



anses

Appui scientifique et technique de l'Anses
Demande n°2023-AST-0070

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 20 novembre 2025

**NOTE
d'appui scientifique et technique de
l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

relative aux « Méthodes alternatives à la mise en culture pour le dépistage des salmonelles en filière avicole »

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie, en mars 2023, par la Direction Générale de l'Alimentation, pour une demande d'appui scientifique et technique relatif aux méthodes alternatives à la mise en culture pour le dépistage des salmonelles en filière avicole. Ce présent AST s'est par conséquent intéressé à la possibilité d'utilisation de méthodes alternatives établies sur des méthodes en biologie moléculaire ou immunologiques, en remplacement des méthodes culturales normatives de référence pour la détection de *Salmonella* dans le cadre des analyses officielles en filière avicole.

1. CONTEXTE DE LA DEMANDE

La surveillance et le contrôle des zoonoses sont réglementés par la législation de l'Union Européenne relative aux zoonoses et aux maladies transmissibles (Directive 2003/99/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003, Règlement (CE) no 2160/2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire). Dans le règlement no 2160/2003, il est fait mention dans l'article 12 « de l'agrément des laboratoires, des critères de qualité et méthodes agréées de test ». Il est précisé dans cet article, que les laboratoires participants aux programmes de contrôle doivent être désignés par l'autorité compétente. Ces laboratoires doivent mettre en place un système d'assurance qualité conforme aux

critères des normes ISO en vigueur et participer régulièrement aux essais inter-laboratoires d'aptitudes (EdA) organisés ou coordonnés par le Laboratoire National de Référence (LNR). Par ailleurs, la détection d'agents zoototiques tels que *Salmonella* doit être réalisée à partir de méthodes et protocoles exigés par les organismes internationaux de normalisation. Ces méthodes servent de référence, elles peuvent être remplacées par d'autres méthodes à condition qu'elles aient été validées selon des critères reconnus au niveau international et qu'elles fournissent des résultats équivalents à ceux obtenus avec la méthode de référence concernée pour la matrice analysée (Règlement (CE) no 2160/2003).

Une méthode normative est une « procédure d'analyse », dite de référence, officiellement reconnue et publiée par un organisme de normalisation (publication sous format d'une norme). Elle respecte des critères stricts et rigoureusement validés afin de garantir la fiabilité, la reproductibilité et la comparabilité des résultats. Ces méthodes constituent des références officielles dans leur domaine. Une méthode alternative validée correspond quant à elle, à une procédure analytique différente de la méthode normative, ayant fait l'objet d'une validation selon des protocoles reconnus par des organismes accrédités tels que l'AFNOR Certification (pour la France). Ces méthodes alternatives doivent apporter des résultats équivalents voire supérieurs en termes de sensibilité, de spécificité ou de reproductibilité, tout en respectant les exigences réglementaires et les critères de qualité établis dans leur norme de référence.

L'objectif de cet AST est de dresser un état des lieux des éléments actuellement disponibles pour envisager la possibilité d'utiliser une méthode alternative, validée selon les prescriptions des organismes de certification nationaux ou internationaux, en remplacement d'une méthode culturelle normative pour la détection de *Salmonella*, lors des analyses réalisées dans le cadre des contrôles officiels en France. Il existe plusieurs organismes certificateurs reconnus à l'échelle européenne et internationale. En France, l'acteur majeur de certification est AFNOR Certification (NF Validation), validant les méthodes selon la norme NF EN ISO 6579-2. À l'échelle Européenne et internationale les acteurs majeurs sont respectivement MicroVal et l'AOAC Research Institute (Association of Analytical Communities).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». La question a été traitée par l'Anses, sans collectif d'experts. Les acteurs interrogés pour cet appui scientifique et technique sont les scientifiques de l'unité HQPAP (Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins) du laboratoire de l'Anses Ploufragan-Plouzané-Niort et le LNR *Salmonella*. Les déclarations d'intérêts des experts de l'Anses ayant contribué à la rédaction de cette note sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

Pour répondre à cet AST, les données disponibles, concernant les méthodes alternatives, sur le site de l'AFNOR ont été consultées (<https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/Salmonella/>).

