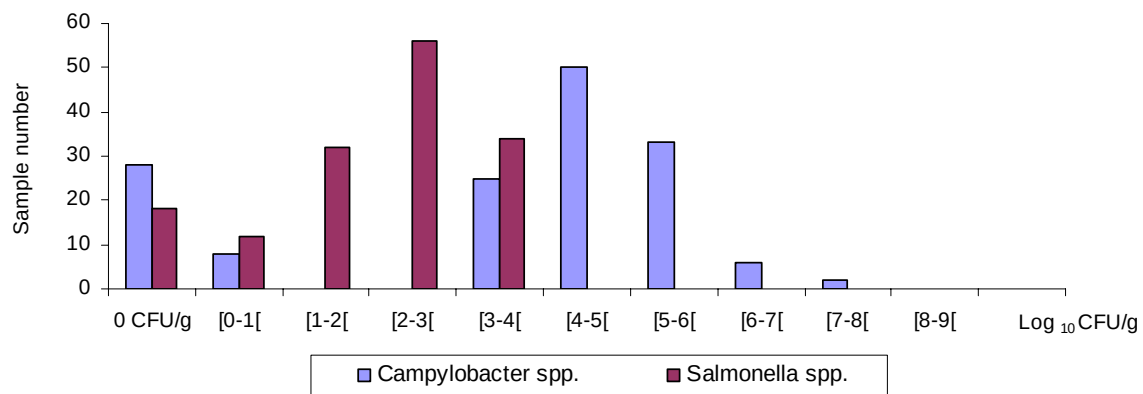


FIG. 1. Quantitative contaminations of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in raw poultry.

2ème publication:

Date: 18-10-2010

EJCMID: Your manuscript entitled Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies

Editorial Office EJCMID

Ref.: Ms. No. EJCMID-D-10-00574

Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies
European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Dear Dr. KRUY,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

It was accepted on 18-10-2010.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

W. van Leeuwen

Reviews Editor

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies

S.L. Kruiy H. van Cuyck J.L. Koeck

S.L. Kruiy ✉

Food microbiology laboratory,
Institut Pasteur du Cambodge, 5 Bd Monivong,
Phnom Penh, Cambodia.

Email: ksunlay@pasteur-kh.org

Phone number: 855 12 333 576

Fax number: 855 23 426 009

H. van Cuyck and J.L. Koeck
Biology Clinic Laboratory,
HIA Robert Picqué,
33150, Villenave d'Ornon, France.

Abstract Genomic analysis of *Salmonella enterica* revealed the existence of a variable number of tandem repeats (VNTR) at multiple loci. Some *S. enterica* strains are considered as references (Typhi Ty2, Typhi CT18, Typhimurium LT2, Enteritidis LK5, PT4, and Enteritidis 07-2642, and Newport). These allowed the selection of markers to develop the genotyping technique, multiple locus VNTR analysis (MLVA). These markers were used to discriminate *S. enterica* isolated from human, food, or environment. In this report, the characteristics and specifications of 58 salmonella markers described from 2003 to 2009 are analyzed. Some VNTR loci were used as markers. The markers were used to discriminate *S. enterica* isolates from different sources and geographical localizations. Among the VNTR loci described in published reports, eight presented with a high diversity index of polymorphism of more than 0.80. The selection of several markers within a single locus validated their polymorphism characteristic. Despite unequal DI values, the use of a panel of markers is a powerful discriminatory tool for surveillance and identification of the source of salmonella outbreak. Depending on the markers selected, MLVA should be used either for macro or micro epidemiological purposes. The main challenge in the future for this technique is standardization.

Introduction

The *Salmonella* genus of bacteria consists of two species: *S. enterica* and *S. bongori* [1-2]. *S. enterica* is further subdivided into 6 subspecies including 2,541 serovars. These bacteria are classified by their antigenic formulas (antigen somatic O and flagella H) and are organized into a serovar list according to the scheme of Kauffman and White [3]. Among these serovars, 94 *S. enterica* genomes and plasmids (NCBI) have been completely sequenced and several others are being assembled by different international research centers.

The salmonella genome contains numerous loci with a succession of repeated nucleotide sequences or tandem repeats (TR). Variable numbers of tandem repeats (VNTR) are polymorphic TRs, which may be linked to environmental adaptation of bacteria through modulation of protein function. These modulations include antigenic variation, interactions with target cells, and regulation of bacterial gene expression. Deletion or insertion of a nucleotide in a repeat unit involved in the regulation of enzymatic proteins has been reported in cases of *Neisseria meningitidis* infection [4]. Motifs of one to eight base pairs (bp) in size can vary by slippage during replication and are known as microsatellites. A motif that is longer than eight bp in length is termed a minisatellite and these may also be altered during the double-strand repair in replication. Some of the tandem repeats are coding and may affect either the synthesis of a protein or its structure. For genes located in coding regions these variations can affect cytoplasm functions, sugar metabolism, DNA repair, and protein production [5].

The multiple-locus VNTR (MLVA) technique has been used for phylogenetic profiling and molecular subtyping of many bacteria such as *Bacillus anthracis* [6], *E. Coli* O157 H7 [7], *Haemophilus influenzae* [8], *Legionella pneumophila* [9] *Mycobacterium tuberculosis* [10], *Neisseria meningitidis* [11], *Staphylococcus aureus* [12], *Streptococcus pneumoniae* [13], and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium [14]. The MLVA analysis for salmonella serovar has been used for polymorphism profiling [14], genotyping of *S. enterica* subspecies [15], genotyping a specific *S. enterica* serovar like Typhimurium [14, 16], and genotyping Typhi [17] and Enteritidis [18, 19] from a bacteria collection. MLVA genotyping has also been an important tool for surveying

strains that are either related or unrelated to outbreaks [19, 20]. The assay enabled the characterization of subspecies during epidemics, particularly when several epidemics from a single serovar harboring identical phages occurred simultaneously in different countries and continents [21].

The present study describes the marker characteristics and specifications developed in MLVA techniques from 2003 to 2009 applied to *S. enterica*.

Technical approach of MLVA

The technique of MLVA has been developed through the use of polymerase chain reaction (PCR). It is a recent approach for the genotyping of bacteria based on amplification of DNA fragments that contain variable copies of tandem repeats. The resulting amplified fragment is a DNA sequence harboring one or several repeat units bordered by flanking sequences. This fragment is inserted between forward (F) and reverse (R) primer sequences. Each marker is characterized by its position number on the genome and has a fixed location in the genome of the salmonella reference strain.

The PCR product may be analyzed using either agarose gel or capillary electrophoresis. Through its use of denaturing DNA migration, capillary electrophoresis is an accurate means of determining amplified fragment lengths [14]. The molecular weight markers and single strand left primers are labeled at their 5' end with either a fluorescent dye (FAM, 6-FAM, HEX, and TET) or a non fluorescent rhodamine dye (ROX, TAMRA). Loci labeled with FAM and 6-FAM are depicted in blue, TET in green, HEX in black, and the non-fluorescent dyes in red (ROX, TAMRA) [24].

VNTR markers applied to genotyping of *Salmonella* serovars

The structure of TRs in bacteria genomes can be analyzed for the detection of repeat sequences through using two different programs, the Tandem Repeats Finder (TRF) (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) [22] and the Tandem Repeat Database (TRD) (<http://minisatellites.u-psud.fr> website) [23]. The TRF program allows for the maximum period size, different parameters for alignments (match, mismatch, and insertion, deletion), and minimum alignment score to report a repeat as criteria by directly entering the complete sequence of a salmonella genome. For example, the *S. Typhimurium* LT2 genome sequence from GenBank (NC_003197) showed 78 loci harboring direct repeat numbers when entered into the TRF program. The minisatellite database allows for the determination of VNTR loci from the complete sequence of a salmonella genome that is already present within the database. The selection of the sequence gives the characteristics of the TR according to the following criteria: total length, unit length, and percentage of matches between 80 and 100. For each database, the final results are the period size, the physical positions in the genome, the repeat copies bp, and the consensus size of the repeats. For example for *S. Typhimurium* LT2, 26 VNTR loci sequences which fulfill the criteria for a repeat sequence are presented. Without selecting any criteria except conservation of motifs with a 70% score, 6277 loci are shown in the *S. Typhimurium* LT2 genome. Markers can be obtained by the selection of F and R primers in the flanking sequences that border the region containing the tandem repeat copies, using the website: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi. To find a new TR, the parameters can be changed. For example, when submitting the *S. Enteritidis* PT4 or *S. Enteritidis* LK5 genome sequences, the search for TR and copy number for the SE-7 marker required specific parameter alignments: 2 for match, 3 for mismatch, and 5 for insertion.

The genomes and plasmid sequences that have been used as reference sequences in the literature which are available in Genbank are: *S. Typhi* CT18, NC_003198; *S. Typhi* Ty2, NC_004631; *S. Typhimurium* LT2 and plasmid, NC_003197 and NC_003277; and *S. Newport* str. SL 254 NC_011080. Other sequences such as *S. Enteritidis* PT4 and LK5, NCTC_13349 strain, phage type 8 DNA identical sequences to NCTC_13349, and *S. 07-2642*, DNA identical sequence to NCTC_13349 [14, 15, 17, 18, 19, 25], are available from the websites http://www.sanger.ac.uk/Project/Salmonella/SEN_genePred.embl and

<http://www.salmonella.org/genomics/sen.dbs>. Furthermore, a database of tandem repeats from seven complete genomes of *S. enterica* subspecies is available at the website <http://minisatellites.u-psud.fr>.

The VNTR markers published from 2003 to 2009 to discriminate *S. enterica* subspecies are shown in table 1. The characteristics and specifications of the 40 VNTR markers described in the literature from 2003 to 2009 for the genotyping of *S. enterica* serovars are presented in table 2. The data presented by the authors were validated using the TRF program, and the TRD and NCBI databases. Different authors have given some of these VNTR markers different names. The NCBI nucleotide BLAST program showed that most of the *S. enterica* markers used for MLVA matched the F and R primers with the genome of several salmonella serovars. However, some markers had no matching position with reference strains. The 4596419L-4596419R marker selected in 2006 did not match the F or R primers with the *Typhimurium* LT2 genome or any other serovars of *S. enterica*, [25]. However, a 892 bp PCR band was described in the study. The SE-4 marker selected in 2007 matched with the *Enteritidis* PT4 and LK5 genomes for the left segment only [18]. These discrepancies may be due to either mistake in the primer sequences or to unspecific amplification. Furthermore, four markers developed in 2007 using *S. Enteritidis* PT4 and LK5 as reference strains showed inverted R and F primer pairs for SE-1, SE-2, SE-9, and SE-10 markers, *i.e.* the R primers should be replaced by the F primers and vice versa [18].

Three markers showed a narrow spectrum of dispersion between serovars. The “2531837L-2531837R” marker recognizes only the Typhimurium LT2 genome, the “2730867L-2730867R” marker matches the Typhimurium LT2 and Newport genomes, and the SENTR1 marker matches the Typhimurium LT2 and Enteritidis P125109 genomes. Five markers, described in the literature (Sal02, Sal04, Sal15, SE-8 and TR4500; [15, 18, 27]) presented fragments without TR motifs when the reference strains were submitted into the TRF program and the primers were entered into the NCBI BLAST program.

Some markers showed either differences between the reference strains or discordances between reports. The STTR1 locus presented with a 21bp TR for the LT2 Typhimurium strain in a published report [14]. However, a search with the TRF program after submitting the LT2, LK5, and PT4 genomes gave a 45bp TR length which was in agreement with literature on LK5, PT4 concerning this locus [18]. The STTR8 locus presented a 116bp TR [14, 25] which was found to have two different copy numbers (*i.e.* two different alleles) using the TRF program. A 4.9 TR copy number was first reported at position 3,414,113 [14] and a 6.5 TR copy number was reported at position 3,414,090 [25] using the LT2 strain. The TR copy numbers for the STTR5 locus in the LT2 strain in these reports were respectively 13 TR [14] and 13.3 TR [25]. Using the TRF program when submitting the Typhimurium LT2 genome to TRD database, gave a similar 14.7 TR copy number [7]. The same result was always obtained when the sequence was submitted using the TRF program. The differences observed in the number of repeats were dependent on the criteria chosen by authors and correspond to different alleles. In the same serovar of *S. enterica*, two different copy numbers of TR motifs between LK5 and PT4 were observed for the SE-2, SE-3, SE-9, and SE-10 markers [18]. In the same PT4 serovar, the SE-5 and SENTR5 loci had respective copy numbers of 11.8 TR and 10 TR for the same 6 bp TR [18, 19] Using the TRF program for the PT4 genome showed that the locus contains 10 TR.

The reproducibility and ability to discriminate *S. enterica* serovars can be deduced from the diversity index (DI) of the 40 VNTR loci (Table 2). Eight of these loci (TR2, TR4699, Sal02, STTRpl10, STTR6, Sal16 [STTR5], Sal20, and TR1) displayed a high degree of polymorphism (DI>0.80). Other VNTR loci were less polymorphic (DI<0.80), and are still used to discriminate *S. enterica* strains. This allowed comparisons between the studies, and favored the standardization of the MLVA technique.

In a few VNTR loci, some markers were closer to the physical starting position of the repeat motif than others. For example, the STTR5 marker at position 3,184,505 in the LT2 Typhimurium strain [14] was closer to the physical position of the TR motif at 3,184,543 in the LT2 genome, than two other markers that were later developed. These were STTR5 (Sal16) at position 3,184,438 [15] and “3184543L-3184543R” at position 3,184,463 [25]. Using different locations for a marker within the same locus did not affect the polymorphism DI in the three reports.

