

Dépistage sérologique des salmonelles : comparaison des résultats obtenus sur sérum ou sur jus de viande et influence de la durée de conservation du jus de viande

Actuellement, de nombreux pays développent des programmes de maîtrise des salmonelles en filière porcine. La sérologie est un outil intéressant pour la qualification du risque excréteur d'un élevage et elle est largement utilisée dans des études de prévalence ou d'épidémiologie analytique, en France comme à l'étranger.

De nombreux fabricants de kit ont développé des méthodes sérologiques salmonelles, toutes des tests Elisa basées sur les antigènes somatiques, mais qui présentent parfois des différences quant aux sérogroupes de salmonelles mis en évidence. Ces kits sont en général utilisables sur sérum ou sur jus de viande, mais les notices des kits laissent à l'utilisateur une grande marge de manœuvre quant à l'interprétation des résultats.

Dans la pratique, la sérologie est utilisée selon plusieurs protocoles qui diffèrent par : **les types de prélèvements** (sérum ou jus de viande obtenus à partir de muscle sterno-mastoïdien ou de hampe), **les moments de prélèvements de muscles** (fin de chaîne d'abattage ou après ressuage), **les durées de congélation des muscles avant analyse**, **le kit sérologique utilisé et le seuil de positivité retenu**.

L'objectif de cette étude est de comparer, avec le kit le plus utilisé actuellement en France, les résultats obtenus en fonction de ces différentes modalités.

Protocole

90 porcs charcutiers ont été sélectionnés dans 3 lots d'abattage provenant de 3 élevages avec des séroprévalences salmonelles connues et élevées, afin d'obtenir une distribution de valeurs de densité optique (DO) la plus large possible. En effet, dans des lots à forte prévalence salmonelles, des échantillons avec des valeurs de DO faibles, moyennes et fortes sont généralement obtenus. Les porcs ont été identifiés individuellement afin de pouvoir étudier les correspondances individuelles entre les prélèvements.

Pour chacun des porcs, les 4 catégories de prélèvements suivants ont été réalisées :

- **à la saignée** : sang,
- **à la finition des carcasses** : fragment de hampe,
- **après la pesée des carcasses** : fragment de muscle sterno-mastoïdien (SM Chaîne),
- **après ressuage** : fragment de muscle sterno-mastoïdien (SM Ressuage).

Sur sérum frais, les analyses sont réalisées après centrifugation du sang. Sur fragments musculaires, les analyses sont réalisées sur le jus de viande récupéré après congélation puis décongélation. Pour les jus de viande obtenus à partir des muscles sterno-mastoïdien, 3 séries d'analyses ont été effectuées, respectivement après 1, 6 et 12 mois de congélation. Pour les hampes, seules les analyses après 1 mois de congélation ont été effectuées.

Les analyses sérologiques sont réalisées avec le kit sérologique IDEXX HerdCheck Salmonellose Porcine par le laboratoire Bio Chêne Vert. Pour les sérums, la dilution de départ de l'échantillon est de 1/20, selon la notice d'utilisation du kit sérologique, alors que pour les jus de viande elle est de 1/2.

Les résultats sont exprimés par le laboratoire, d'après les recommandations de la notice du kit, en pourcentage de la densité optique (notée %DO).

Résultats

Comparaison des résultats sur jus de viande et sur sérum

Au tableau 1 figurent les moyennes de %DO et les pourcentages de positifs aux seuils de



Résumé

Les résultats de prévalence obtenus avec le kit sérologique le plus utilisé en France (IDEXX HerdCheck Salmonellose Porcine) en fonction de différents types de prélèvements sont comparés. Quatre vingt dix porcs charcutiers, identifiés individuellement et issus de 3 élevages avec des séroprévalences élevées, ont fait l'objet de prélèvements de sang, de hampe sur la chaîne d'abattage et de muscle sterno-mastoïdien sur la chaîne d'abattage et après ressuage. Les analyses sont effectuées sur sérum frais et sur les jus de viande récupérés à partir des muscles prélevés après 1, 6 et 12 mois de congélation. Les valeurs de densité optique (DO) obtenues avec le sérum sont significativement supérieures à celles obtenues avec les différents jus de viande. Aux seuils de positivité de 10 et 20% de la DO, les pourcentages de porcs positifs sur sérum sont également significativement supérieurs à ceux déterminés à partir des jus de viande. Par contre aux seuils de positivité de 30 et 40%, les résultats sur sérum et sur jus de viande sont équivalents. Les durées de congélation des jus de viande n'influencent pas les valeurs de DO obtenues. Les meilleures sensibilités et spécificités, en référence au sérum, sont obtenues avec le muscle sterno-mastoïdien prélevé en fin de chaîne et analysé après 1 mois de congélation.