3. ANALYSE DE LA DEMANDE

3.1 Dispositif de surveillance

L'objectif de la surveillance de *Salmonella* est de protéger la santé publique en prévenant les toxi-infections alimentaires collectives pouvant être liées au portage asymptomatique de la bactérie chez les volailles et à sa transmission tout au long de la chaîne alimentaire. En France, le dispositif de surveillance assure l'application de la réglementation européenne via les arrêtés ministériels d'application concernant la lutte contre les infections à *Salmonella* en filière avicole (espèces *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo*) listés ci-dessous :

- Arrêté du 27 février 2023 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation et dans les troupeaux de reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus* ou *Meleagris gallopavo* ;
- Arrêté du 24 avril 2013 relatif à la lutte contre les infections à salmonelles considérées comme dangers sanitaires de première catégorie dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement et fixant les modalités de déclaration des salmonelles considérées comme dangers sanitaires de deuxième catégorie dans ces troupeaux.

L'arrêté du 03 mai 2022 « listant les maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime », classe les sérotypes de *Salmonella* en deux groupes. En cas de détection, les sérotypes de *Salmonella* classés dans le groupe 1 font l'objet à la fois d'une surveillance et de la mise en place de mesures de police sanitaire dans les élevages concernés, tandis que ceux du groupe 2 sont uniquement soumis à une surveillance (A. Huneau-Salaün et al., 2024). Compte tenu de ce cadre réglementaire, il est indispensable d'identifier le sérotype des salmonelles isolées lors des analyses officielles (Tableau 1).

Tableau 1 : Souches de *Salmonella* du groupe 1 selon les productions avicoles

Productions avicoles	<i>Salmonella</i> du Groupe 1		
	<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> *	<i>S. Enteritidis</i> ,	<i>S. Typhimurium</i> * et
	<i>S. Kentucky</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Virchow</i>	<i>S. Hadar</i>	<i>S. Kentucky</i>
<i>Gallus gallus</i> (reproduction)	X		
<i>Meleagris gallopavo</i> (reproduction)		X	
<i>Gallus gallus</i> (production)		X	
<i>Meleagris gallopavo</i> (production)		X	

**S. Typhimurium* et ses variants de *S. Typhimurium* (*S. 1,4,[5],12:i:-* ; *S. 1,4,[5],12:-:1,2* et *S. 1,4,[5],12:-:-*)

3.2 Méthodes de détection de *Salmonella*

Les analyses officielles, sont réalisées par des laboratoires agréés ou reconnus pour la mise en œuvre des analyses de détection de *Salmonella* dans les échantillons prélevés.

À ce jour, la liste des méthodes d'analyses pour la recherche des salmonelles, dans les différents prélèvements réalisés dans les élevages de volailles, considérés par les arrêtés du 27 février 2023 et du 24 avril 2013, ne

comprend que les méthodes normatives (Tableau 2). L'arrêté du 24 avril 2013, précise que la recherche de *Salmonella* peut être réalisée pour les prélèvements de fientes et de poussières, selon les textes de référence correspondant, soit aux normes NF U 47 100, NF U 47-100 adapté ou NF EN ISO 6579-1. Par ailleurs, cet arrêté précise que pour les prélèvements de muscle, la recherche de *Salmonella* est effectuée selon la méthode NF EN ISO 6579-1 ou selon toute autre méthode validée par l'AFNOR conformément à la norme NF EN ISO 16140 (notamment la partie 2 : NF EN ISO 16140-2).

Tableau 2 : Correspondance entre les prélèvements et les méthodes d'analyse normatives associées pour la recherche de *Salmonella*

Normes	Prélèvements
NF U 47-100 ou NF EN ISO 6579-1 (partie PPS)	Chiffonnettes environnement, poussières
NF U 47-100 ou NF EN ISO 6579-1 (partie PPS)	Pédichiffonnettes ou fientes
NF U 47-100 ou NF EN ISO 6579-1 (partie PPS)	Garnitures de fonds de boîtes (poussins, dindonneaux)
NF U 47-100 ou NF EN ISO 6579-1 (partie PPS)	Aliment pour animaux prélevé à l'élevage
NF EN ISO 6579-1	Aliment pour animaux prélevé en dehors de l'élevage
NF EN ISO 6579-1	Œufs (consommation humaine)
NF U 47-101	Œufs bêchés non éclos
NF U 47-101	Foies, ovaires, caeca
NF EN ISO 6579-1	Muscle

Note : Dans certains cas (prélèvements dans des élevages d'engraissement de dindes ou poulet de chair) la méthode normative NF U 47-100 peut être remplacée par la NF U 47-100 adaptée (une seule voie d'isolement).