Following their description, eleven markers (STTR4, TR3, TR4, Sal04, Sal15, Sal23, 0819457L-0819457R, 2531837L-2531837R, 4596419L-4596419R, 4810628L-4810628R, and SE-4) are no longer used. This was because they were either less polymorphic or they presented too high a number of repeat motifs implying a large fragment size, or that they were reported as unspecific primer amplification.

MLVA validation by DNA sequencing

DNA sequencing helped to verify the results from the MLVA analysis of *S. enterica* isolates. This included a new serovar not yet submitted to MLVA to confirm the existing tandem repeats in the amplified fragments. Sequencing of PCR products allowed analysis of the organization of repeat motifs [24] and showed that repeated sequences were flanked on one or both sides by sequences of motifs, partial motifs, or motifs with mutations (insertion or deletions). Sequencing demonstrated why the size of the fragments did not always correspond to a multiple of repeat motifs [18].

Development of VNTR markers for epidemiological investigations of different salmonella serovars

The development of VNTR markers (table 1) started with the study of a unique serovar, and then extended to other salmonella serovars. In 2003, Lindstedt *et al.* [14] developed eight markers selected within VNTR loci of *S. Typhimurium*, to discriminate *S. Typhimurium* and *Typhimurium* DT104 strains, which were collected over a six-year period (1996-2001). The strains were isolated from human and food samples from countries in Europe, Asia, and Australia. During the same year, Liu *et al.* [17] developed a PCR methodology using five VNTR loci from Typhi CT18 to genotype *S. serovar* Typhi strains. These strains were isolated from human samples in Singapore, Indonesia, India, Bangladesh, Malaysia, and Nepal between the years 2000 and 2001. In 2004, two other markers designed from a locus and a plasmid of *S. Typhimurium* were also tested together with the four markers previously described in 2003 [16]. They were used to discriminate *S. Typhimurium* and the DT104 strains isolated from human, food, and raw animal origins. The strains selected from 1981 to 2004, were originally from Norway. In the same year (2004), ten markers were selected from the VNTR loci of *S. Typhimurium* LT2, Typhi CT18, and Ty2 [15] in to discriminate *S. Typhimurium* and other *S. enterica* serovars (Anatum, Enteritidis, Gallinarum, Hadar, Montevideo, Newport, Paratyphi A, Paratyphi B and Typhi) isolated from human samples in France between 1992 and 1999. In 2006, five previously described, and five new loci

designed from *S. Typhimurium* LT2 genome, were used to discriminate *S. Typhimurium* and *S. Newport* [25]. Every sample was isolated from a single patient in the Arkansas hospital and was collected during 1997-1998. A report published in 2007 discussed the use of markers selected in the genomic partial sequence of *S. Enteritidis* LK5 and in the completed sequence of *S. Enteritidis* PT4 [18]. The genome sequences of *S. Typhi* CT18 and Ty2 strains and *S. Typhimurium* LT2 strain, were also screened with the aim of finding additional candidate markers. The above markers were used to test *S. Enteritidis* isolates obtained from food-borne outbreaks and sporadic human cases in Minnesota between 1998 and 2003. To screen the variability of VNTRs in *S. Enteritidis* strains isolated from 1992 to 2007 (a collection from Africa, Asia, and Europe), seven markers previously described from the loci of *S. Enteritidis* [18] and *Typhimurium* LT2 [16], and two markers from the loci of *S. Enteritidis* (strain NCTC_13349 and strain 07-2642) were used to discriminate *S. Enteritidis* strains [19]. A collection of worldwide *S. Typhi* isolates from 1981 to 1995 was tested using seven previously described markers [15], as well as two new markers within the loci of the *S. Typhi* strain CT18 [27]. At the same time, another study developed an application of the MLVA assay by using two previous markers [16] and developed four other markers screened in the loci of *Newport* str. SL254 NC_011080. These were used to exclusively discriminate *S. Newport* strains isolated from animal, wild birds, and humans in Washington State [26].

Conclusion

Source of infection or geographical origin were successfully determined by using MLVA in several *S. Typhimurium* or *S. Enteritidis* outbreaks [20, 28]. The MLVA analysis was then extended to other salmonella serovars (*Anatum*, *Enteritidis*, *Gallinarum*, *Hadar*, *Montevideo*, *Newport*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B*, and *Typhi*) [15, 26, 27]. A high level of subtyping discrimination among *S. enterica* isolates has been achieved over several years through use of the MLVA assay. This report presents an overview of 58 MLVA markers tested and used from 2003 to 2009. These markers were issued from 40 VNTR loci of 7 *S. enterica* genomes and a plasmid of LT2. Their characteristics and specifications were validated by different programs (TRF, and BLAST from NCBI) or databases (TRD). Some VNTR loci had a particular discriminatory effect and several markers were designed from them. These VNTR loci were in coding regions. Eight loci (TR2, TR4699, Sal02, STTRp110, STTR6, Sal16 [STTR5], Sal20, and TR1) presented with a large DI of more than 0.80. A data assessment of DI for other loci is required to confirm these findings. Despite the low DI determined for some loci, the MLVA method showed an excellent power of discrimination between isolates belonging to the same serovar and obtained from human, food, or animal sources. The technique was described for a limited number of serovars. Analysis of polymorphic markers has several advantages over other the other molecular methods described so far, including low cost, minimum equipment, speed, reliability, and a high reproducibility. This method is suitable for building and updating national and international databases, which is an important advantage for studying outbreaks occurring in several countries. The challenge is now to be able to standardize the technique. A first step for the standardization between laboratories has already been done with the *S. Typhimurium* serovar [20, 29, 30]. The criteria for setting MLVA protocols and for the evaluation of studies using this technique are now available as a guideline [31]. Another challenge for the future is to set up a MLVA technique using a panel of markers allowing genotyping of a large variety of salmonella serovars.

References

1. Euzéby JP (2005) Salmonella nomenclature. [Http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html//contents](http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html//contents)
2. Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL (2004) Supplement 2002 (n°46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 155:568-570
3. Popoff MY (2001) Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th edition WHO collaborating centre for collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France
4. Hammerschmidt S, Müller A, Sillmann H et al. (1996) Capsule phase variation in *Nisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*saiD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 20:1211-1220
5. Jordan P, Snyder LA, Saunders NJ (2003) Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp. *BMC Microbiol* 3:23
6. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L et al. (2001) A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 1:2
7. Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E et al. (2003) DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O 157 based on Multiple-Locus variable number tandem-repeats analysis (MLVA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2:12
8. van Belkum A, Scherer S, van Leeuwen W et al. (1997) Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 65:5017-5027
9. Pourcel C, Vidgop Y, Ramié F et al. (2003) Characterization of tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol* 41:1819-1826

10. Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF et al. (2002) Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiol* 148:519-528
11. Liao JC, Li CC, Chiou CS (2006) Use of a multilocus variable-number tandem repeat analysis method for molecular subtyping and phylogenetic analysis of *Neisseria meningitidis* isolates. *BMC Microbiol* 6:44.
12. Sabat A, Malachowa N, Miedzobrodzki J et al. (2006) Comparison for PCR-based methods of typing *Staphylococcus aureus* isolates *J Clin Microbiol* 44:3804-3807
13. Koeck, JL, Njanpop-Lafourcade BM, Cade S et al. (2005) Evaluation and selection of tandem repeat loci for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. *BMC Microbiol* 5: 66
14. Lindstedt BA, Heir H, Gjernes E et al. (2003) DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem loci. *J Clin Microbiol* 41:1469-1479
15. Ramisse V, Houssou P, Hernadez E et al. (2004) Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp *enterica* for typing purpose. *J Clin Microbiol* 42:5722-5730
16. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L et al. (2004) Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 59:163-172
17. Liu Y, Lee MA, Ooi EE, Mavis Y et al. (2003) Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats. *J Clin Microbiol* 41:4388-4394
18. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J et al. (2007) Comparaisn of mutiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phase typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *J Clin Microbiol* 45: 536-543
19. Malorny B, Junker E, Helmuth R (2008) Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *BMC Microbiol* 8:84
20. Torpdahl M, Sørensen G, Ethelberg S et al. (2008) A regional outbreak of *Salmonella* Typhimurium in Denmark and identification of the source using MLVA typing. *Euro Surv* 11: 134-136
21. Hopkins KL, Maguire C, Best E et al. (2007) Stability of multiple-locus variable-number tandem repeats in *Samonella enterica* serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* 45:3058-3061
22. Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences *Nuc Acids Res* 27: 573-580.
23. Dencœud F, Vergnaud G (2004) Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics* 5: 1471-2105
24. Yazdankhah SP, Lindstedt BA (2007) Variable number tandem repeat typing of bacteria. *Methods Mol Biol* 396:395-405
25. Witonski D, Stefanova R, Ranganathan A at al. (2006) Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. *J Clin Microbiol* 44:3849-3854
26. Davis MA, Baker KNK, Call DR et al. (2009) Multilocus variable-number tandem-repeat method for typing *Salmonella enterica* serovar Newport. *J Clin Microbiol* 47:1934-1938
27. Octavia S, Lan R (2009) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Clin Microbiol* 47:2369-2376
28. Gilbert GL (2008) Using MLVA to type strains of *Salmonella* Typhimurium in New South Wales. *NSW Pub Health Bull* 9:29-30
29. Lindstedt BA, Torpdahl M, Nielsen EM et al. (2007) Harmonization of the multiple-locus variable-number tandem repeat analysis method between Denmark and Norway for typing *Salmonella* Typhimurium isolates and closer examination of the VNTR loci. *J Appl Microbiol* 102:728-35.
30. Larsson JT, Torpdalh M, Petersen RF et al. (2009) Development of a new nomenclature for *Salmonella* Typhimurium multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill* 14:1-5
31. Vergnaud G, Pourcel C (2009) Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol Biol* 551:141-158

Table 1 Directory of VNTRs markers described from 2003 to 2009 for MLVA analysis to discriminate *Salmonella* subspecies

Year of utilization [reference]	Marker name									
2003 [14]	STTR1	STTR2	STTR3	STTR4	STTR5	STTR6	STTR7	STTR8		
2003 [17]	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5					
2004 [16]			(STTR3)		(STTR5)	(STTR6)			STTR9	STTR10pl
2004 [15]	Sal11 (TR1)	Sal02	Sal04	Sal06	Sal16 (STTR5)	Sal10	Sal15	Sal20	Sal22 (TR5)	Sal23
2006 [25]	819457L-819457R	2341937L-2341937R (STTR2)	3629542L-3629542R (STTR3)	2628542L-2628542R	3184543L-3184543R (STTR5)	2730867L-2730867R (STTR6)	2531837L-2531837R	3414090L-3414090R (STTR8)	4596419L-4596419R	4810628L-4810628R
2007 [18]	SE-10 (STTR1)	SE-2	SE-6 (STTR3)	SE-3	SE-5 (STTR5)	SE-4	SE-7	SE-8	SE-9	SE-1
2008 [19]	SENTRI (STTR1) (SE-10)		SENTRI3	SENTRI4 (SE-1)	SENTRI5 (STTR5) (Sal16) (3184543L-3184543R) (SE-5)	SENTRI6 (SE-2)	SENTRI2 (STTR7)		SENTRI7 (SE-9)	
2009 [26]	NEWPORT-A	NEWPORT-B	NEWPORT-M	NEWPORT-L	(STTR5)	(STTR6)				
2009 [27]		(Sal02)		(Sal06)	(Sal16)	(Sal10)			TR4500	TR4699

In parenthesis, markers either already used in previous reports or located within identical VNTR loci with new developing markers

Table 2 Characteristics and specifications of *Salmonella enterica* markers described in the literature from 2003 to 2009