Isabelle CORRÉGÉ
Anne HÉMONIC

Cette étude a été financée par INAPORC.

Tableau 1 : Comparaison des jus de viande après 1 mois de congélation au sérum

N=85 porcs	Moy. DO	% de positifs			
		DO10	DO20	DO30	DO40
Sang	20,4 ^{a*}	60,0 ^a	32,9 ^a	20,0 ^a	12,9 ^a
Hampe	14,9 ^b	31,8 ^b	25,8 ^{ab}	17,6 ^a	14,1 ^a
SM Chaîne	13,8 ^b	35,3 ^b	18,8 ^b	14,1 ^a	11,8 ^a
SM Ressuage	12,5 ^b	36,5 ^b	20,0 ^b	14,1 ^a	9,4 ^a
Analyses statistiques	Glm p=0,05	Glimmix p=0,02	Glimmix p=0,05	Glimmix ns**	Glimmix ns

*Des lettres différentes dans une colonne signifient une différence significative au seuil de 5% ;
** ns : non significatif au seuil de 5%

%DO de 10, 20, 30 et 40 obtenus sur sérum et avec les 3 catégories de jus de viande après 1 mois de congélation ainsi que les analyses statistiques associées.

Pour les moyennes de %DO, les résultats sur sérum sont significativement supérieurs à ceux obtenus sur jus de viande. A l'inverse, les moyennes de %DO des 3 types d'analyse sur jus de viande sont proches et ne révèlent pas de différence significative.

Pour les pourcentages de positifs aux seuils de 10 % de la DO et de 20 % de la DO, les résultats sont similaires : un pourcentage de positifs significativement supérieur pour le sérum et pas de différence significative entre les jus de viande. Par contre, **aux seuils de 30 et 40 % de la DO, les résultats sont diffé-**

rents : il y a équivalence entre le sérum et les jus de viande.

Pour compléter cette analyse, les pourcentages de prélèvements discordants (ne donnant pas le même résultat positif ou négatif) ainsi que les coefficients Kappa sont calculés pour les seuils de %DO de 10, 20, 30 et 40 (Tableau 2). Au seuil de %DO de 10, les pourcentages de résultats discordants entre le sérum et les jus de viande sont élevés (proches de 30%) et les coefficients Kappa faibles (0,4 à 0,5). Au seuil de positivité de 20 %, ces résultats s'améliorent nettement pour la hampe, alors qu'ils varient peu pour les jus de viande issus de sterno-mastoïdien. Pour le seuil de %DO de 30, les résultats obtenus sur la hampe sont proches de ceux du sérum. Pour le muscle sterno-mastoïdien, nous n'obtenons des coefficients

Kappa supérieurs à 0,7 que pour le seuil %DO de 40 %.

Pour la comparaison des 3 types de jus de viande entre eux, les résultats deviennent acceptables (% de discordants < 10 % et Kappa > à 0,7) à partir de seuils de %DO de 30 ou de 40.