PPS : Productions primaires

3.2.1 Norme NF U 47-100

La norme NF U47-100, publiée en juillet 2007, porte le titre suivant : Méthodes d'analyse en santé animale - Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales. Cette norme Française décrit la procédure de détection des *Salmonella* dans les prélèvements issus des filières de production animale : dans les prélèvements réalisés sur les matériels d'élevage, les rejets et effluents d'animaux (fumiers, fientes, lisiers, etc.), ainsi que dans l'environnement des élevages (chiffonnettes, poussières, terres, matières fécales, systèmes de prélèvements portés aux pieds, eaux d'abreuvoirs, etc.), des couvoirs (fonds de boîtes, pailles artificielles, chiffonnettes, papiers d'éclosoirs, duvets, méconium, etc.). Elle repose sur une méthode de détection en quatre étapes successives (Figure 1).

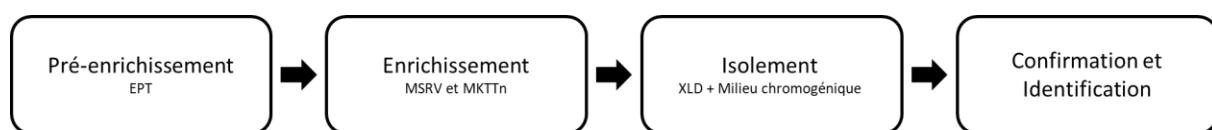


Figure 1 : Étape de détection de *Salmonella* spp. selon la norme NF U 47-100.

Le pré-enrichissement en eau peptonée tamponnée (EPT) permet de revivifier et de multiplier les salmonelles, mais aussi les autres types de bactéries éventuellement associées au prélèvement. L'enrichissement en milieu sélectif liquide ou semi-solide permet ensuite de multiplier sélectivement *Salmonella*. Dans la norme NF U 47-100, cette phase d'enrichissement sélectif doit utiliser deux milieux d'enrichissement différents : le milieu gélosé semi-solide modifié de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) et le bouillon de Müller-Kauffmann au tétrathionate (MKTn). L'isolement des souches s'effectue ensuite sur gélose sélective, suivi d'une confirmation biochimique des colonies présumées, puis d'une identification sérologique.

3.2.2 Norme NF U 47-101

La norme NF U47-101, publiée en novembre 2007, porte le titre suivant : Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux. Cette norme Française décrit la procédure de recherche des salmonelles chez les oiseaux, dans les œufs à couver à différents stades de l'embryogenèse et à partir de prélèvements d'organes, présentant ou non une maladie et/ou des lésions. Elle s'applique plus particulièrement à la mise en évidence de *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella enterica* subsp. *arizona* ou *diarizonae*. Cette norme requiert, selon le cas et selon le prélèvement analysé, soit un isolement direct sur milieu non sélectif, soit une méthode en quatre étapes successives (pré-enrichissement, enrichissement sélectif, isolement sélectif, confirmation et identification), soit les deux techniques en parallèle (Figure 2).

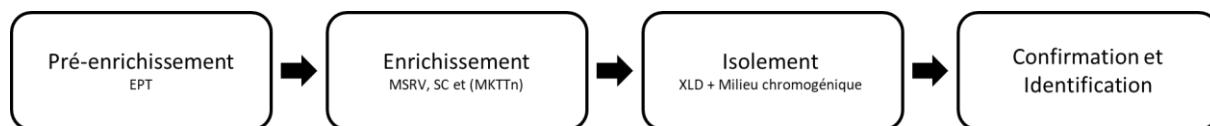


Figure 2 : Étape de détection de *Salmonella* spp. selon la norme NF U 47-101 (cas de la recherche de tous sérotypes de salmonelles y compris Gallinarum).