VNTR locus	Locus (alias) [reference]	Reference strain_location_size_copy number of TR	Left (F) and right (R) primers	PCR band (bp)	Gene	DI (CI95%)
1	STTR1[14]	LT2_815055_21bp_15U	F-CAGCAGTACAACCGTCAGCAGGAT R-GCCCCACCGTTAGCGCCCGATGTA	770	<i>tolA</i>	Na
	SE-10[18]	LK5_774282_45bp_3.9U ^c and PT4_774282_45bp_8.1U ^d	F-GCTGAGATCGCCAAGCAGATCGTCG R-ACTGGCGCAACAGCAGCAGCAACAG	Not indicated	<i>tolA</i>	0.05 ^a
	SENTR1 [19]	PT4_774282_45bp_7.8U and 07-2642_774282_45bp_7.8U ^d	F-GCAACAGCAGCAGCAACAG R-CCGAGCTGAGATCGCCAAG	440(415)	<i>tolA</i>	0.07 ^a
2	STTR2[14]	LT2_2341937_60bp_10U	F-GGGTTCCTTCCAGATTACG R-TTTACCCGCGCATATTACCACACT	711	<i>sspH2</i>	Na
	2341937L-2341937R[25]	LT2_2341937_60bp_10.3U	F-GTGGGTTCCTTCCAGATTT R-TTACCCGCGCATATTACCAC	712	<i>sspH2</i>	Na
3	STTR3[14]	LT2_3629458_33bp_10U	F-CCCCCTAAGCCCGATAATGG R-TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	490	<i>bigA</i>	0.25 ^a
	3629542L-3629542[25]	LT2_3629542_33bp_10.9U	F-GAAAAACGCGCAAACTCTC R-GCCACTGGTTGTCCTGTTCT	751	<i>bigA</i>	0.720(0.622-0.818) ^b
	SE-6[18]	LK5_3511025_33bp_10.8U and PT4_3511025_33bp_10.8U ^d	F-CCCCTAAGCCCGATAATG R-GCCGTTGCTGAAGGT	Not indicated	<i>bigA</i>	0.07 ^a
4	STTR4[14]	LT2_2630632_189bp_5U	F-GGCGCCGCTATGGGTGGTGTA R-CAAAAAGCGGTAGCGATGAGC	1,138	<i>shdA</i>	Na
5	STTR5[14]	LT2_3184543_6bp_13U	F-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT R-GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	259	<i>yohM</i>	0.87 ^a
	Sal16(STTR5) [15]	CT18_3041_6bp_14U Ty2_3027_6bp_16U LT2_3184_6bp_15U	F-CCATGGCTGCAGTTAATTTCT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	224 236 230	<i>yohM</i>	0.834 ^a
	3184543L-3184543R[25]	LT2_3184543_6bp_13.3U	F-TTATTATTCTGAGCACCGCGT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	205	<i>yohM</i>	0.871(0.830-0.911) ^b
	SE-5 [18]	LK5_3073233 ^f PT4_3073233_6bp_11.8U ^d	F-CCATGGCTGCAGTTAATTTCT R-TGATACGCTTTTGACGTTGC	Not indicated	<i>yohM</i>	0.77 ^a
	SENTR5 [19]	PT4_3073233_6bp_10U and 07-2642_3073233_6bp_10U ^d	F-CACCGCACAATCAGTGGAAC R-GCGTTGAATATCGGCAGCATG	271(270)	<i>yohM</i>	0.65 ^a
6	STTR6[14]	LT2_2730867_6bp_13U ^d	F-TCGGGCATGCGTTGAAA R-CTGGTGGGAGAATGACTGG	342	Prophage related	0.90 ^a
	2730867L-2730867R[25]	LT2_2730867_6bp_13.7U	F-TGCTGAGCATAAACGACATCA R-CAGCACCAGAAGCAATGGTA	168	Intergenic	0.816(0.755-0.877) ^b
7	STTR7[14]	LT2_1039570_39bp_8U	F-CGCGCAGCCGTTCTCACT R-TGTTCCAGCGCAAAGGTATCTA	594	<i>ftsK</i>	Na

8	SENTR2 [19]	PT4_954671_3bp_9.3U and 07-2642_954671_3bp_9.3U ^d	F- CACTGGACGATCTGGATTTCTC R-GTCGCCGTTACGCATCAAC	519(510)	<i>ftsK</i>	0.07 ^a
	STTR8[14]	LT2_3414113_116bp_4U	F-TTATGTCACCACGGCTGTCAAT R-AAGGCCAAATAGGGGTTTCATAAGG	925	No information	Na
9	3414090L- 3414090R[25]	LT2_3414090_116bp_6.5U	F-AATTAATTGCCGGATGGTGA R-AGCGATTGCTGGCCTAGAT	841	Intergenic	0.497(0.411-0.583) ^b
	STTR9[16]	LT2_3246672_9bp_3U ^d	F- AGAGGCGCTGCGATTGACGATA R- CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC	163	Intergenic	0.51 ^a
10	STTR10pl[16]	pSLT_53711_9bp_13U ^d	F-CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG R-GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC	364	Intergenic	0.92 ^a
11	TR1[17]	CT18_2017115_7bp_12U	F- AGAACCAGCAATGCGCCAACG A R- CAAGAAGTGCGCATACTACACC	261	Intergenic between <i>yedD</i> and <i>yedE</i>	0.834 ^a
	Sal11(TR1) [15]	CT18_2017_7bp_12U Ty2_1009_7bp_11U LT2_2053_7bp_2U	F-GCCAACGATCGCTACTTTTT R-GCGCATACTACACCGATCAC	239 232 169	Intergenic between <i>acrD</i> and <i>yffB</i>	0.466(0.345-0.587) ^b
12	TR2[17]	CT18_2556810_8bp_27U	F- CCCTGTTTTTCGTGCTGATACG R- CAGAGGATATCGCAACAATCGG	511	<i>acrD</i>	0.964 ^a
13	TR3[17]	CT18_2926145_27bp_3.3U	F-CGAAGGCGGAAAAACGTCCTG R-TGCGATTGGTGTCTTTCTA C	545	Intergenic	Na
14	TR4[17]	CT18_4396728_13bp_2.1U	F-AAAAGCCCGTCTAGTCTTGACG R-ATCCTTCGGTATCGGGGTATCC	421	Intergenic	Na
15	TR5[17]	CT18_4624169_7bp_4.7U	F-TGAAAACCGGCTCGTAGCAGTG R-CATACGGTTACTGCGGGATTGG	194	Intergenic	Na
	TR5(Sal22) [15]	CT18_4624_7bp_6U Ty2_4607_7 bp_4U LT2_4645_7bp_3U	F-GCCAGAGGGTTCATTTTCAA R-ATGCGACGCCGTTTACTAC	184 170 163	Intergenic	0.473(0.425-0.521) ^b
16	Sal02[15]	CT18_666_6 bp_10 U Ty2_2315_6 bp_15 U LT2_0681_6bp_3U ^f	F-GGAAAGACTGGCGAACAAT R-TCGCCAATACCATGAGTACG	149 179 107	<i>citT</i>	0.927 ^a
	Sal04 [15]	CT18_0740_20bp_2U Ty2_2240_20bp_2U LT2_0764_20bp_1U ^f	F-TCGCACAGATGACCAATTTT R-GATCGACGCTCACTGCTTC	194 194 174	<i>speF</i>	0.406(0.322-0.490) ^b
18	Sal06 [15]	CT18_0764_6 bp_5U Ty2_2216_6 bp_6U LT2_0789_6pb_3U	F-TTGGTCGCGGAACTATAACTG R-CTTCGTCTGATTGCCACTCC	174 180 162	STY0765	0.244 ^a
	Sal10 [15]	CT18_2016_12 bp_2U Ty2_1009_12 bp_2U LT2_2053_12pb_3U	F-AAGCGACGTTCTTCTGCAAC R-TGGAATATGATGGCATGACG	196 196 208	<i>yedD</i>	0.024 ^a
20	Sal15 [15]	CT18_2917_12bp_2U ^f	F-GTGACCGGTTGAGTTTGCAT	189	<i>nlpD</i>	0.418(0.344-0.493) ^b

		Ty2_2903_12bp_2U ^f	R-GGCAGGTTGTACCAGTTCGT	189		
		LT2_3067_12bp_3U		201		
21	Sal20[15]	CT18_3643_3bp_16U	F- CAGCCGACACAACCTTAACGA	193	<i>ftsN</i>	0.864 ^a
		Ty2_3629_3bp_17U	R- ACTGTACCGTGCGCGTTT	196		
		LT2_4301_3bp_10U		175		
22	Sal 23[15]	CT18_4738_12bp_3.3U	F-CCCGCACACTAAGGAGAGAC	262	STM4518	0.496(0.471-0.522) ^b
		Ty2_4721_12bp_3.3U	R-ACCGCGTTAGTGGCTAACAT	262		
		LT2_4774_12bp_3U		250		
23	819457L-	LT2_819457_155bp_3.6U	F-ATCCAAGGGGTCGTTAGCTC	716	<i>LysZ</i>	0.469(0.388-0.549) ^b
	819457R [25]		R-ACGTAGCCCCGTATCTGATG			
24	2531837L-	LT2_2531837_117bp_2.7U	F-CCCTATAATGCGACTCCACA	400	<i>valU</i>	Na
	2531837R [25]		R-GAACCTGCGACCAATTGATTA			
	SE-4 [18]	LK5_2530891_117bp_2.7U ^c and PT4_2530891_117bp_2.7U ^c and ^d	F-ACTTTAGAAAAATGCGTTGAC	Not indicated	<i>valU</i>	0.05 ^a
25	2628542L-	LT2_2628542_36bp_4U	R-AAGTCAACTGCTCTACCAAC	363	<i>shdA</i> , STM2513	0.529(0.401-0.658) ^b
	2628542R[25]		F-GCCATCGGCATTACGATACT			
26	4596419L-	LT2_4596419_232bp_2.3U ^c	R-GAGGTTAACGCCGGTCTGTA	892	STM4351	Na
	4596419R[25]		F-TGTTGTGGCACCGTGCTAT			
27	4810628L-	LT2_4810628_118bp_2.8U	R-CGCCCTGGGATAAGTCTGT	521	STM4552+ Leu+LeuQ	Na
	4810628R[25]		F-TTGGCAATGATGAAGTGGAA			
28	SE-1[18]	LK5_2504795_7bp_4.9U and PT4_2504795_7bp_4.9U ^d	R-GCAAAGCGTCTTATCCAACC	Not indicated	None identified	0.62 ^a
	SENTR4 [19]	PT4_2504795_7pb_4.9U and 07-2642_2504795_7pb_4.9U ^d	F-AGACGTGGCAAGGAACAGTAG	120(120)	Putative bacteriophage tail proteine, STY631a homologue	0.63 ^a
			R-CCAGCCATCCATACCAAGAC		None identified	
29	SE-2[18]	LK5_4617691_7bp_4.7U and PT4_4617691_7bp_5.7U ^d	F-GACCAACACTCTATGAACCAATG	Not indicated	None identified	0.73 ^a
	SENTR6 [19]	PT4_4617691_7bp_5.1U and 07-2642_4617691_7bp_5.1U ^d and ^f	R-CTTCGGATTATACCTGGATTG	180(177)	Non-coding	0.64 ^a
30	SE-3[18]	LK5_2048155_12bp_4U and PT4_2048155_12bp_3U ^d	R-TGGACGGAGGCGATAGAC	Not indicated	Non identified	0.54 ^a
31	SE-7[18]	LK5_2961372_61bp_8.5U and PT4_2961372_61bp_8.5U ^d	R-AGCTTCACAATTTGCGTATTTCG	Not indicated	<i>ygbF</i>	0.60 ^a
32	SE-8[18]	LK5_2812703_87bp_1U ^f and PT4_2812703_87bp_1U ^d and ^f	F-GATAATGCTGCCGTTGGTAA	Not indicated	None identified	0.45 ^a
33	SE-9[18]	LK5_533269_9bp_2.1U and PT4_533269_9bp_3.1U ^d	R-ACTGCGTTTGGTTTCTTTTCT	Not indicated		
	SENTR7 [19]	PT4_533269_9bp_3.1U and 07-2642_533269_9bp_3.1U ^d	F-TTGCCGCATAGCAGCAGAAAGT	135(133)	<i>ushA</i>	0.53 ^a
			R-GCCTGAACACGCTTTTAAATAGGCT		<i>ushA</i>	0.51 ^a
			F-CGTAGCCAATCAGATTCATCCCGCG			
			R-TTTGAAACGGGGTGTGGCGCTG			
			F-ACGATCACCACGGTCACTTC			
			R-CGGATAACAACAGGACGCTTC			

34	SENTR3	PT4_1697206_93bp_4.4U and [19]	F-CTAAACAAGCCGCTCATCCG R-ACAACCTGCTGCTGTGCTG	494(480)	STM1457 homologue	0.07 ^a
35	NEWPORT-A	SL254_345443_9bp_10.2U ^d [26]	F-ACTGAAAGGAAGGGGAGAGC R-GTCAGGGTGGAATAGAATGC	429	Hypothetic protein	Na
36	NEWPORT-L	SL254_2530997_51bp_3.1U ^d [26]	F-GAAGTACCGAAGTGGGTGAT R-CGTCCGTTAGAGGAACGTAT	529	<i>XapR</i>	Na
37	NEWPORT-B	SL254_373255_12bp_2.1 ^d [26]	F-GGCCGATATAGCTCAGTTGG R-GAACCTCGCTTAGGGTTGTG	350	<i>tSX</i>	Na
38	NEWPORT-M	SL254_2629198_36bp_2.1U ^d [26]	F- GGTCATAGAGGGTCTGCAT R-ATGGAGCACAGACCACTAAC	378	<i>RatB</i>	Na
39	TR4500[27]	CT18_4500182_6bp_5U ^{d and f}	F-CGTTGCTGCTCCGAAAT R-GCGGTGAAGTGAAAAAG	294-366	STY4635	0.691 ^a
40	TR4699[27]	CT18_4699223_6bp_23U ^d	F-TATTCTACTTCAGTCCCCC R-AACCTCCCTGTATCTACCAA	163-307	<i>sefC</i>	0.947 ^a

^a DI described in published reports

^b DI and 95% CI were estimated by using the webpage www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl, when allele string data were available

^c Partial sequence

^d TR genome position of these loci were obtained by TRF program

^e Primers not matching position with reference strains

^f No TR found using primers described by authors using TRF program

Na allele string data unknown

DI Diversity index

95% CI Confidence interval for 95%

3^{ème} publication en cours au BMC Microbiology :

BMC Microbiology :

MLVA polymorphism of *Salmonella enterica* subspecies isolated from humans, animals, and food in Cambodia

RUNNING TITLE: MLVA POLYMORPHISM OF SALMONELLA ISOLATES IN CAMBODIA

Kruy Sun Lay^{*}, Hélène van Cuyck, Alexandra Granger Farbos, Philippe Leroy, Yith Vuthy, Bertrand Guillard, Jean Louis Sarthou and Jean Louis Koeck

Address: Institut Pasteur du Cambodge, 5 Bd Monivong, BP 983, Phnom Penh, Cambodia.
and Hôpital d'Instruction des Armées Robert Picqué, Service de Biologie Clinique, Villnave
d'Ornon Bordeaux, France

E-mail: ksunlay@pasteur-kh.org- helenevancuyck@yahoo.fr- agfarbos@gmail.com- -
pleroy@gmail.com-yvuthy@pasteur-kh.org-bguillard@pasteur-kh.org- jlsarthou@pasteur-
kh.org -jlkoeck@gmail.com

***Corresponding author**

ABSTRACT

Background: *Salmonella* (*S.*) *enterica* is the main cause of salmonellosis in humans and animals. The epidemiology of this infection involves large geographical distances, and strains related to an episode of salmonellosis therefore need to be reliably discriminated. Due to the limitations of serotyping, molecular genotyping methods have been developed, including Multiple loci Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis (MLVA). In our study, 11 Variable Number Tandem-Repeats markers were selected from the *S. enterica* Typhimurium LT2 genome to evaluate the genetic diversity of 206 *S. enterica* strains collected in Cambodia between 2001 and 2007.