Comparaison des durées de congélation des jus de viande

Les moyennes de DO des analyses après 1, 6 et 12 mois de congélation ne présentent pas de différence significative, de même que les pourcentages de positifs aux seuils de %DO de 10, 20, 30 et de 40, pour les prélèvements sur le sterno-mastoïdien **en fin de chaîne et après ressuage** (Tableau 3 ; seuls les moyennes de DO et les %DO10 et %DO40 sont présentés). **Les prélèvements semblent stables à la congélation sans évolution des valeurs de DO.**

Par contre, pour les muscles sterno-mastoïdiens prélevés après ressuage, les quantités de jus de viande récoltées **après congélation-décongélation** du fragment sont faibles ; **la quantité de jus de viande récoltée** était insuffisante

Tableau 2 : Comparaison sérum-jus de viande après 1 mois de congélation ; pourcentages de discordants et coefficients Kappa

% de prélèvements discordants - coefficient Kappa		Sérum	SM Chaîne	SM Ressuage
DO10	Hampe	29,9%- 0,44	12,6%- 0,72	13,5%- 0,70
	SM Chaîne	26,1%- 0,51	-	12,8%- 0,73
	SM Ressuage	29,9%- 0,43	-	-
DO20	Hampe	9,2%- 0,78	14,9%- 0,57	14,6%- 0,60
	SM Chaîne	22,7%- 0,44	-	14,7%- 0,56
	SM Ressuage	21,8%- 0,47	-	-
DO30	Hampe	8,0%- 0,74	10,3%- 0,61	4,5%- 0,83
	SM Chaîne	13,6%- 0,55	-	7,9%- 0,69
	SM Ressuage	9,2%- 0,69	-	-
DO40	Hampe	6,9%- 0,71	6,8%- 0,67	7,9%- 0,62
	SM Chaîne	3,4%- 0,85	-	3,4%- 0,84
	SM Ressuage	4,6%- 0,79	-	-

Tableau 3 : Comparaison des durées de congélation des jus de viande

		Moy. DO	% de positifs	
			DO10	DO40
SM Chaîne	Congélation 1 mois	13,9 ^{a*}	35,9 ^a	12,4 ^a
	Congélation 5 mois	15,2 ^a	41,6 ^a	12,4 ^a
	Congélation 12 mois	15,5 ^a	39,3 ^a	11,2 ^a
89 porcs	Analyses statistiques	Glm ns*	Glimmix ns	Glimmix ns
SM Ressuage	Congélation 1 mois	13,2 ^a	37,5 ^a	9,7 ^a
	Congélation 5 mois	13,6 ^a	37,5 ^a	8,3 ^a
	Congélation 12 mois	15,8 ^a	38,9 ^a	12,5 ^a
72 porcs	Analyses statistiques	Glm ns	Glimmix ns	Glimmix ns

*Des lettres différentes dans une colonne signifient une différence significative au seuil de 5% ; **ns : non significatif au seuil de 5%

pour faire les analyses à 12 voir 6 mois pour 18 échantillons sur les 90 de départ.

Comme précédemment, les pourcentages de discordants et les coefficients Kappa s'améliorent avec l'augmentation du seuil de positivité de 10 à 20 puis à 30 et à 40 %. Ils sont cependant déjà très bons dès le seuil de 10% (pourcentages de résultats discordants de l'ordre de 6 % et Kappa proche de 0,85) et témoignent d'une bonne concordance entre les différents types d'analyses. Seuls les seuils de 10 et 40 % sont présentés au tableau 4.

Calcul des spécificités et sensibilités

Les calculs des sensibilités et spécificités de chacune des 7 catégories de jus de viande par rapport à la méthode de référence, à savoir le sérum, permettent de synthétiser ces différents résultats (Tableau 5).

Les spécificités sont toutes bonnes avec des valeurs supérieures à 0,9 et même à 0,95 excepté pour les SM après ressuage aux seuils de %DO de 10 et de 20.

Les sensibilités, pour les %DO de 10 sont toutes inférieures à 0,6. Pour la hampe, à partir du seuil de %DO de 20, des valeurs supérieures à 0,7 sont obtenues. Des niveaux acceptables (>0,8) ne sont observés que pour le SM prélevé après ressuage et analysé après 12 mois de congé-

Tableau 4 : Comparaison des durées de congélation ; pourcentages de discordants et Kappa

% de prélèvements discordants - coefficient Kappa			5 mois	12 mois
SM Chaîne	DO10	1 mois	5,6%- 0,88	5,6%- 0,88
		5 mois		5,8%-0,88
	DO40	1 mois	0 %- 1	1,1%- 0,95
		5 mois		1,9%- 0,90
SM Ressuage	DO10	1 mois	4,7%- 0,90	6,9%- 0,85
		5 mois		7,0%- 0,85
	DO40	1 mois	1,2%- 0,93	2,8%- 0,86
		5 mois		3,5%- 0,87

lation ainsi que pour le SM prélevé en fin de chaîne et analysé après 1 mois de congélation. Ce dernier présente le meilleur couple sensibilité et spécificité.