3.2.3 Norme NF EN ISO 6579-1

La norme NF EN ISO 6579-1, publiée en avril 2017, porte le titre suivant : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : recherche des *Salmonella* spp. Cette norme internationale décrit une méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella* spp. dans les produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale, dans les échantillons environnementaux, dans le domaine de la production et de la manutention de denrées alimentaires et dans les échantillons au stade de la production primaire, tels que des matières fécales, de la poussière ou des prélèvements de surface. Elle repose également sur une méthode de détection en plusieurs étapes successives (Figure 3). Des étapes de culture supplémentaires peuvent être nécessaires pour la recherche de certains sérotypes spécifiques comme *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi. Dans cette norme, le milieu d'enrichissement sélectif MSRV permet la recherche des salmonelles mobiles et n'est pas adapté à la détection des souches immobiles.

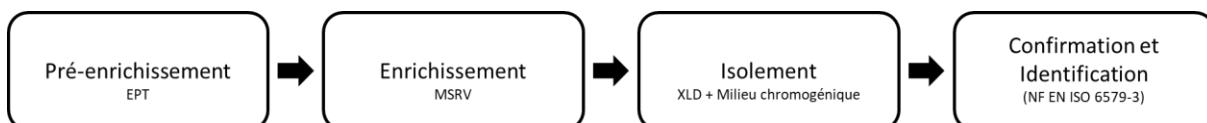


Figure 3 : Étape de détection de *Salmonella* spp. selon la norme NF EN ISO 6579-1 (partie PPS).

3.3. Résultats des analyses

À l'issue des analyses, le résultat rendu par le laboratoire indique la détection ou non de *Salmonella* ainsi que le sérotype détecté le cas échéant (NF U 47-100 et NF U 47-101). En ce qui concerne, la norme NF EN ISO 6579, la partie identification du sérotype est réalisée conformément à la norme NF EN ISO 6579-3 (Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et la sérotypie des *Salmonella* - Partie 3 : lignes directrices pour la sérotypie des *Salmonella* spp.), faisant suite à l'isolement de la souche. La souche est isolée et peut être mise en collection pour des caractérisations ultérieures (séquençage WGS). Cette étape de sérotypage est importante pour les salmonelles du groupe 1, au regard des mesures de police sanitaire qui sont mises en place à l'élevage en cas de détection. Cela concerne en particulier *S. Typhimurium* et son variant monophasique (1,4,[5],12:i:-), pour lesquels il est important de confirmer le résultat et de distinguer le variant monophasique de *S. Typhimurium* d'autres variants d'autres sérotypes de *Salmonella* ayant une formule antigénique proche (par exemple : *S. Lagos* (1,4,[5],12:i:1,5) ou *S. Agama* (4,12:i:1,6)). La confirmation de la différenciation entre les sérotypes de *Salmonella* Typhimurium et non Typhimurium peut être réalisée par une analyse PCR décrite dans la NF EN ISO 6579-4.

3.4 Conservation des souches de *Salmonella*

Les laboratoires agréés ou reconnus pour la mise en œuvre des analyses de détection de *Salmonella* dans les échantillons prélevés, conformément à la Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8029 du 4 mars 2010, modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 relative à l'application des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux de volailles, doivent transmettre au LNR *Salmonella*, les souches de *Salmonella*, isolées dans le cadre des prélèvements obligatoires couverts par le plan de lutte. Ces souches y sont stockées en gélose de conservation pendant une période minimale de deux ans.

3.5 Méthodes alternatives

La norme NF EN ISO 16140 concerne le domaine de la Microbiologie de la chaîne alimentaire et la validation de méthodes. D'après cette norme, une méthode alternative, est une méthode d'analyse permettant de détecter ou de quantifier, pour une catégorie de produits donnée, le même analyte que celui détecté ou quantifié par la méthode de référence correspondante. Cette méthode doit faire l'objet d'une validation et démontrer des performances équivalentes, voire supérieures en termes de sensibilité, spécificité ou de reproductibilité, tout en respectant les exigences de la norme NF EN ISO 16140.

Les méthodes alternatives disponibles pour la détection de *Salmonella* reposent généralement sur trois types de méthodes : la recherche par isolement sur milieux de culture spécifiques, la détection via des méthodes moléculaires ou via des tests immunologiques. Toutes ces méthodes intègrent une étape de pré-enrichissement

de la bactérie préalable à la phase de détection. Cet AST concerne uniquement les méthodes moléculaires et les tests immunologiques.