Results: Thirty-one serovars were identified from three sources: humans, animals and food. The markers were able to discriminate all strains from 2 to 17 alleles. Using the genotype phylogeny repartition, MLVA distinguished 107 genotypes clustered into two main groups: *S. enterica* Typhi and other serovars. Four serovars (Derby, Schwarzengrund, Stanley, and Weltevreden) were dispersed in 2 to 5 phylogenetic branches. Allelic variation within *S. enterica* serovars was represented using the minimum spanning tree. For several genotypes, we identified clonal complexes within the serovars. This finding supports the notion of endemo-epidemic diffusion within animals, food, or humans. Furthermore, a clonal transmission from one source to another was reported. Four markers (STTR3, STTR5, STTR8, and Sal20) presented a high diversity index ($DI > 0.80$).

Conclusions: In summary, MLVA can be used in the typing and genetic profiling of a large diversity of *S. enterica* serovars, as well as determining the epidemiological relationships of the strains with the geography of the area.

Background

Salmonella enterica subspecies underlies many foodborne diseases, and numerous typing methodologies have been developed to trace the etiological agents of *Salmonella* outbreaks and to determine the epidemiological distribution of salmonellosis. Generally, meat, poultry, and eggs are considered as the primary vehicles of transmission. The O antigens and phase H flagella characterization are the commonly used approaches for serotyping *Salmonella* isolates [1]. However, these techniques are extremely variable and prone to recombination, resulting in over 2,579 *S. enterica* serovars [2]. *Salmonella* epidemics usually last long time and involve the predominant epidemic strains over large geographical distances. However, the discrimination between epidemiologically related and unrelated *S. enterica* strains needs to be optimized. The introduction of molecular methods to type *S. enterica* inter-serovars and intra-serovars demonstrated their reproducibility and discriminatory properties as well as the limitations of chromosome- and plasmid-based typing methods [3, 4].

Complete genome sequences are now available for many bacteria, including some *S. enterica* strains [4, 5, 6, 7, 8]. These can be used to determine DNA-motif sequences through Multiple-loci Variable-Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis (MLVA), which has a high capacity for discrimination. A database of tandem repeats for several completed *Salmonella* genome sequences is available (<http://minisatellites.u-psud.fr>) [9]. The repeat motifs may vary in size, location, and repeat mode. DNA short tandem repeats (TR) have been recognized as a mechanism of adaptation associated with bacterial outer-membrane proteins, and are also found in coding or promoter regions of genes related to the biosynthesis of surface antigens [10].

Using *S. enterica* Typhi, *S. enterica* Typhimurium, and *S. enterica* Enteritidis as reference strains, a large panel of VNTRs markers using MLVA technique tested different serovars of *S.*

enterica using human and environmental samples from different geographic origins [4, 6, 11]. In Asia, a collection of *S. enterica* Typhi isolates from sporadic cases in different countries (Singapore, India, Malaysia, Nepal, and Bangladesh) was tested to select a specific VNTR panel for the *S. enterica* serovar [13]. To date, 58 VNTRs markers have been described, but only a few of these are still being used [5]. Studies of VNTRs have been applied to the *S. enterica* subspecies *enterica* serovar for polymorphism and typing purposes [4], and to determine relationships with foodborne outbreaks [12, 13, 14]. Several *S. enterica* Typhimurium outbreak studies have demonstrated the use of the MLVA system in identifying the source of infection [12, 14]. These have been developed from the genotyping and phylogenetic analyses of the *S. enterica* serovars Typhimurium [6, 7], Typhi [11], and Enteritidis [15].

In the present study, we investigated the genetic distribution of 31 *Salmonella enterica* serovars from different sources (human, animal, and food) using MLVA. This was done by selecting a set of 11 VNTR loci that were tested to determine the genetic diversity of strains isolated in Phnom Penh, Cambodia. The choice of the VNTR loci and the multiplicity of the serovars may contribute to the evaluation of the genetic framework of the *Salmonella* genus. Furthermore, sequence analysis of VNTR loci was employed to investigate different patterns of tandem repeats.

Results

The set of 11 VNTR loci was used to discriminate 31 serovars represented by 206 isolates. The LT2 reference DNA, tested as an internal control, gave identical VNTR genotypes with the expected amplified product sizes (Table 1), thus demonstrating the reproducibility of the system.

Some serovars present an exclusive and specific allele depending on the marker used. The *S. enterica* Choleraesuis isolates specifically presented a 331 bp fragment using STTR3 and a

245 bp fragment using STTR8. The *S. enterica* Typhi isolates presented a 205 bp fragment using TR1 marker. The *S. enterica* Enteritidis isolates presented a 407.5 bp fragment with STTR3 and the *S. enterica* Indiana isolates presented a 289 bp fragment with STTR5. For *S. enterica* Typhi, the size of the amplicons was very conservative for all markers.

With the Sal06 marker, PCR amplification was negative for 3 out of 5 Albany isolates, 3 out of 7 Braenderup isolates, 4 out of 6 Choleraesuis isolates, 3 out of 9 Corvallis isolates, 6 out of 8 Hvittingfos isolates, 2 out of 2 Kentucky isolates, and 1 out of 4 Ohio isolates. PCR for the Sal23 and STTR8 markers were negative for the Choleraesuis serovar and PCR for the STTR8 marker was negative for the Mbandaka serovars. All Typhi isolates were differentiated from the other serovars by the Sal06 and TR1 markers. Using the Sal15 marker, a 189 bp amplicon was obtained for the Choleraesuis, Lexington, Wansworth, and Typhi serovars, and a different size was obtained for the other serovars. The Sal23 marker distinguished the Albany, Braenderup, Corvallis, and Typhi serovars from the others.

To validate the organization of amplified fragments having an unexpected TR length, DNA sequence analysis was performed for the following markers: Sal06, Sal15, Sal20, STTR3, STTR5, STTR7, and STTR8. Fifty fragments were amplified from samples corresponding to 16 serovars and the sequences obtained were compared to the LT2 reference strain. There were three possible compositions of VNTR loci: (i) DNA fragments harboring expected repeat motifs, (ii) DNA fragments of unexpected length with insertion or deletion within the motif, or (iii) DNA fragments of unexpected length with repeat motifs. PCR bands that had a proportional size of motifs were observed using the Sal20, STTR3, STTR5, STTR7, and STTR8 markers. Some fragments of unexpected length presented with copies of repeat motifs that were associated with insertion or deletion of fragments (Figure 1). For example the *S. enterica* San Diego (SA_01_06A) presented four units in the STTR8 VNTR with an insertion of a 733 bp length fragment in the third one (Figure 1A). In addition, one Paratyphi B (SA_03_01B) isolate presented with 13 RT in the STTR5 VNTR, whereas the *Salmonella*

Paratyphi B SBP7 reference strain presented two matches left at position 3145646 and 3022019, whereas no matches right position (Figure 1B).

Allelic variability for all strains and sources was assessed for 11 markers using MLVA. VNTR loci displayed a wide range of polymorphism ranging from 2 to 17 alleles (Table 2). The global index of diversity was closed to one (DI= 0.988), indicating that the 11 markers had a high discriminatory effect. A high global diversity index was found for all isolates from three sources indicating a high discriminatory effect between sources: food DI= 0.985, animal DI= 0.985 and human DI= 0.894.

Four (Sal20, STTR3, STTR5, and STTR8) out of the 11 markers that were tested in this study were highly polymorphic for the 31 *Salmonella* serovars and discriminatory for all strains (DI> 0.80). A large allelic-diversity range was observed for all strains using Sal20, STTR3, STTR5, and STTR8. The STTR5 in *yohM* gene had short repeat copies (6 bp) and showed the highest allelic size variation with 17 alleles ranging from 6 to 25 repeat motifs. This marker had also a high discriminatory power for all of the isolates (DI= 0.882) regardless of their origin; food DI=0.915, human DI= 0.855, and animal DI= 0.845. The STTR3, STTR8, and Sal 20 markers were poorly discriminant for human isolates (DI<0.8). The STTR3 marker was more discriminant for the food isolates (DI= 0.815) and the STTR8 marker was more discriminant for the animal isolates (DI=0.830). The Sal20 marker was more discriminant for the whole population studied (DI=0.805) than for each origin (0.627 for human isolates, 0.743 for animal isolates, and 0.761 for food isolate). Eight other markers Sal06, Sal10, Sal15, Sal23, STTR7, TR1 (Sal11), and TR5 (Sal22) were less discriminant, whatever the origin of isolates.

The isolates were distributed into 75 genotypes for 133 animal isolates, 24 genotypes for 28 food isolates, and 16 genotypes for 45 human isolates. The isolate population from food was the most diverse, with almost one genotype per isolate, followed by the isolate population

from animals with one genotype for two isolates, and then the human isolate population with one genotype for four isolates.

The categorical coefficient and unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) were used to generate a dendrogram (Figure 2).

The genetic clone *S. serovar Typhi* which was exclusively from humans and rather homogeneous, diverged early from the main group B clustering of 30 *Salmonella* serovars. Group B contains two clonal subgroups, B1 and B2, which are independent from the origin of the isolates. The B1 subgroup included the *Choleraesuis* and *Lexington* serovars. The B2 subgroup was genetically more complex with 28 serovars clustered into subclonal groups B2.1 which included 11 serovars and B2.2 which included 17 serovars (Figure 2).

The *Schwarzengrund* serovar is dispersed in both the B2.1 and B2.2 clusters. With the exception of the *Mbandaka* unique strain, two distinct unequal populations of genotypes can be distinguished in the B2.1 subgroup. Within this subgroup, the *S. enterica* *Weltevreden*, *Derby*, and *Stanley* serovars present several subclones. The B2.2 subgroup is more heterogeneous. These results show that the antigen profile occurs in isolates belonging to several distinct clonal lineages with different evolutionary patterns.

On the basis of the composition of allelic distribution, a phylogenic modeling of the strains using MLVA was deduced by the construction of a minimum spanning tree (MST) (Figure 3).

The 206 isolates (31 serovars) were distributed into 107 genotypes, although MLVA is more discriminant than serotyping. There is a good correlation between genotype and serotype, and two identical genotypes always belong to the same serotype. The degree of diversification was different depending on the serovar. The genotypes differing by one single locus variation (SLV) were clustered. The one-marker difference created clonal complexes which grouped one or several serovars. For example, *Corvallis*, *Bovismordificans*, *Braenderup*, *Kentucky*, *London*, *Monophasic 4, 5: fgt*, *Typhi*, *Paratyphi B*, *Schleissheim*, *Typhimurium*, and *Virchow* serovars, were not very diverged and constituted a serovar clonal complex with one SLV. The

human *Salmonella* Typhi clonal complex differed by eight loci from the closest salmonella serovar (Newport serovar genotype no 25). Other clonal complexes grouped several serovars such as Hvittingfos and Anatum, and Derby and Albany. Clones from the same serovar, such as the Stanley serovar, can be grouped in two separated clonal complexes according to their origin (human or food). Some serovars, in particular the Derby and Stanley serovars are more diverse than others. The human isolates belonged to only five of the 31 serovars present in this study. For each of these serovars, the human isolates belonged to the same clonal complex, which also included animal and food isolates.

Five serovars (Give, Mbandaka, Poona, Sandiego, and Wansworth) are single isolates. The genetic divergence between *Salmonella enterica* serovars included in the analysis was very variable and the serovars differed by two to eight VNTR loci or markers. Within the serovars the MLVA type between genotypes varies by one or two loci and rarely by more than three. However, subclones of *S. enterica* Derby, Schwarzengrund, Stanley, and Weltevreden showed differences in one to seven loci. These results are concordant with the pattern of the dendrogram.

DISCUSSION

MLVA is a reliable method for the molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates causing salmonellosis in humans and animals. The panel of VNTR loci used in this study was determined after reviewing the literature and applied to a collection of isolates obtained from different sources (animal, food or human) without any obvious connection to an outbreak.

This paper reports the MLVA results on a collection of 206 *Salmonella enterica* isolates from Phnom Penh, Cambodia. The study focused on six serovars (Anatum, Enteritidis, Newport, Paratyphi B, Typhi, and Typhimurium) previously analyzed by others using MLVA [4, 6, 15] and 25 untested serovars (Albany, Braenderup, Bovismorbificans, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Give, Hvittingfos, Indiana, Itami, Kentucky, Lexington, London, Mbandaka, Ohio,

Poona, Rissen, Sandiego, Scheissheim, Schwarzengrund, Stanley, Virchow, Weltevreden, Wansworth, and Monophasic 4, 5: fgt), contributing to the follow-up of the genetic diversity of *Salmonella enterica* isolates. With the exception of the Typhi serovars [11], none of the serovars that we studied have been previously analyzed by MLVA in Asia.

