



Méthodes

Méthode de confirmation moléculaire des souches de *Salmonella* variants monophasiques et immobiles du sérovar Typhimurium

R. Lailler (renaud.lailler@anses.fr), J. Grout, M. Marault, C. Oudart, F. Moury, A. Brisabois
Université Paris-Est, Unité CEB, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

Les salmonelles demeurent la première cause de toxi-infections alimentaires collectives confirmées en France. Parmi les 2600 sérovars répertoriés au sein du genre bactérien *Salmonella*, certains sont plus fréquemment isolés en santé humaine, hygiène des aliments et/ou santé animale.

Depuis environ cinq ans, des salmonelles dites « variants Typhimurium-like » émergent chez l'Homme et dans de nombreux secteurs de la chaîne alimentaire et filières animales.

Cet article présente une méthode de caractérisation moléculaire développée et appliquée depuis 2010, à des fins de surveillance. Elle répond aux besoins permanents d'adaptation des méthodes de laboratoire pour l'application de la réglementation et la mise en œuvre des mesures de gestion face aux dangers microbiologiques que représentent notamment les salmonelles potentiellement présentes dans les aliments.

Résumé

Les laboratoires français de référence, en charge de la surveillance des salmonelles en santé humaine ou dans les secteurs alimentaire et vétérinaire, ont observé depuis 2008 l'émergence de souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, dites « variants monophasiques de Typhimurium ». Ce constat également dressé au niveau européen a conduit l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) à formuler, en 2010, des recommandations pour la caractérisation et la surveillance de ces isolats tout au long de la chaîne alimentaire. La détection de ces variants au sein des filières avicoles réglementées conduit aujourd'hui à appliquer en Europe des mesures de gestion identiques à celles requises pour S. Typhimurium.

La réglementation française est plus exigeante : elle prend en compte deux types de variants monophasiques : S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 et le variant immobile S. 1,4,[5],12:-:-.

Afin de confirmer qu'il s'agit de variants du sérovar Typhimurium, une méthode PCR (réaction de polymérisation en chaîne) multiplexe conventionnelle a été développée. Il est ainsi possible de suivre les tendances évolutives d'isolement de ces variants, tout au long de la chaîne alimentaire.

Le bilan établi à partir du panel de souches, collecté par le réseau *Salmonella* sur la période 2011-2012, a permis de constater l'émergence au sein de plusieurs filières animales des souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, confirmées comme variant monophasique du sérovar Typhimurium.

Cette méthode PCR est complémentaire à la méthode de sérotypage conventionnel par agglutination sur plaque, elle permet de confirmer rapidement l'identité de ces variants. Elle constitue également un outil précieux pour préciser la situation épidémiologique, suivre les tendances liées à l'isolement de la souche, évaluer les risques et adapter les mesures de gestion dans les différentes filières.

Contexte

À l'échelle internationale, les données de surveillance des dernières années mettent en évidence une augmentation importante de l'occurrence de souches dont la formule

antigénique (S. 1,4,[5],12:i:-) est très proche de celles de *Salmonella* Typhimurium (S. 1,4,[5],12:i:1,2) (EFSA, 2010; Anses, 2013; Mulvey, 2013). Ces souches correspondent à des variants flagellaires du sérovar Typhimurium, dits monophasiques du fait de l'absence d'expression de la seconde phase flagellaire, codée par le gène *fljB*. Les souches ayant perdu l'expression antigénique de la première phase flagellaire ou des deux phases (respectivement S. 1,4,[5],12:-:1,2 et S. 1,4,[5],12:-:-) sont également détectées mais de manière beaucoup moins fréquente (EFSA, 2010; Anses, 2013; Mulvey, 2013).

Considérant, d'une part l'émergence des souches de variants monophasiques de S. Typhimurium au niveau européen et d'autre part, le risque qu'elles représentent pour la santé publique, jugé comparable aux souches de sérovar Typhimurium, l'EFSA a recommandé un sérotypage complet de toutes les souches suspectées être des salmonelles, suivi d'une confirmation par PCR de l'absence du gène *fljB* pour les souches présentant la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- (EFSA, 2010).