3.5.1 Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires de détection par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) sont basées sur une amplification cible d'une séquence d'ADN de l'organisme recherché. La méthode moléculaire consiste en une première étape préalable d'extraction (extraction de l'ADN présent dans l'échantillon analysé), puis d'une seconde étape d'amplification de l'ADN cible s'il est présent (cette seconde étape se fait à l'aide d'un mélange réactionnel comprenant les amorces, l'enzyme (ADN polymérase), les nucléotides, etc.) et par une dernière étape de détection du produit amplifié par PCR. Contrairement aux méthodes de culture nécessitant la croissance des microorganismes sur des milieux spécifiques, la PCR peut permettre, dans la limite de son seuil de détection, une identification directe des séquences d'ADN ciblées mais également, une détection des bactéries qui se trouvent à l'état viable mais non cultivable.

3.5.2 Méthodes immunologiques

Les tests immunologiques pour la détection de *Salmonella* reposent, sur la reconnaissance ciblée d'antigènes présents à la surface de la bactérie par des anticorps spécifiques. L'interaction antigène-anticorps est souvent révélée à l'aide d'une réaction enzymatique colorimétrique (tests ELISA) ou par fluorescence.

3.6 Étude de la possibilité d'implémenter des méthodes alternatives à la mise en culture pour le dépistage des salmonelles en filière avicole

3.6.1 Éléments en faveur de l'utilisation de méthodes alternatives

L'utilisation d'une méthode alternative validée (conformément à la norme NF EN ISO 16140-2) garantit la qualité et la fiabilité de l'analyse. Par ailleurs, elle peut permettre un gain de temps par rapport à la méthode normative (des résultats pouvant par exemple être obtenus pour certaines méthodes en 24 à 48 heures, contre généralement 3 à 5 jours pour la norme NF EN ISO 6579-1) dans le cas d'un résultat négatif de *Salmonella*. De plus, ces méthodes sont souvent compatibles avec des systèmes automatisés, ce qui peut faciliter leur mise en œuvre au sein des laboratoires.

3.6.2 Éléments à considérer pour l'utilisation de méthodes alternatives

Selon la NF EN ISO 16140-2, la validation d'une méthode alternative est réalisée par une étude comparative par rapport à une méthode de référence. À ce jour, seules des méthodes alternatives validées à partir de la norme NF EN ISO 6579-1 sont disponibles pour la détection de *Salmonella* ; aucune validation n'a été réalisée à partir des méthodes de référence NF U 47-100 ou NF U 47-101.

De plus, la portée de la validation de ces méthodes alternatives est généralement restreinte à des matrices définies (aliment, aliment pour animaux, échantillons environnementaux, etc.), ce qui limite leur applicabilité. En effet, la méthode alternative choisie en remplacement de la norme NF EN ISO 6579-1, dans le cadre des contrôles officiels, doit être validée sur la matrice d'intérêt (fiente, échantillons environnementaux d'élevage, muscle, etc.).

Actuellement, seules quelques méthodes alternatives sont validées pour la détection de *Salmonella* dans les fientes/fèces (productions primaires en comparaison avec la NF EN ISO 6579-1). En l'absence de validation pour certaines matrices, une extension de la validation doit être engagée par le fournisseur de la méthode ou mise en œuvre par le laboratoire utilisateur, dans le cadre d'une validation interne respectant les exigences des normes NF EN ISO/IEC 17025 et de la NF EN ISO 16140-4.

Ces méthodes alternatives permettent la détection de *Salmonella*. Cependant, la réglementation française en vigueur impose l'identification du sérotype des salmonelles détectées lors des analyses officielles, les mesures mises en place n'étant pas les mêmes selon le sérotype identifié. Par conséquent dans le cas d'une détection de *Salmonella*, si la méthode alternative ne prévoit pas une étape d'identification du sérotype, il est obligatoire de l'identifier en complément pour être conforme aux exigences réglementaires.

Par ailleurs, cette réglementation impose également l'envoi systématique des souches de *Salmonella* isolées, dans le cadre des analyses de contrôle officiel, au LNR *Salmonella*. Cette exigence permet de garantir une surveillance épidémiologique de la filière avicole en France et la caractérisation approfondie des souches en termes de typage (séquençage WGS) et de résistance aux antibiotiques. Par conséquent, indépendamment de la méthode analytique utilisée, il est indispensable de disposer d'une approche méthodologique permettant non seulement la détection mais également l'isolement des souches de *Salmonella* à partir des échantillons identifiés comme positifs lors des analyses de contrôles officiels.