The sequencing of PCR bands for analysis of repeat motifs helped to validate the presence and the number of motifs in the amplified fragment and the deletions or insertions in a motif. This was particularly the case for fragments of unexpected length. In our study, the number of repetitions was concordant with allelic variations for small units (< 40 bp). An insertion within a motif for a large amplified fragment (>900 bp) using STTR8 loci was found (figure1). On contrast, other studies had shown insertions at the beginning or the end of the repetition for all of the markers we tested [16]. Using the STTR8 locus, the dispersion of TR for the Typhimurium serovar discriminated two Typhimurium isolates harboring five (4.9) repeats, and eight other isolates harboring seven (6.5) repeats. These results correspond to the findings of previous studies in which four repetitions [6] or six repetitions [16] were reported.

STTR5, STTR3, STTR8, and Sal20 VNTRs, presented with 17, 12, 10, and 11 alleles respectively. These markers showed a high degree of discrimination among all strains with a large allelic distribution. Two markers (Sal06, Sal10) were less discriminatory than previously reported [4, 6]. The TR1 marker had a similar degree of discrimination compared with previous studies of *S. enterica* Typhi [12]. The TR5 marker [4, 12] and STTR7 marker were more discriminatory than previously described [6]. Identical allelic results were observed for Sal15, TR5, and Sal23 loci, which was consistent with other studies [4]. The scope of the number and the diversity of the serovars studied confirmed the allelic scale of the 11 VNTR loci and allowed identification of other alleles. It is remarkable that the most discriminatory markers are involved either in the pathogen-host interaction (antigen virulence) or in the pathogen-environment (cell division) interaction.

The dendrogram findings supported a heterogeneous clone dispersion for a serovar distributed as different branches in the same group (five branches for *S. enterica* Derby, three branches for *S. enterica* Stanley, and two branches for *S. enterica* Weltevreden serovars). For *S. enterica* Schwarzengrund, the distribution was in two different subgroups. Population genetic analysis of allelic variation in chromosomal structural genes has demonstrated that isolates of *Salmonella* of the same serovar are genotypically heterogeneous. For some serovars, groups of genetically distant individuals are observed, appearing as branches (dendrogram) or clonal complexes (MST). In some cases the same serovar may represent two or more highly divergent phylogenetic lineages as previously reported for the *S. enterica* Derby and *S. enterica* Newport serovars [18]. Diversification suggests that the isolate population has evolved for a long time in the more diversified serotypes. The *S. enterica* Typhi population diverged early as previously reported [3], and is less dispersed suggesting a more recent clonal complex within humans. However, this may be also due to either the number of other serovars studied or the collection of isolates from a restricted area, Phnom Penh in Cambodia. In other studies the population of isolates was selected from different countries worldwide, and was therefore more dispersed [4, 12]. The difference of dispersion for the *S. enterica* Typhi serovar indicated that the choice of VNTR depended on the population that was studied. In a homogeneous population including few other serovars [4, 6, 12] a discriminator VNTR should be chosen, whereas in a much diversified serovar population, a panel of discriminant and non-discriminant VNTRs have to be selected.

The representation of the MLVA results using MST dispersed heterogeneous genetic variations of *Salmonella* isolates within the same serovar in SLVs and DLVs as previously reported [4]. Isolates obtained from different sources (human, animal, or food), are genetically linked and showed that *Salmonella* is a highly clonal organism [19]. MST constitutes a convenient tool to study the modalities of salmonella transmission between animals and

humans. It would be interesting to test the hypothesis of an eventual enhanced transmissibility from animals to humans of particular genotypes belonging to the same serovar. For the same serovar, different genotypes may be associated either in a clonal complex, such as the *S. enterica* Corvallis serovars, or as a more diversified complex such as the *S. enterica* Typhimurium serovar. The genotypic dispersion of animal and food *Salmonella* populations was larger than that for human isolates. However, the absence of Enteritidis and Typhimurium serovar in human isolates may reflect a bias in the population that was selected with over-representation of animal strains. Furthermore, a difference of 3 loci in the *S. enterica* Weltevreden clonal complex may indicate a missing chain in the selected population. In the present study, two isolates with the same genotype always belong to the same serovar, proving a good discriminatory effect of the panel's markers.

In conclusion, the MLVA assay using agar electrophoresis is a simple, rapid, and powerful technique to genotype *S. enterica* isolates from human, food, or animal sources. The 11 markers used in this study permitted the subtyping of 107 genotypes from 206 isolates of 31 *Salmonella enterica* serovars. However, four out of the eleven studied markers presented an interest in their discriminatory power and should at least be included in further studies where the choice of other markers will depend on the aim of the study and the serovar being analyzed. The food population presented the largest variation in genotypes, followed by animal, and then human isolates. The results reflect the mode of isolate selection with an over-representation of the animal strain population. MLVA is an important tool for surveillance and investigation of outbreaks of human or animal salmonellosis infections.

Methods

Salmonella strains

Two hundred and six *S. enterica* isolates from 31 serovars collected by the Food Microbiology Laboratory at the Pasteur Institute in Cambodia (IPC) from 2001 to 2007 were

included for MLVA. These strains were isolated from three sources: human (blood or stool), animal (raw poultry, beef, or pig) and food (ready to eat food). For the human samples, the strain distribution was 24 Typhi isolates collected from the Phnom Penh National Pediatric Hospital in 2005 and 26 isolates from the Medical Microbiology Laboratory of IPC collected from 2004 to 2006. The latter was comprised of the following serovars: Derby (n=8), Choleraesuis (n=5), Typhi (n=5), Stanley (n=2), and Typhimurium (n=1). For the animal samples, the selection of isolates was based upon the most frequently represented serovars from the same source. One hundred and thirty three isolates were selected from two previous studies in Phnom Penh: 27 *S. enterica* isolates (32.9%) were selected as a representative sample of the 82 isolates from raw pork and beef obtained during a study performed in city slaughter-houses from June 2003 to March 2004, and 106 *Salmonella enterica* isolates (46.9%) were selected from 228 strains isolated from raw poultry during a one-year study in city markets (March 2006 to February 2007). The representative serovars were Anatum (n=15), Derby (n=13), Enteritidis (n=11), Typhimurium (n=9), Corvallis (n=8), Schwarzengrund (n=8), and other serovars (n=69). From 2001 to 2007, a total of 28 *S. enterica* isolates were collected from ready to eat food and were included in the assay. These were comprised of the following serovars: Weltevreden (n=4), Derby (n=3), Lexington (n=3), Newport (n=3), Hvitittingfos (n=3), and other serovars (n=11). Each strain was isolated from a single sample.

All strains were serotyped according to the Kauffmann-White scheme [2]. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 reference strain (GenBank no.AE006468) was purchased from the Collection de l'Institut Pasteur (CIP 60.62, ATCC 43971).

DNA preparation

The phenol chloroform and alcohol method [19] was used to extract DNA from the salmonella isolates and the reference strain. Concentrations of DNA were measured using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE 19810, USA).

Selection and amplification of VNTRs

Eleven VNTR markers were selected according to their performances evaluated through literature [4, 5, 6, 11]. The panel of markers was a mix of less discriminant but relevant markers, to differentiate the main branches of the phylogenetic tree, and highly discriminant markers to distinguish isolates at a micro epidemiological level. Each marker was also characterized by its high typability, reproducibility, and genetic stability [8] (Table 1). After PCR amplification, the amplicon was identified by agarose gel electrophoresis. The theoretical sizes of the fragments and TR copies were determined using the BLAST program and the LT2 salmonella sequence in the tandem repeat database (TRD) at <http://minisatellites.u-psud.fr>. A TR sequence greater than or equal to 0.5 repeat copies was considered as one copy and a repeat copy less than 0.5 was considered as a zero-repeat copy. All loci without amplification or presenting amplifications without TR still need to be noted and are considered as “0” alleles in the analysis [8, 20].

In addition to the LT2 strain, eight *S. enterica* genomes have been entirely sequenced and are available at <http://minisatellites.u-psud.fr> (*Salmonella enterica* Typhi Ty2, *Salmonella enterica* Typhi CT18, *Salmonella* Choleraesuis SC-B67, *Salmonella* Paratyphi B SBP7, *Salmonella* Paratyphi A strain ATCC9150 and AKU_12601, *Salmonella* Paratyphi C strain RKS4594, and *Salmonella* Arizonae 62z4z23). To strengthen the comparison of PCR fragments obtained from the samples, these were used to compare the fragment sizes in the BLAST program involving the 11 VNTR loci.

Amplifications were performed in 20 µl mixtures containing 2 µl DNA, 0.1 µl GO *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison WI, USA), 0.6 µl left and right flanking primer (Eurogentec

S.A., Seraing, Belgium), 3.2 µl deoxynucleoside triphosphate (Promega, Madison WI, USA), and 4 µl buffer (Promega Corporation, Madison WI, USA). An initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 35 cycles of a three-step cycling protocol (94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min) and a final elongation step at 72°C for 7 min. PCR products (5 µl) were run and visualized on ethidium bromide-2% agarose gel. The amplified fragments containing repeat units with 3 to 7 bp were separated by migration on ethidium bromide 3% agarose gel for 6 h. Allele sizes were compared using PCR fragment standard size markers (EZ Load™ Molecular Rulers, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and LT2 DNA as a control for size assignment of the samples.

Fragment sequencing

To assess the existence of tandem repeats in amplicons which had unexpected bands visualized after migration, 39 amplification products obtained using seven markers were purified (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced (Eurofins MWG Operon, Rossey CDG, France). The consensus sequence from the left and right primer synthesis was then aligned with the corresponding repeat motifs in each locus using the BioNumerics software package (version 3.5; Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). The number of motifs was validated for each fragment.

Data analysis

Allele sizes were converted into tandem repeat numbers and subjected to cluster analysis using the categorical coefficient (BioNumerics software). This parameter and the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) were used to generate a dendrogram and hypothetical genotypes attributed to isolates were included. A minimum-spanning tree (MST) was created. Genetic diversity was measured by the Hunter and Gaston Diversity Index or Nei's Diversity Index (DI) [6]. The most discriminative marker had a DI closest to 1.

Acknowledgements

This work was supported by the Direction of International Affairs, Institut Pasteur, Paris (France) and HIA Robert Picqué, Bordeaux (France). *Salmonella enterica* isolates from humans were proposed to be included in this analysis by the medical microbiology laboratory of National Pediatric Hospital, Ministry of Health, Cambodia.

References

1. Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. ***Escherichia, Shigella and Salmonella***. In PR Murray, Barron E J, Pfaller MA, Tenover, F C and Tenover RH (Ed.). *Man. Clinic Microbiol 1st Ed Am Soc Microbiol* 1999, 459-474.
2. Popoff MY. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 9th edition. 2007, WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France.
3. Kotetishvili M., Stine OC, Kreger A, Morris JG, Sulakvelidze A. **Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains**. *J Clin Microbiol* 2002, **40**:1626–1635.
4. Ramisse V, Houssou P, Hernandez E, Denoeud F, Hilaire V, Lisanti O, Ramisse F, Cavallo JD, Vergnaud G. **Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp *enterica* for typing purpose**. *J Clin Microbiol* 2004, **42**: 5722- 5730.
5. Kruij SL, van Cuyck H, Koeck JL. **Multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies**. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 2010, 2 Nov 2010.
6. Lindstedt BA, Heir H, Gjernes E, Kapperud G. **DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type**

- DT104 based on variable number of tandem loci.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1469-1479.
7. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. 2004. **Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis.** *J Microbiol. Methods* 2004, **59**:163- 172.
 8. Vergnaud G, Pourcel C. **Multiple locus variable number of tandem repeats analysis.** *Methods Mol Biol* 2009, **551**:141-158.
 9. Denoeud, F, Vergnaud G. **Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource.** *BMC Bioinf* 2004, **5**:4.
 10. Jordan P, Snyder LA, Saunders NJ. **Diversity in coding tandem repeats in related *Neisseria* spp.** *BMC Microbiol* 2003, **3**:23.
 11. Liu Y, Lee MA, Ooi EE, Mavis Y, Tan AL, Quek HH. **Molecular Typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:4388-4394.
 12. Isakbaeva, E., Lindstedt, BA., Schimmer, B., Vardund, T., Stavnes, TL., Hauge, K., Gondrosen, B., Blystad, H., Klovstad, H., Aavitsland, P., Nygard, K., Kapperud, G. ***Salmonella* Typhimurium DT104 outbreak linked to imported minced beef, Norway, October-November 2005.** *Euro. Surveill* 2005, **10**:pii=2829.
 13. Malorny B, Junker E, Helmuth R. **Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis.** *BMC Microbiol* 2008, **8**:84.