En France, compte tenu de la survenue de plusieurs toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à des souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium », le champ d'application des arrêtés ministériels a été étendu au-delà de la réglementation européenne, en considérant les trois variants flagellaires existants du sérovar Typhimurium (S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 et S. 1,4,[5],12:-:-). Ces arrêtés¹ prévoient que les troupeaux contaminés par un variant du sérovar S. Typhimurium soient désormais traités comme des troupeaux positifs pour S. Typhimurium.

Suivant le type d'élevage concerné, ces mesures se traduisent par l'abattage du troupeau contaminé, ou l'envoi des œufs vers des établissements fabriquant des ovoproduits, ou encore le traitement thermique des viandes positives après recherche dans le muscle.

Compte tenu de cette émergence et de la réglementation associée, la direction générale de l'alimentation demande² depuis 2010 aux laboratoires vétérinaires et agro-alimentaires d'analyses de première intention, pour tout isolement d'un variant antigénique présentant l'une des trois formules antigéniques

1. Les deux arrêtés du 26 février 2008 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (en filière ponte et en filière chair) ; L'arrêté du 4 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de dindes de reproduction ; L'arrêté du 22 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement.

2. Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 du 04 mars 2010 modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8026 du 27 janvier 2010.



Méthodes

précitées, l'envoi sans délai de la souche au réseau *Salmonella* du laboratoire de sécurité des aliments (LSAL), accompagné de la fiche de renseignement spécifique du réseau. Le réseau *Salmonella* assure la surveillance après avoir confirmé l'identité de ces souches dites « variants Typhimurium-like », à l'aide d'une méthode interne basée sur des tests moléculaires préalablement définis par l'EFSA et décrit ci-après.

En effet, ces souches suspectées être des variants du sérovar Typhimurium, peuvent cependant, compte tenu de la formule antigénique détectée, être des variants d'autres sérovares moins fréquemment identifiés. C'est ainsi que, pour la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, il est possible d'identifier 6 sérovares ; pour S. 1,4,[5],12:-:1,2, et S. 1,4,[5],12:-:, 16 et 148 sérovares peuvent être respectivement associés (Anses, 2013).

Principe de la méthode

La méthode mise en œuvre pour confirmer l'identité des variants du sérovar Typhimurium s'appuie d'une part, sur les recommandations de l'EFSA (2010) qui concerne uniquement la confirmation du variant émergent monophasique S. 1,4,[5],12:i:- et d'autre part, sur les travaux effectués par Bugarel *et al.* (2012). La réglementation française concerne l'ensemble des variants monophasiques et immobiles, par conséquent des marqueurs supplémentaires ont été inclus dans cette méthode pour couvrir l'ensemble des besoins de confirmation des variants.

La méthode, basée sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), s'applique après la détection par sérotypage conventionnel d'une souche présentant une des formules antigéniques suivantes, S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 ou S. 1,4,[5],12:-:. Elle cible l'amplification de quatre gènes par l'intermédiaire de deux PCR multiplexes. La première cible le gène *fliB*, qui code pour la seconde phase flagellaire, ainsi que la région intergénique *fliA-fliB*. La présence d'une séquence *IS200* de 1 000 pb dans cette région est spécifique du sérovar Typhimurium et ses variants, celle-ci n'étant pas détectée chez les autres sérovares pour lesquels l'amplicon correspondant a une taille de 250 pb. La seconde PCR cible le gène *mdh*, marqueur du sérovar Typhimurium ainsi que le gène *fliC*, qui code pour la première phase flagellaire. Les séquences des amorces utilisées pour la recherche de ces marqueurs sont listées dans le **tableau 1**.

Procédure

La méthode moléculaire décrite dans cet article est mise en œuvre à partir d'une culture pure de souche de salmonelle dont la formule antigénique a été déterminée par sérotypage par la méthode d'agglutination sur plaque. Cette méthode conventionnelle de sérotypage repose sur l'utilisation de sérums spécifiques dirigés vers les antigènes de parois (« O ») ou de flagelles (« H ») (Danan, 2009).