Discussion

Les valeurs de %DO obtenues avec les différents jus de viande, significativement inférieures à celles du sérum, ainsi que les pourcentages de positifs nettement plus faibles aux seuils de positivité de 10 et 20 % montrent qu'il n'y a pas équivalence entre ces deux types de substrats. Ces différences s'expliquent sans doute par **une concentration en anticorps plus faible dans les extraits musculaires** que dans le sérum. Par ailleurs, des concentrations supérieures **en diverses protéines dans les muscles**, comme cela a été décrit pour la sérologie de la maladie d'Aujeszky sur jus de viande peuvent, par un phénomène de saturation aspécifique, inhiber davantage l'action des antigènes spécifiques LPS.

Pour palier à ces phénomènes, le fabricant du kit préconise des dilutions de départ de l'échantillon différentes, 1/20^{ème} pour le sérum et 1/2 pour les jus de viande. Au vu de ces résultats, elles ne semblent pas suffisantes pour obtenir des résultats comparables à des faibles seuils de positivité.

D'autres auteurs ont cependant rapporté de bonnes corrélations entre les résultats obtenus sur sérums et sur jus de viande, mais le test ELISA était différent ainsi que les ratios de dilution initiale, respectivement de 1/400^{ème} pour le sérum et 1/30^{ème} pour le jus de viande.

L'augmentation du seuil de positivité à des valeurs de %DO de 30 ou de 40 permet d'obtenir une bonne concordance des résultats. Les écarts constatés à ces seuils peuvent s'expliquer par le coefficient de variation (CV) propre à toute méthode sérologique, avec une valeur annoncée par le fabri-

L'augmentation du seuil de positivité à des valeurs de %DO de 30 ou de 40 permet d'obtenir une bonne concordance des résultats.

Il n'y a pas équivalence des résultats entre détection sur sérum et sur jus de viande pour des seuils de positivité bas.

Tableau 5 : Sensibilités et spécificités des jus de viande

Sensibilité (Se) et spécificité (Sp) comparées au sérum	DO 10		DO 20		DO 30		DO 40	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
SM Chaîne	0,53	0,97	0,45	0,95	0,53	0,96	0,83	0,99
SM Chaîne, congélation 5 mois	0,59	0,97	0,45	0,95	0,47	0,97	0,75	0,99
SM Chaîne, congélation 12 mois	0,60	0,97	0,47	0,95	0,56	0,97	0,72	0,99
SM Ressuage	0,61	0,91	0,50	0,93	0,63	0,99	0,69	1,00
SM Ressuage, congélation 5 mois	0,57	0,91	0,48	0,94	0,60	0,97	0,62	1,00
SM Ressuage, congélation 12 mois	0,53	0,92	0,56	0,96	0,64	0,96	0,87	0,97
Hampe	0,58	0,96	0,77	0,98	0,72	0,97	0,75	0,96

La réalisation de tests sérologiques de dépistage des salmonelles sur jus de viande constitue une méthode de collecte simple et peu coûteuse, ne nécessitant pas la manipulation d'animaux vivants qui simplifie la logistique de réalisation des prélèvements et de traitement des échantillons.

Pour s'affranchir des aléas liés au substrat, il convient soit de les utiliser à des seuils de 30 ou mieux 40 % de la DO, au risque de perdre le caractère discriminant de la méthode.

cant pour le kit utilisé ici de 5,6 %. S'y ajoutent les variations liées à la répétabilité et la reproductibilité du lot de fabrication de la plaque, du laboratoire ou de l'opérateur.

Pour les différents types de jus de viande, les pourcentages de discordants obtenus et les coefficients Kappa aux seuils de positivité de 10 et 20 %, font penser, qu'en plus du CV intrinsèque à la méthode, s'ajoutent des différences de concentration en anticorps et/ou de concentration en protéines marqueurs entre la hampe et le muscle sterno-mastoïdien.