14. Torpdahl M, Sørensen G, Ethelberg S, Sandø G, Gammelgård K, Porsbo LJ. **A regional outbreak of *Salmonella enterica* Typhimurium Denmark and identification of the source using MLVA typing.** *Euro Surveill* 2006, 5:134-136.
15. Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J, Bartkus JM. **Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis.** *J Clin Microbiol* 2007. 45:536-543.
16. Witonski D, Stefanova R, Ranganathan A, Schutze GE., Eisinach KD, Cave MD. **Variable-number tandem repeats that are useful in genotyping isolates of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport.** *J Clin Microbiol* 2006, 44:3849- 3854.
17. Beltran P, Musser JM, Helmuth R, Farmer JJ, Frerichs WM., Wachsmuth K, Ferri K, McWhorter AC, Wells JC, Cravioto A, Selander RK. **Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: Genetic diversity and relationships among strains of serotypes *Salmonella enterica* Choleraesuis, *Salmonella enterica* Derby, *Salmonella enterica* Dublin, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Infantis, *Salmonella enterica* Newport, and *Salmonella enterica* Typhimurium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 7753-7757.
18. Lan, R, Reeves PR, Octavia S. **Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones.** *Inf Gen and Evol* 2009, 9:996-1005.
19. Torres RDC, Oletta CA, Zlotnik H. **A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *nocardia* spp.** *Clin Diagno Labo Immu* 1996, 3:601-604.
20. Yazdankhah SP, Lindstedt BA. **Variable number tandem repeat typing of bacteria.** *Methods Mol Biol* 2007, 396:395-406.

Table 1: Characteristics of VNTR markers selected from *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (GenBank accession no. AE006468) for PCR amplification

VNTR loci (alias)	Forward (F) and reverse (R) primers	PCR band (bp)_repeats_ size (bp)	Gene	Function
Sal06 [4]	F-TGGTCGCGGAAGCTATAACTG R-CTTCGTCTGATTGCCACTCC	162_3U_6bp	STM0724	Putative glycosyltransferase, cell wall biogenesis
Sal10 [4]	F-AAGCGACGTTCTTCTGCAAC R-TGGAATATGATGGCATGACG	208_3U_12bp	<i>amyA</i>	Cytoplasmic alpha-amylase
Sal15[4]	L-GTGACCGGTTGAGTTTGCAT R-GGCAGGTTGTACCAGTTCGT	201_3U_12bp	<i>nlpD</i>	Lipoprotein
Sal20[4]	F-CAGCCGACACAACCTAACGA R-ACTGTACCGTGCGCGTTT	175_10U_3bp	<i>ftsN</i>	Similar to <i>E. coli</i> essential cell division protein
Sal23 [4]	F-CCCGCACACTAAGGAGAGAC R-ACCGCGTTAGTGGCTAACAT	250_4U_12bp	STM4518	Putative inner membrane protein
STTR3 [6]	F-CCCCCTAAGCCCGATAATGG R-TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA	490_14U_33bp	<i>bigA</i>	Putative surface-exposed virulence protein
STTR5 (Sal16)[4]	F-ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT R-GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT	259_15U_6bp	<i>yohM</i>	Putative inner membrane protein
STTR7[6]	F-CGCGCAGCCGTTCTCACT R-TGTTCCAGCGCAAAGGTATCTA	594_9U_39bp	<i>ftsK</i>	Putative cell division protein
STTR8[6]	F-TTATGTCACCACGGCTGTCAAT R-AAGGCCAAATAGGGGTTTCATAAGG	925_7U_116bp	Intergenic	Non coding
TR1(Sal11) [11]	F-AGAACCAGCAATGCGCCAACGA R-CAAGAAGTGCGCATACTACACC	191_2U_7bp	<i>yedD</i>	Putative outer membrane lipoprotein
TR5(Sal22) [11]	F-TGAAAACCGGCTCGTAGCAGTG R-CATACGGTTACTGCGGGATTGG	173_3U_7bp	Intergenic	Non coding

Table 2: Genetic diversity of 206 *S. enterica* isolates assessed by MLVA using 11 markers

Locus (alias)	Reference strain _genome position_ repeat (bp) _ copy number	Number of alleles	Allele size range in bp	HGDI ^a			
				All (n= 206)	Human (n= 45)	Animal (n= 133)	Food (n= 28)
Sal06	LT2_789139_6bp_3U	3	3, 5 (162 - 174)	0.463	0.524	0.200	0.359
Sal10	LT2_2053093_12bp_3U	3	1, 2, 3 (184 - 208)	0.128	0.044	0.178	0.000
Sal15	LT2_3067414_12bp_3U	3	2, 3 (189 - 201)	0.367	0.411	0.139	0.313
Sal20	LT2_4301685_3bp_10U	11	10,12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 (175 - 217)	0.805	0.627	0.743	0.761
Sal23	LT2_4774034_12bp_3U	3	3, 4 (250 - 262)	0.520	0.244	0.485	0.519
STTR3	LT2_3629458_33bp_14U	12	9, 10, 11.5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22 (325 - 754)	0.828	0.548	0.782	0.815
STTR5 (Sal16)	LT2_3184503_6bp_15U	17	6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 25 (205 - 319)	0.882	0.855	0.845	0.915
STTR7	LT2_1039431_39bp_8U	8	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (360 - 672)	0.739	0.455	0.779	0.735
STTR8	LT2_3414008_116bp_7U	10	2, 3, 4, 5, 6, 7,10 (345 - 1273)	0.830	0.551	0.830	0.755
TR1 (Sal 11)	LT2_2053579_7bp_3U	2	3, 5 (191 - 205)	0.243	0.469	0.000	0.000
TR5(Sal 22)	LT2_4645085_7bp_3U	2	3, 4 (173 - 180)	0.243	0.469	0.000	0.000
Total				0.988	0.894	0.985	0.985
Genotypes				107	16	75	24

^a Hunter and Gaston Diversity Inde

3414053
 5' CGTCTTCTGCACCTCTATACCCTTCA[CCGGCCTGATAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACC
 GATAAGCCGCTTTCTTTGGGTATAGTGTCTGGACAGTCATTCATCCTGT][CGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCAGCTTACA
 CTGACGGGGTTTATGAAGAGATGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTG][CC
 GCCCTGTAAAAGCAATAAATATCCTCCGGCATAGCCGGAGGTTTTCTGATGCGCCTGTAAAGGCTCTTTACCAGCCGCGCCCTAA
 CAGGCGCATACGATCTGACATTTGCATCAAACCTTCGTTACTTACGGCCCGTAAACGGGCTGCCCGGATAAGGGATCGATAATTGCT
 CACCCATTTTATCCTCTTCAAGCTGGTGCTTTATGTAGTCTGTATCTTCGCCGTGTTCTTACCCACCGTATCGACATAGTACCCT
 CTGCACCGAACTCTCTGTTCTGTATTTGAATTTTAGATCCCCAACTGCTCGTAAAGCATCAGACTACTTTTACCCTTCAGATA
 TCCCATGAAGCTCGACACACTCATCTTCGGCGGGATCTCCAGAAGCATGTGAATATGATCTGCACAACATTCCGCTTCCAGGATT
 GTACGTTTTTCCATTACACAATTTCTTAATATGCTACCTACTGCCCTACGCTTCTCTCCATAGAACGCTTGTCTTCGGTATTTG
 GCGCGAAAACTATGTGATATTTACAGTTCCATCGGGTGTGCGCTAAGCTCTTTTCGTCCCCATTGGGACCCCTTTTGATTTCT
 TGTGAACTTTTGCAGTTGCCAGACCGCAAGATGTTTTAACAAATCAAAAGGGGTTTTAATAACTGGCTTAAAGCTGAAAGCTTTC
 CGGAACCCCCAGCCTAGCTGGGGGTTTTCCATAGACAAAAAACCCGCCAGCTTACACTGA[CGGGTTTTATGAAGAGATGATACTG
 ACCGATAAGCCGCTTTCTTTGGGTATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGC][CGCCCTGTAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGC
 GGGTTTTATGAAGAGGTGAAACTGACCGATAAGCCGCTTTCTTTGGACATAGCGTCGTGGACAGTCATTCATCCTGC]CGCCCTG
 TAAAAGCAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTATGAAGAAGTGAAGCTGACCGATAAGCCGGGTTCTGTCGTGGACAGTCATTC 3'
 3415328

Figure 1: Validation of the markers by sequencing of the PCR product.

Figure 1A: *S. enterica* Sandiego (SA_01_06A) sequence obtained using STTR8 marker. The sequences between brackets are TR sequences. The inserted sequence is underlined. Position of the fragment was obtained by comparison of the sequence with the *S. enterica* Typhimurium LT2 reference strain using BLAST program in ncbi.

3145657
 5' AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAAACCATC ATCACG ACCACG ACCACG GCCATG ACCATG ACCATG ACCATG ACCATG ACCATG ACC
 ATG ACCATG ACCATCATGGTCACATA 3'
 3145776

The comparison of sequences between *S. enterica* Paratyphi B (SA_03_01B) 202 isolate and *S. enterica* Typhimurium LT2 (259_15U_6bp) reference strain, reveals a deletion equivalent to two motifs in the 202 (SA_03_01B) isolate.

202	1	AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAA	<u>ACCATC</u>	ATCACG	<u>ACCACG</u>	ACCACG	<u>GCC</u>	-----	48
LT2	3145657	AGCAGCAGTGGCTGGCGGGAAACCATCATCACGACCACGACCACGGCCATGACCATGACC							
202	49	<u>ATG</u>	<u>ACCATG</u>	<u>ACCATG</u>	<u>ACCATG</u>	<u>ACCATG</u>	<u>ACCATG</u>	<u>ACCATG</u>	ATGGTCACA 108
LT2	3145717	ATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATGACCATCATGGTCACA							

3145776

Figure 1B: *S. enterica* Paratyphi B consensus sequence of the 202 (SA_03_01B) isolate obtained using the STTR5 marker. The main sequence of the TR is ACCACG. The underlined sequences are flanking sequences of the repeat motif, colored in red and grey alternatively. The sequence is composed of 12.7 TR, i.e 13 TR.

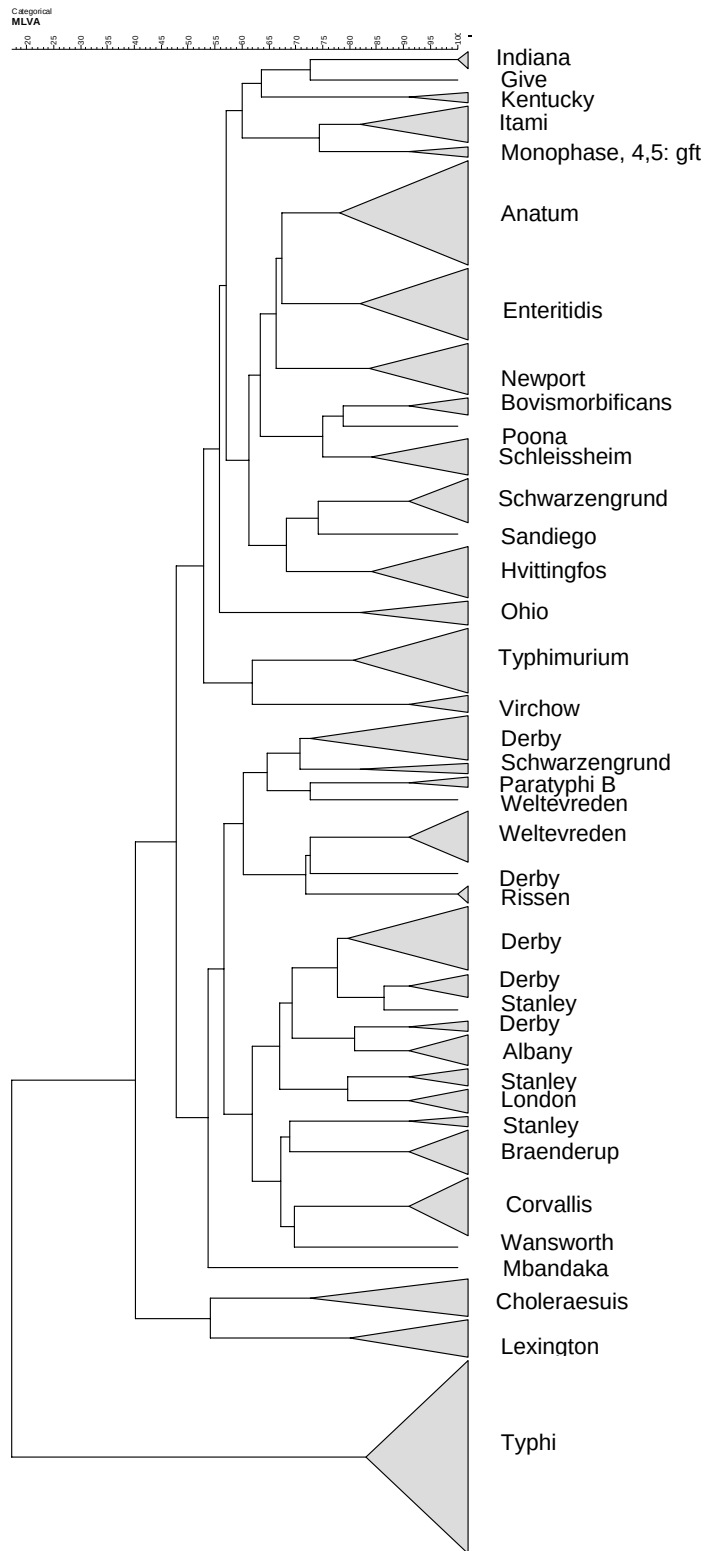


Figure 2: MLVA types distribution of 31 *Salmonella enterica* serovars using the categorical coefficient and the cluster analysis pairwise similarities (UPGMA). The 206 isolates studied were obtained from three sources: humans (medical microbiology laboratory, 2004-2007, IPC and National Pediatric Hospital, 2005), animals (a study of food microbiology laboratory, IPC and Animal Health Department, Ministry of Agriculture, Forest and Fishery, Cambodia, 2003-2004) and from the Action de Concertation Inter-Pasteurienne (poulet project, 2006-2007) and food (food microbiology laboratory, 2001-2007, IPC).