Les différentes étapes de la méthode moléculaire de confirmation des « variants » sont :

- la mise en culture des souches sur gélose TSAYE, 18 - 24h à 37°C ;
- l'extraction de l'ADN à partir de colonies isolées sur gélose TSAYE (utilisation d'un kit commercial) ;
- la mesure de la concentration de l'extrait d'ADN par utilisation d'un spectrophotomètre à 260 nm ;
- la dilution de l'extrait pour ajuster sa concentration à 50 - 100 ng/μl ;
- la réalisation des deux PCR multiplexes (*fliA-fliB* + *fliB* et *mdh* + *fliC*) selon les modalités présentées dans le **tableau 2** ;

- la migration des produits d'amplification sur gel d'agarose à 2 % ;
- la révélation par fluorescence sous lampe UV des amplicons marqués au BET ;
- la lecture du gel (**figure 1**) et l'interprétation des résultats.

Cette méthode moléculaire nécessite l'utilisation de souches témoins : la souche de référence *Salmonella* Typhimurium LT2 (témoin positif) et une souche de *Salmonella* Brandenburg (souche terrain et témoin négatif). Un témoin négatif sans ADN est également réalisé à chaque expérience.

Tableau 1 : séquences des amorces PCR utilisées.

Gènes ciblés	Fonction	Nom des amorces	Séquences (5'-3')	Références
<i>mdh</i>	Malate deshydrogénase	MDH F MDH R	TGCCAACGGAAGTTGAAGTG CGCATTCACCACGCCCTTC	[Amavisit, 2005]
<i>fliC</i>	Antigène flagellaire de phase 1	Anti-sens-i Sens-60	ATAGCCATCTTACCAGTTCC ACTCAGGCTTCCCGTAACGC	[Herrera-Leon, 2004] [Bugarel, 2012]
<i>fliB</i>	Antigène flagellaire de phase 2	Sens-59 Anti-sens-83	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG GCCATATTCAGCCTCTCGCCCG	[EFSA, 2010]
<i>fliA-fliB</i>	Région inter-génique, de taille variable selon qu'elle héberge ou pas une séquence d'insertion <i>IS200</i>	FFLIB RFLIA	CTGGCGACGATCTGTCGATG GCGGTATACAGTGAATTCAC	[EFSA, 2010]

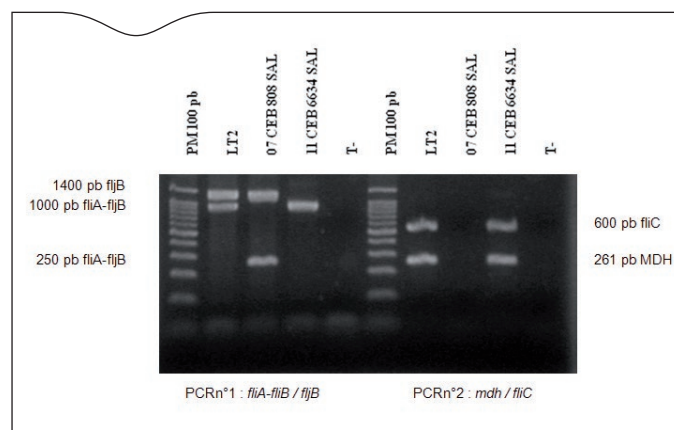


Figure 1 : illustration de résultats d'amplification obtenus pour la confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium.
[PM100pb: marqueur de poids moléculaires; LT2: sérovar Typhimurium; 07CEB808SAL: S. Brandenburg; 11CEB6634SAL: Variant monophasique S. 1,4,[5],12:i:- du sérovar Typhimurium; T-: témoin négatif sans ADN]



Méthodes

Tableau 2: description des conditions de réalisation des deux PCR multiplexes (*fliA-fliB* + *fliJ* et *mdh* + *fliC*).