Pour le muscle sterno-mastoïdien, il semble également que le **ressuage** ait une influence sur les résultats. **Les températures négatives et la vitesse d'air élevée** pendant le ressuage entraînent une perte en eau des muscles qui peut conduire à des modifications des concentrations en anticorps et/ou en protéines dans le muscle. Ces prélèvements après première réfrigération des carcasses exposent également au risque de ne pas récolter une **quantité de jus de viande suffisante** pour la mise en œuvre de l'analyse.

Comme précédemment, l'augmentation du seuil de positivité à des valeurs de 30 ou 40 % permet d'obtenir une bonne concordance des résultats. Ainsi, les seuils de positivité de 10 ou 20 % figurant sur la notice du kit ne semblent pas adaptés puisque facilement influencés par des variations liées aux modalités de prise d'échantillon. Par contre, avec les seuils de positivité de 30 ou 40 %, les résultats obtenus sont proches et

peu affectés par le type de prélèvement.

Les valeurs de spécificité, pour la majorité supérieures à 0,95, confirment que la spécificité des méthodes de dépistage sérologique des salmonelles n'est pas un obstacle à leur mise au point et à leur utilisation. Les sensibilités obtenues font penser qu'il faut privilégier le seuil de positivité de 40 % de la DO ainsi que le jus de viande issu de muscle sterno-mastoïdien analysé après 1 mois de congélation. Cependant, étant donné le nombre d'analyses réalisées dans cette étude, un faux positif de plus ou de moins peut faire varier la valeur de la sensibilité de - 4 % à +8 %. De plus, les résultats de sérologies salmonelles sont le plus souvent interprétés à l'échelle d'un lot d'animaux et non à l'échelle de l'individu : les résultats au niveau d'un lot d'animaux seront moins influencés par le choix du type de prélèvements au seuil de DO de 40 %.

La durée de congélation du jus de viande n'influence pas les résultats obtenus. Le coefficient de variation intrinsèque au kit sérologique et les variations liées aux lots de plaques peuvent expliquer les faibles différences constatées. Cependant, là encore, les meilleurs pourcentages de discordants et coefficients Kappa sont obtenus avec le seuil de positivité de 40 %.

Au vu de ces résultats, la comparaison des prévalences entre différents groupes d'élevages semble hasardeuse en l'absence d'harmonisation du plan d'échantillonnage, du type d'analyse (sérologie ou bactériologie), de la nature du prélèvement,

du kit d'analyse sérologique et du seuil de positivité utilisé.

Pour les études épidémiologiques analytiques, certains auteurs ont opté pour **le choix d'un seuil de positivité sévère (10 % de la DO) afin d'avoir une méthode suffisamment discriminante et donc de pouvoir plus facilement détecter les écarts de prévalence entre les élevages**. C'est également avec ce seuil que la relation entre les résultats des tests immunologiques sur jus de viande et des analyses de bactériologie sur caecum à l'abattoir était la meilleure. Au vu de ces résultats, la question du choix du seuil de positivité doit sans doute être réévaluée.

Conclusion

La réalisation de tests sérologiques de dépistage des salmonelles sur jus de viande constitue une méthode de collecte à la fois simple et peu coûteuse, ne nécessitant pas la manipulation d'animaux vivants, qui simplifie la logistique de réalisation des prélèvements (possibilité de regroupement des prélèvements à l'abattoir, bonne traçabilité des carcasses) et de traitement des échantillons (simple congélation sans centrifugation préalable). Cependant, il n'y a pas équivalence des résultats entre détection sur sérum et sur jus de viande pour des seuils de positivité bas (de 10 ou 20 %), ce que ne précise pas la notice du kit. Aussi pour s'affranchir des aléas liés au substrat, il convient soit de les utiliser à des seuils de 30 ou mieux 40 % de la DO, au risque de perdre le caractère discriminant de la méthode. ■

Contact :

isabelle.correge@ifip.asso.fr

Le texte complet et les références bibliographiques de cet article sont disponibles sur Journées Rech. Porcine, 42, 209-214