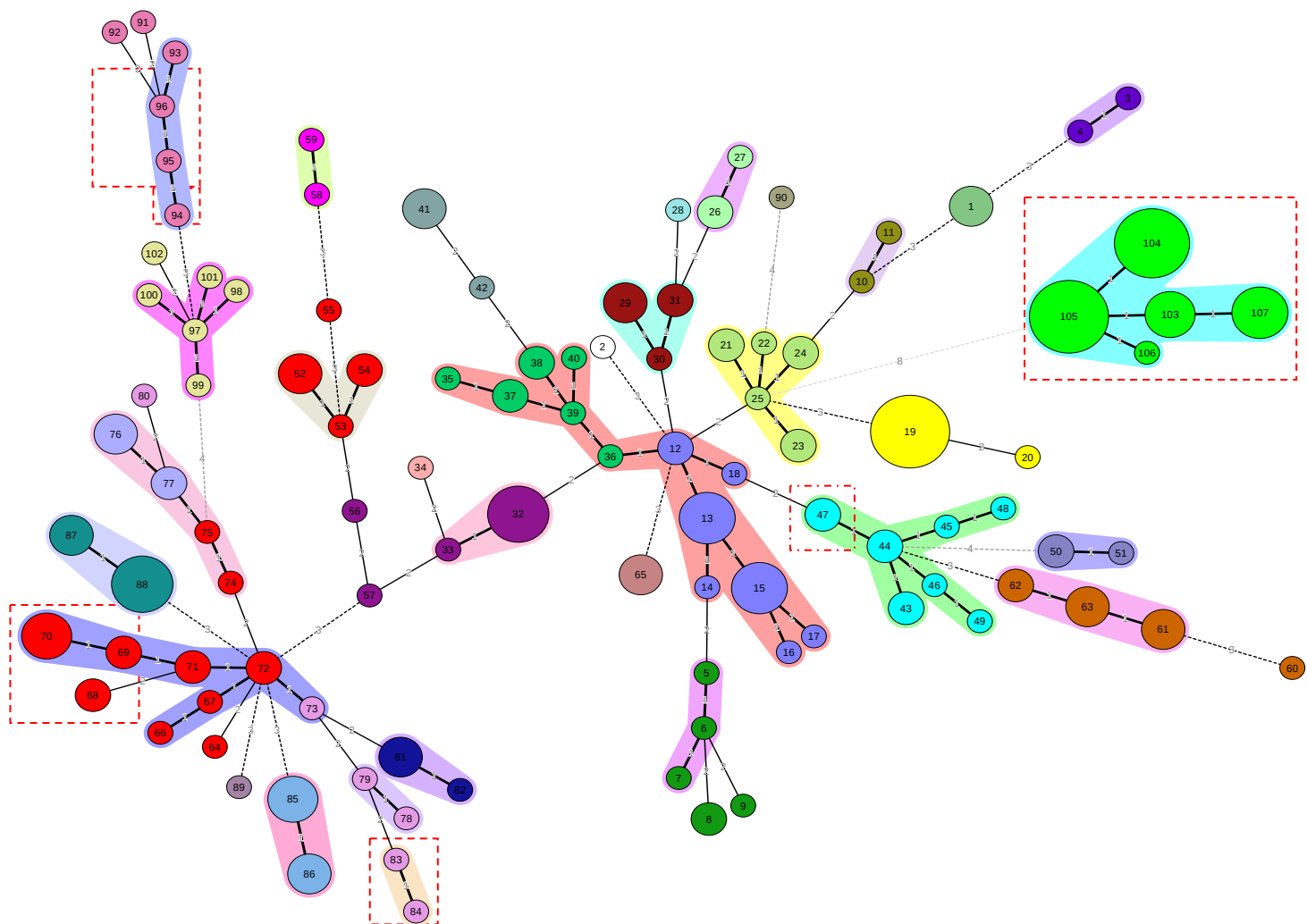


Figure 3: Minimum spanning trees obtained using 11 markers for the polymorphism profile of 206 *Salmonella enterica* subspecies strains discriminated into 107 MLVA types. The MST construction was made using the categorical coefficient. Each circle represents a different MLVA type. Each serovar is shaded with a different color. The size of the circle reflects the number of isolates whereas the distance between the circles represents the genetic divergence (heavy short lines connect SLVs, thin long lines connect DLVs, and dotted lines indicate the connection between 2 allelic distribution types). The number in each circle indicates the genotype. Red dotted squares indicate human isolates. The halos surrounding the various types denote the groupings obtained by Bionumerics analysis. In Bionumerics MLVA clonal complexes were created when genotypes differed in no more than one allele.

MLVA POLYMORPHISM OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES FROM ANIMAL, HUMAN AND FOOD ORIGINS, CAMBODIA, 2001-2007

April 8, 2009

Kruy S.L.¹, H. van Cuyck², A. Granger-Farbos², P. Leroy², Yith V.¹, Ping S.¹, J.L. Sarthou¹, et J. L. Koeck²

1-Institut Pasteur du Cambodge, 5Bd Monivong, Phnom Penh, Cambodia 2- HIA Robert Picqué, Villenave d'Ornon, France.

INTRODUCTION

□ *Salmonella* (*S.*) genus

- Comprise unique specie *S. enterica* subdivided in 6 subspecies including 2541 serovars.
- A major cause of worldwide salmonellosis both in human and animal.
- Existence of antibiotic resistant clones (particularly Ampicilline, Chloramphenicol, Streptomycine, Sulphamide and Tetracycline or ACSSuT clones).
- In Cambodia, the public health problem due to antibiotic-resistance of *S.* is difficult to appreciate.
- Importance of genetic characterization:
 - Genetic diversity for intra-serovars and inter-serovars.
 - Relation between serovars and carriage of antibiotic resistance.

□ Multiple Locus Variable Tandem-Repeat Analysis (MLVA)

- Polymorphism profile.
- Surveillance and Relation to outbreaks.
- Rapid and low cost method

□ Aim of this study

- To analyse the genetic diversity of different serovars.
- To identify the genotypes a collection of *Salmonella* isolates from human, food and animal sources.
- To determine the evolution of the genetic diversity from 2001 to 2007 and to confront genotypes to antibiotic resistance.

MATERIALS AND METHODS

□ Bacterial strains and antibiotic-resistance study

- 207 *S.* isolates from the Food Microbiology Laboratory collection (46 human isolates, 2004-2007; 27 food isolates, 2001-200; and 134 from pork, beef and poultry isolates, 2003-2007) with emphasis on 32 serovars previously serotyped according to the Kauffmann and White scheme.

- 56 human and animal strains were ACSSuT resistant (29 Typhi, 9 Derby, 5 Choleraesuis, 3 Albany, 3 Indiana, 2 Stanley, 2 Typhimurium, 1 Anatum, 1 Enteritidis and 1 Kiel).

□ MLVA

- Markers were selected and MLVA was performed using agar electrophoresis as described in:

- Lindstedt, B. A. and all. 2003. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem loci. J. Clin. Microbiol. **41**: 1469-1479.

- Liu, Y., and all. 2003. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable number tandem repeats. J. Clin. Microbiol. **41**: 4388-4394.

- Ramisse, V., and all. 2004. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purpose. J. of Clin. Microbiol. **42**: 5722-5730.

□ Data analysis

- The genetic diversity was measured by the Hunter-Gaston Diversity Index (DI) on www.mlva.eu.
- Minimum spanning trees and dendrograms were constructed using BioNumerics 5.1 software [coefficient: categorical. Priority rules: maximum number of i) Single-locus variants (SLVs); ii) SLVs and double-locus variants (DLVs); iii) Entries].

RESULTS:1-GENETIC DIVERSITY

Table 1: Genetic diversity of 207 *Salmonella enterica* isolates assessed by MLVA (12 markers).

Locus	Genome position, size of motif and copy number	Alleles	Alleles number (size range, bp)	Index of diversity (DI)			
				All isolates (n: 207)	Human (n:46)	Animal (n:134)	Food (n:27)
Sal 005	LT2_789139_6pb_3U	2	3, 5 (162-174)	0.587	0.527	0.434	0.484
Sal 102	LT2_2063093_12pb_3U	3	1, 2, 3 (184-208)	0.127	0.043	0.178	0.000
Sal 153	LT2_3067414_12pb_3U	2	2, 3 (189-201)	0.379	0.394	0.142	0.325
Sal 207	LT2_4301685_3pb_10U	11	10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 (175-217)	0.806	0.636	0.743	0.761
Sal 223	LT2_4774122_12pb_3U	2	4, 5 (250-262)	0.528	0.237	0.485	0.556
STTR3	LT2_3629481_33pb_1AU	11	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22 (252-754)	0.831	0.545	0.782	0.815
STTR4	LT2_2030562_189pb_1AU and LT2_2629806_189pb_1AU	5	2, 5, 5.5, 6 (382-1138) and 6 (1831)	0.674	0.526	0.646	0.721
STTR5	LT2_3184535_6pb_15U	17	6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25 (205-319)	0.881	0.857	0.845	0.915
STTR7	LT2_1029566_39pb_9U	7	2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (360-472)	0.733	0.464	0.772	0.735
STTR8	LT2_3414090_119pb_7U	7	2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 (345-1273)	0.828	0.562	0.832	0.755
TR1	LT2_2063802_7pb_3U	2	3, 5 (191-205)	0.242	0.476	0.000	0.000
TR5	LT2_4645200_7pb_3U	2	3, 4 (173-180)	0.242	0.476	0.000	0.000
Total				0.986	0.886	0.983	0.989
Genotypes				99	14	71	23

3-MINIMUM SPANNING TREE AND MLVA types

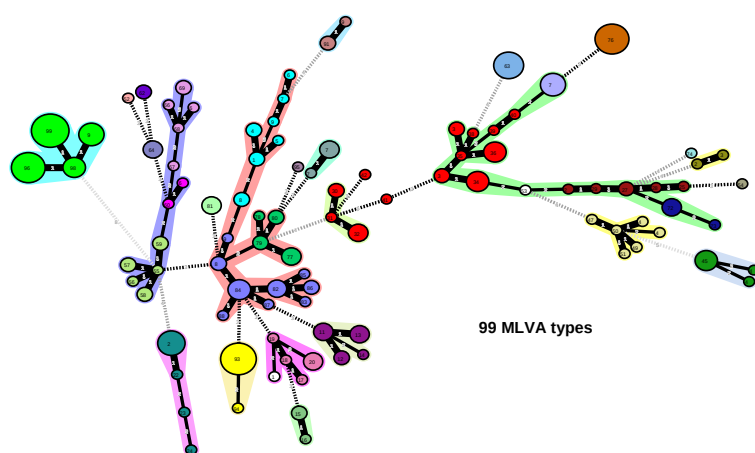


Figure 2: Minimum spanning tree (MST) constructed from 12 MLVA markers for 207 *Salmonella enterica* isolates.

Construction with a categorical coefficient. Each circle represents a different MLVA type (MT). The colour of a circle indicates the corresponding serovar (color code: see Figure 1, dendrogram). Size of the circle reflects the number of isolates while the distance between circles reflects the degree of genetic divergence (heavy short lines connect SLVs (single locus variants), thin longer lines connect DLVs (double locus variants), and dotted lines indicate the most likely connection between 2 MTs differing by more than 2 loci). The number of loci that differ between two MTs is indicated on the lines connecting the MTs.

□ Four types of allelic dispersion (MLVA variants) for the 32 *S. enterica* serovars.

- Unique allelic variants, for Albany, Braenderup, Corvallis, Indiana, Kentucky and Rissen serovars.
- Unique loci variants and SLV, for Anatum, Bovismorbifican, Hittingfos, London, Monophase 4,5; gft (-), Newport, Ohio, Paratyphi B, Stanley, Typhi and Virchow serovars.
- Unique variants loci with SLV and DLV; for Choleraesuis, Enteritidis, Itami, Lexington, Typhimurium, Schleissheim, Schwarzengrund and Weltevreden serovars.
- Two allelic distributions for serovar Derby, first type included animal, food and human strains and grouped unique variants, SLVs and DLVs and the second included food and animal strains with SLVs only. Both types were linked by the genotype 41 (animal).

□ The genetic divergence between different *S. enterica* serovars was variable; each serovar differed to others from 2 to 8 VNTR loci or markers.

2-DENDROGRAM

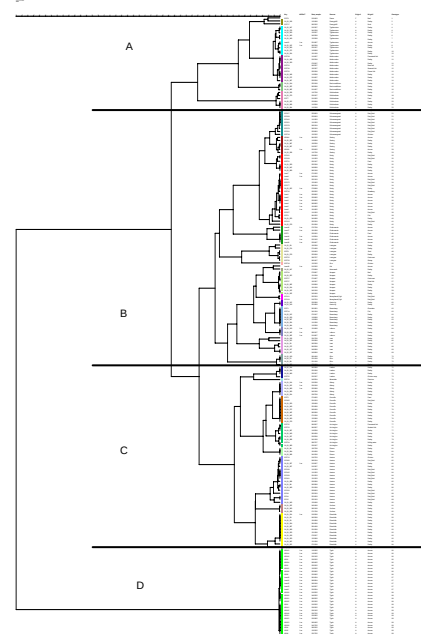


Figure 1: Dendrogram of 207 *S. enterica* isolates.