PCR 1 Préparation du Mix		PCR 2 Préparation du Mix	
Tampon sans MgCl2	1 X	Tampon sans MgCl2	1 X
MgCl2	2 mM	MgCl2	2 mM
dNTPs	0,2 mM	dNTPs	0,2 mM
Amorce : anti-sens 83	0,8 µM	Amorce MDH-F	0,4 µM
Amorce : sens 59	0,8 µM	Amorce MDH-R	0,4 µM
Amorce FFLIB	0,4 µM	Amorce anti-sens I	0,4 µM
Amorce RFLIA	0,4 µM	Amorce sens-60	0,4 µM
Taq polymérase	1 unité	Taq polymérase	1 unité
Volume total de réaction PCR 25 µl (24 µl ou 23 µl de mix réactionnel/ tube + 1 µl d'ADN à une concentration de 100 ng/µl ou 2 µl d'ADN à 50 ng/µl)			
Conditions d'amplification		Conditions d'amplification	
3 min	94°C	3 min	94°C
35 cycles :		35 cycles :	
30 sec	94°C	30 sec	94°C
40 sec	64°C	40 sec	58°C
1 min 30 sec	72°C	1 min 30 sec	72°C
7 min	72°C	7 min	72°C

Tableau 3: interprétation des résultats obtenus par la méthode de confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium.

[+ : détection de l'amplicon spécifique du marqueur présentant la taille attendue; - : absence de détection de l'amplicon spécifique du marqueur; pb: paires de bases d'ADN]

Sérovar par agglutination	Marqueurs ciblés				Interprétation
	<i>fliC</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliJ</i>	<i>mdh</i>	
S. 1,4,[5],12:i:-	+	1 000 pb	-	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit « incohérent »
	+	250 pb	-	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:-:1,2	-	1 000 pb	+	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit « incohérent »
	-	250 pb	+	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:-:-	-	1 000 pb	-	+	Variant immobile de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant immobile de Typhimurium dit « incohérent »
	-	250 pb	-	-	Variant immobile d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:i:1,2	+	1 000 pb	+	+	Typhimurium

Expression des résultats

L'interprétation des résultats s'effectue selon des règles prédéfinies présentées dans le **tableau 3**. La souche est considérée comme un variant immobile ou monophasique selon que les amplicons correspondant aux gènes *fliC* et/ou *fliJ* sont absents.

Un variant du sérovar Typhimurium est confirmé si les amplicons correspondant au gène *mdh* et à la région intergénique *fliA-fliB* sont détectés et que ce dernier présente la taille attendu de 1 000 pb.

Un variant d'un sérovar autre que Typhimurium est confirmé si les amplicons correspondant au gène *mdh* est absent et que celui de la région intergénique *fliA-fliB* présente une taille de 250 pb.

Il est fait mention de variant « incohérent » (dit « inconsistant » en anglais) d'après Hopkins *et al.* (2010) pour les variants S. 1,4,[5],12:i:-, terminologie extrapolable aux deux autres formules antigéniques, si les gènes codant pour les phases flagellaires (*fliC* et *fliJ*) sont détectés mais non exprimés (non détection des antigènes par la méthode conventionnelle de sérotypage par agglutination).

Synthèse des résultats utilisant la méthode de confirmation

Durant la période de 2011 à 2012, un total de 703 souches « *Salmonella* Typhimurium-like » d'origine variée (**tableau 4**) ont été analysées par cette méthode (Lailier, 2013). Au sein de ce panel, 690 souches présentaient une formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, parmi lesquelles 650 souches (94,2 %) ont été identifiées comme variant monophasique du sérovar Typhimurium, 38 souches comme « variant incohérent » par la présence du gène *fliJ* et seulement deux souches comme étant des variant monophasique d'autres sérovares que Typhimurium (**tableau 5**).

L'analyse des huit souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:-:1,2 a montré la présence du gène *fliC* et a confirmé leur statut de variant monophasique du sérovar Typhimurium.

Parmi les cinq souches immobiles de formule antigénique S. 1,4,[5],12:-:-, une seule souche a été confirmée comme variant monophasique, les autres étant des souches variants d'autres sérovares.

Tableau 4: distribution de l'origine des 703 souches «*Salmonella* Typhimurium-like» collectées en 2011 et 2012, par le réseau *Salmonella* animé par le laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort (Anses).

Sérovares	S. 1,4,[5],12:i:-	S. 1,4,[5],12:-:1,2	S. 1,4,[5],12:-:-
Alimentation animale	23	/	2
Ecosystème	27	4	1
Santé et production animales... <i>incluant</i>	233	4	2
<i>bovins</i>	48		
<i>volailles</i>	160	4	1
<i>porcins</i>	13		
Aliments... <i>incluant</i>	407	/	/
<i>viandes de bœuf</i>	39		
<i>viandes de volaille</i>	13		
<i>viandes de porc</i>	133		
Total	690	8	5



Méthodes

Tableau 5: résultats obtenus par PCR multiplexe sur le panel de souches collectées en 2011 (n=312) et 2012 (n=391), par le réseau *Salmonella* animé par le laboratoire de sécurité des aliments (Anses).

marqueurs \ sérovar				S. 1,4,[5],12:i:-	S. 1,4,[5],12:-1,2	S. 1,4,[5],12:-:-
<i>fliC</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliB</i>	<i>mdh</i>			
+	1 000 bp	-	+	650	/	1
+	1 000 bp	+	+	38	8	/
+	250 bp	-	-	2	/	4
Total				690	8	5

Discussion/Conclusion

La méthode de confirmation des variants monophasiques et immobiles présentée est une méthode qualitative basée sur l'absence/présence de l'amplicon de taille attendue, détecté par PCR en multiplexe pour génotypage, tel que décrit dans le chapitre 8 de la norme U47-600-2.

Cette méthode s'appuie d'une part sur le protocole recommandé par l'EFSA et d'autre part sur les travaux menés par Bugarel et collaborateurs (2012). Dans le cadre de ces travaux, trois marqueurs différents, connus pour être spécifiques du sérovar Typhimurium, ont été testés sur un panel de souches connues, appartenant au sérovar Typhimurium ou variant confirmé de *S. Typhimurium*.

Il s'agit de la séquence intergénique *fliA-fliB* proposée dans les recommandations de l'EFSA et du gène *mdh*. Le gène *mdh* a été détecté systématiquement dans toutes les souches de sérovar Typhimurium et variants. Ce même marqueur, réputé pour être présent dans de nombreuses souches de *Salmonella*, a également été recherché parmi une collection de 937 souches de sérovaires variés (plus de 230 sérovaires différents) permettant ainsi de mesurer sa spécificité extrinsèque; aucune réaction croisée n'a été détectée, hormis pour une souche de sérovar Kibusi (S. 28:r:e,n,x) et une autre de sérovar Newmexico (S. 9,12:g,z51:1,5) (Bugarel, 2012). Ces deux sérovaires n'appartiennent pas au groupe « O:4 » dans lequel se trouve Typhimurium et ses variants.

L'introduction du gène *mdh* dans le panel des marqueurs recherchés permet donc d'exclure tout faux positif et tout faux négatif (100 % de détection sur les souches attendues être positives).

Comme le recommande l'EFSA dans son avis (EFSA, 2010), la confirmation de l'identité de ces souches dites « *Salmonella Typhimurium-like* », par une caractérisation précise et complète, est importante à mettre en œuvre dans une démarche de surveillance. Des bilans réguliers permettront de juger de l'adéquation des mesures réglementaires avec les objectifs de santé publique poursuivis en France et en Europe.

Concernant les variants dits « incohérents » (*fliB+*, *fliC+*, *fliA-fliB+* à 1 000 pb et *mdh+*), ces souches possèdent tout l'équipement génétique pour être identifié comme appartenant au sérovar Typhimurium. En considérant uniquement les résultats des tests PCR mis en œuvre, ces souches sont non distinguables des souches *S. Typhimurium*. Seule la caractérisation par le sérotypage conventionnel peut mettre

en évidence l'absence d'expression de l'une ou des deux phases flagellaires. Cette absence d'expression pourrait par ailleurs être réversible (Soyer, 2009). La mise en évidence de ces souches « incohérentes » par la méthode décrite pourrait avoir un intérêt dans la détection de nouveaux gènes impliqués dans le mécanisme d'inversion de phase flagellaire.