□ 99 combinations distinguished for all isolates to define the extent of genetic diversity and dispersed in four groups.

□ Strains dispatched up into 71 genotypes for 134 animal strains (with 10 resistant to ACSSuT), 23 genotypes for 27 food strains and 14 genotypes for 46 human ACSSuT resistant strains.

□ Serovars harboring a resistance to ACSSuT clustered into either identical genotypes or genotypes differing by one locus, for Albany 75, Choleraesuis 43, 44 and 45, Derby 33, 36 and 37, Indiana 87, Typhi 96, 97, 98 and 99, and Typhimurium 8.

DISCUSSION

- STTR5, STTR8, STTR3 and Sal 20 markers were polymorphic for all isolates, whatever the origin (DI values >0.80).
- Unique allelic variants with identical serovar might reflect the endemo-epidemic diffusion of a particular genotype into different sources.
- MLVA assay was optimized to genotype either resistant or susceptible *S. enterica* isolates.

CONCLUSION

- The MLVA, using agar electrophoresis, is a simple, rapid and powerful technique to genotype *S. enterica* isolates from either human, food or animal origin.
- Very high discriminatory power (99 genotypes for 207 isolates).
- Good accordance between genotypes and serovars.
- Potentially adequate either for micro- or macroepidemiology.

RESISTANCE PROFILE OF *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA* FROM ANIMAL, HUMAN AND FOOD ORIGINS, CAMBODIA, 2001-2007

Kruy S.L.¹, H. van Cuyck², A. Granger-Farbos², P. Leroy², Yith V.¹, Suy B.H.¹, J.L. Koeck² et J.L. Sarthou¹

¹: Food Microbiology Laboratory, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia

²: Service de Biologie Clinique HIA Robert Picqué, Villeneuve d'Ornon, France

BACKGROUND

In Cambodia, the public health problems due to salmonellosis caused by a particular serotype or resistant clone of *Salmonella enterica* is rather difficult to assess. Diarrheal diseases represent 6.6% of outpatients in health centres among of 6 million consultations per year and 4.2% inpatients in public hospitals (1). The exact percentage of salmonellosis in diarrheal diseases is very difficult to estimate.

Since the discovery of multidrug resistant ACSSuT *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ACSSuT DT104 in the United Kingdom in 1992, this strain has been consistently reported as the cause of both human and animal salmonellosis (2).

Other serotypes of *Salmonella* has been described harboring the ACSSuT phenotype [Typhi, on a 98 to 100-MDa transferable plasmid; Typhimurium, on transferable 140-kb in non-phage-typeable strain and a 43 kb region named *Salmonella* genomic island 1 (SGI)] (3). Due to recombination, insertion and/or deletion events, SGI variants have been found in others serotype of *Salmonella*. These clones spread around the world, and are prominently distributed in Europe, Northern America, and whilst less dispersed countries in Asia, such as in Korea and Japan.

OBJECTIVE

Our study aims to establish the prevalence of *Salmonella* resistance to a large range of antibiotics and to evaluate the emergence of ACSSuT clone among these isolates.

MATERIALS AND METHODS

Strains: 420 *Salmonella* spp from three sources, animal (ground beef and raw poultry), human, and ready-to-eat food were collected by the food microbiology laboratory of Institut Pasteur du Cambodge, from January 2001 to December 2007. All strains were serotyped according to the Kauffmann-White scheme.

Sensitivity testing: Antibiotic sensitivity tests were performed using diffusion method on agarose disks and lecture by OSIRIS system (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), CMI ($\mu\text{g/ml}$) and zone inhibition diameter (mm) were recorded.

RESULTS

1- General antibiotic resistance profile

1-1-Animal strains:

Between 2003-2007, 310 strains of *Salmonella* spp from raw meat (ground beef and raw poultry) were tested for the sensitivity to antibiotics. Important resistance percentages were observed for: Tetracycline (28.4%) and Ampicillin (18.1%) followed by Cotrimoxazole and sulphonamide (12.3%), Chloramphenicol (8.4%), Ciprofloxacin (5.2%), Streptomycin and Gentamicin (4.8%), then Augmentin (0.6%).

1-2-Human strains:

Between 2004-2005, 70 strains of *Salmonella* spp isolated from National Pediatric Hospital were tested for antibiotic sensitivities. High resistance profiles for strains isolated from human biological products were observed for antibiotics such as Tetracycline TE (62.9%), Ampicillin AM (61.4%), Cotrimoxazole SXT (54.3%), Chloramphenicol C (52.9%), Streptomycin S and Sulphonamide Su (respectively 38.6%). Other resistance profiles were observed for Augmentin AMC (8.6%), Cefalotin CEPH (5.7%), Ciprofloxacin CIP (2.9%) and Gentamicin GEN (1.4%).

1-3-Food strains:

Between 2001-2007, 40 *Salmonella* spp isolated from ready-to-eat food were tested for the sensitivity of antibiotics. The following resistance percentages were observed: Tetracycline (10.0%), Ampicillin and Chloramphenicol (5.0%), Cotrimoxazole and Augmentin (2.5%).

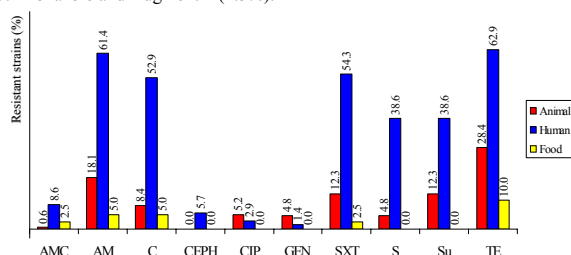


Figure 1: Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp isolated from human, animal, and food

2- ACSSuT resistant strains

Among *Salmonella* spp from all origins (human, raw poultry, ground beef and food), 37 strains were ACSSuT resistant, i.e. resistant to five major antibiotics: ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamide and Tetracycline.

2-1- ACSSuT strains from human origin isolated from the National Pediatric Hospital (MOH) in 2004-2005:

High percentage of *Salmonella* spp ACSSuT strains were isolated from human origin (38.6%).

Table 1: Distribution of ACSSuT species among 70 human isolates

Species	Strain number
S. Typhi	25
S. Stanley	2
Total	27

2-2- ACSSuT strains circulating among animal origin (raw poultry 2006-2007):

4.4% *Salmonella* spp ACSSuT strains were isolated from raw poultry origin.

Table 2: Distribution of ACSSuT species among 228 *Salmonella* spp from raw poultry

Species	Strain number
S. Indiana	3
S. Albany	2
S. Derby	1
S. Anatum	1
S. Corvallis	1
S. Saintpaul	1
S. Enteritidis	1
Total	10

DISCUSSION AND CONCLUSION

High Tetracycline resistance profiles were observed for isolates from human and animal (62.9% and 28.4% respectively). This feature may reflect the use of Tetracycline antibiotic for disease prevention in animal feed. The *Salmonella* resistance clones to Tetracycline may also circulate from animal to human.

In human, very high resistance profiles were found for several major antibiotics (AM, TE, SXT, C, S, Su). These resistances express an abuse of antibiotic use in the general treatments of human diseases in Cambodia.

A diversity of *Salmonella* species harbouring ACSSuT resistance among animal isolates was observed.

Molecular methodologies (PFGE, MLVA, MLST) should be developed and used to trace the salmonellosis outbreaks with the etiological agents in order to investigate the epidemiology of related and unrelated strains.

REFERENCES

- 1- Cambodia health statistics, Ministry of Health, 2004.
- 2- Threlfall, E. J., B. Rowe, and L. R. Ward. 1993. A comparison of multidrug resistance in *Salmonella* from human and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. Epidemiol. Infect. 111: 189-197
- 3- Boyd, D. et al. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-Kilobase Genomic Island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT102 and serovar Agona. J. Bacteriol. 183: 5725-5732.

SUMMARY

From 2001-2007, 420 *Salmonella enterica* isolates were selected among three sources (animal, human, food) by Food Microbiology Laboratory of Institut Pasteur du Cambodge, and were subjected to antibiotic sensitivity testing. An important resistance profile to Tetracycline was yielded by both animal and human strain (62.9% and 28.4% respectively); 38.6% of 70 human and 4.4% of 228 animal isolates were resistant to Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulphonamide, and Tetracycline (ACSSuT). These features suggested that resistant clones to Tetracycline and ACSSuT are circulating within these sources in Cambodia.

Résumé :

Salmonella (*S.*) *enterica* est reconnue comme le principal agent causal de la salmonellose chez l'homme et les animaux. La distribution épidémiologique de cette infection implique souvent des régions géographiques éloignées; il est ainsi nécessaire de posséder des méthodes fiables afin de pouvoir discriminer des souches responsables d'une épidémie. En raison des limites de la méthode de typage sérologique, de nombreuses méthodes de génotypage moléculaire ont été développées. En particulier, la méthode par PCR couplée à l'électrophorèse en champ pulsé, qui est utilisée pour la séparation et la caractérisation des molécules d'ADN, et le génotypage par analyse de répétition en tandem polymorphe ou MLVA (Multiple-Locus VNTR Analysis), sont des méthodes modernes qui permettent d'étudier le polymorphisme et la diversité génétique des souches de *S. enterica* liées à une épidémie. Dans notre étude, onze marqueurs contenant des régions de répétitions en tandem polymorphique (VNTR : Variable Number Tandem Repeats) sélectionnés à partir du génome de *S. enterica* Typhimurium LT2 ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique de 206 souches de *S. enterica* sélectionnées entre 2001 et 2007. Ces salmonelles sont représentées par 31 sérotypes, ont été isolées à partir de trois sources: hommes, aliments cuits et crus. Chaque souche a été isolée à partir d'échantillon unique et n'était liée à aucun épisode d'intoxication alimentaire ou à une épidémie de salmonellose connue. La technique MLVA a permis de sous typer 107 génotypes regroupés dans un dendrogramme en deux branches distinctes dont la première est constituée par *Salmonella* Typhi et la deuxième par les 30 autres sérotypes liés entre eux par un ancêtre commun. Parmi les sérotypes, quatre ont été répartis dans deux à cinq branches phylogénétiques. La représentation de la variation allélique des sérotypes de *S. enterica* a utilisé l'arbre minimum couvrant sans racine. Des variations alléliques pour des sérotypes de *S. enterica* précédemment ou nouvellement décrits ont été identifiées et des variants génétiques ont été répartis en types ou en variants MLVA à loci uniques, en variants différents par un locus (SLVs), en variants différant par deux loci (DLVs) et des variants différant par plus de deux loci. Quatre marqueurs (STTR3, STTR5, STTR8 et Sal20) ont présenté un indice de diversité élevé (DI> 0,80). En résumé, la technique MLVA peut être appliquée pour étudier le profil génétique de *S. enterica* avec une grande diversité de sérotypes.

MOTS CLES: MLVA, VNTR, salmonelles, échantillon biologiques humains, échantillons biologiques alimentaires cuits et crus, complexe clonal

ABSTRACT

Salmonella (*S.*) *enterica* is known as the major causative agent of salmonellosis in humans and animals. The epidemiological distribution of this infection often involves large areas of geographically distant, and reliable methods to discriminate strains responsible for an epidemic are necessary. Due to limitations of serological typing method, many molecular genotyping methods have been developed. Some molecular methods and their applications are: PCR coupled to PFGE, which is used for the separation and characterization of molecular profiles, and MLVA (Multiple-Locus VNTR Analysis) genotyping, or so called analysis of polymorphic tandem repeats are modern methods that allow study of the polymorphic genetic diversity and discrimination of *Salmonella* strains related or unrelated to epidemics. In our study, 11 markers containing polymorphic tandem repeats (VNTR: Variable Number Tandem Repeats) selected from the genome of *S. enterica* Typhimurium LT2 were used to assess the genetic diversity of 206 strains of *S. enterica* selected in 2001-2007 period. These are represented by 31 *Salmonella* serotypes selected from three sources: human, food and animals. Each strain was isolated from a single sample and was not related to an episode of epidemic of salmonellosis. The technique MLVA has allowed subtyping of 107 genotypes grouped in a dendrogram into two distinct dispersion trees, the first for serotype Typhi and the second for the other 30 serotypes divided within two subgroups derived from a common ancestor. Four serotypes were dispersed in two to five phylogenetic branches. The representation of the allelic variation of serotypes of *S. enterica* used a minimum spanning tree. Allelic variations in the serotypes of *S. enterica*, previously or newly described, were identified and genetic variants were distributed in MLVA types in unique locus variants, in single locus variants or in variants different by a locus (SLVs), in variants different by two loci (DLVs) and in different variants by more than two loci. Four markers (STTR3, STTR5, STTR8, and Sal20) have shown a high Diversity Index (DI> 0.80). In summary, MLVA can be applied to study the genetic profile of *S. enterica* with a wide variety of serotypes.

KEY-WORDS: MLVA, VNTR, Salmonella, human and food biological samples , clonal complex

Adresse de l'auteur : Institut Pasteur du Cambodge, 5 Monivong Blvd., P.O.Box 983, Phnom Penh, Cambodge

Adresse électronique : ksunlay@pasteur-kh.org

Lieu de réalisation de la thèse : Fédération de Biologie Clinique, Laboratoire de Biologie Moléculaire, HIA, Robert Picqué, 351, route de Toulouse, 33882, Villenave d'Ornon.