La méthode décrite ci-dessus ne permet pas d'identifier complètement les variants des autres sérovaires. Des méthodes complémentaires de géno-sérotypage permettraient de palier cette limite. Une des méthodes actuellement disponibles, permettant ce sérotypage moléculaire, a été utilisée partiellement pour compléter la confirmation moléculaire de la méthode ici décrite. Elle a parfois permis d'identifier d'autres sérovaires tels que *S. Coeln* et *S. Schwarzengrund*, dont étaient issus les variants monophasiques et immobiles de l'étude réalisées en 2011-2012. Cependant, cette approche de géno-sérotypage est encore expérimentale et nécessite d'être validée plus globalement.

Dans le cadre de la surveillance menées par les laboratoires, il est pertinent de réaliser une évaluation régulière de la situation épidémiologique en matière de salmonelles afin d'adapter le suivi, et le cas échéant les mesures de gestion dans les différentes filières à l'évolution des sérovaires (notamment émergents comme Kentucky récemment) et des profils d'antibiorésistance.

Références bibliographiques

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

ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire (2013). Avis de la saisine n° 2012-SA-0214, relatif à l'identification des variants de *Salmonella Typhimurium* et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole.

EFSA-ECDC, European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129 [250 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129. www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA, European Food Safety Authority (2010). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella Typhimurium-like*" strains. *EFSA Journal*, 8(10), p.1826. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1826.pdf

Bugarel M., Vignaud M.L., Moury F., Fach P., Brisabois A. (2012). Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology Open*. doi:10.1002/mbo3.3

Danan C., Frey S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A. (2009). Détermination du sérovar de souches de *Salmonella* isolées dans le secteur vétérinaire par la méthode d'agglutination rapide sur lame. *EuroReference*, No.2, CR2-09M01. http://www.afssa.fr/euroreference/Documents/CR2-Meth-SeroSalmo.pdf

Hamelin E., Pinson M., Bohnert M. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation N°54 Spécial MRE – Bilan 2011/novembre 2012, p. 54-59, http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BEP-mg-BE54_cle45f8*c.pdf

Herrera-Leon S., McQuiston J.R., Usera M.A., Fields P.I., Garaizar J., Echeita M.A. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2581-2586.

Hopkins, K. L., M. Kirchner, B. Guerra, S. A. Granier, C. Lucarelli, M. C. Porrero, et al. (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro. Surveill.* 15:19580.

Lailler R., Moury F., Granier S.A., Brisabois A. (2012). The *Salmonella* Network, a tool for monitoring *Salmonella* "from farm to fork".



Méthodes

Euroreference, n°8, hiver 2012. <http://www.anses.fr/euroreference/Documents/ER08-Reseaux-SalmonellaEN.pdf>

Lailler R., Moury F., Grout J., Laporte C., Morel V., Oudart C., Piquet C., Brisabois A. (2013). Monitoring of monophasic and non-motile variants of serotype Typhimurium among non-human strains collected by the French *Salmonella* Network, International Symposium "Salmonella and salmonellosis", I3S, 27-29 may 2013, Saint-Malo.

Mulvey M.R., Finley R., Allen V., Ang L., Bekal S., El Bailey S., Haldane D., Hoang L., Horsman G., Louie M., Robberts L., Wylie J., McCracken M., Langner S., Ahmed R., Tabor H., Gilmour M. (2013). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: result from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10, J. Antimicrob. Chemother. 68: 1982-1986.

Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8029 du 4 mars 2010, modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 relative à la mise en œuvre des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux de volailles – mesures relatives aux laboratoires. <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN20108059Z.pdf>

Soyer Y., Moreno Switt A., Davis A.M., Maurer J., McDonough P.L., Schoonmaker-Bopp D.J., Dumas N.B., Root T., Warnick L.D., Gröhn Y.T., Wiedmann M. (2009). *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J. Clin. Microbiol. 47(11):3546-3556.