De plus, l'isolement des souches de *Salmonella* est également nécessaire pour toutes les études épidémiologiques qui nécessitent une caractérisation approfondie des souches. Ainsi l'utilisation seule de la PCR, sans isolement de la souche, ne permet pas la mise en œuvre du séquençage et la mise en évidence des sérotypes ne pouvant pas être déterminés par PCR.

3.6.3 Utilisation des méthodes alternatives par les laboratoires

Lors des EdA organisés par le LNR *Salmonella*, les participants ont la possibilité de rendre leurs résultats à la fois avec la méthode normative et avec une méthode alternative de leur choix. Cette double approche offre l'opportunité de comparer les performances des méthodes alternatives qu'ils utilisent vis-à-vis de la méthode normative mise en place dans ces essais (NF U 47-100, NF EN ISO 6579-1). Hormis quelques rares exceptions, les résultats obtenus et rendus par les laboratoires pour ces deux approches sont concordants. Néanmoins, il est important de rappeler que l'utilisation de ces méthodes alternatives nécessite une validation sur les matrices concernées, ainsi qu'un cadre réglementaire clairement défini les y autorisant (ex : instructions techniques).

3.7 Impact de l'utilisation de la PCR sur les délais d'acheminement et de mise en analyse des prélèvements

Le délai d'acheminement et de mise en analyse peut avoir un impact sur la croissance des souches bactériennes lors de l'étape de pré-enrichissement, quelle que soit la méthode de détection utilisée pour *Salmonella*. En effet, un transport prolongé peut entraîner une diminution de la viabilité de *Salmonella* en raison du développement de la flore annexe et/ou aux conditions de températures défavorables. Ainsi un délai d'acheminement prolongé peut compromettre la détection y compris lors de l'utilisation d'une méthode par PCR.

3.8 Impact de l'utilisation de la PCR sur la mise en évidence des absences de pousse sur milieu sélectif

Par définition, la PCR peut permettre une identification directe des séquences d'ADN ciblées provenant de cellules viables ou non. Par conséquent en fonction de la quantité d'ADN cible présente, avant l'étape de pré-enrichissement et dans la limite du seuil de détection de la méthode, la détection de souches de *Salmonella* pourrait être mise en évidence même en cas d'absence de pousse sur milieux sélectifs. Toutefois, une étape de confirmation à partir d'un isolement est nécessaire, comme mentionné précédemment ; ainsi dans le cas d'une absence de pousse il ne sera pas possible de confirmer la présence de *Salmonella*.

3.9 État des lieux des méthodes alternatives existantes

À notre connaissance seule une petite partie des méthodes alternatives sont actuellement validées pour la détection de *Salmonella* dans les fientes/fèces (productions primaires).

Il s'agit de méthodes moléculaires certifiées AFNOR, NF Validation (<https://nf-validation.afnor.org/domaine-agroalimentaire/Salmonella/> accès le 30 juin 2025) ou certifiées MicroVal (<https://microval.org/en/issued-certificates/> accès le 30 juin 2025), comme les méthodes suivantes :

- PCR GENE-UP® *Salmonella* (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de la production primaire),
- SureTect™ *Salmonella* species Typhimurium et Enteritidis Multiplex PCR Assay (pour la détection de *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium*, validées sur des échantillons issus de la production primaire et environnementaux),
- iQ-Check™ *Salmonella* II (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de l'environnement de la production primaire)
- MicroSEQ *Salmonella* spp. (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de l'environnement de la production primaire)
- Kit Neogen® de détection moléculaire 2 – *Salmonella* (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de l'environnement de la production primaire)
- RealPCR* *Salmonella* spp. DNA Test (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de l'environnement de la production primaire)
- Vetproof® *Salmonella* qPCR LyoKit (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons de l'environnement issus de la production primaire).
- Kylt *Salmonella* spp. 2.0 (pour la détection de *Salmonella* spp. sur des échantillons issus de la production primaire),

Il est à noter que dans le cadre de la marque NF Validation, toutes les méthodes alternatives pour la recherche de *Salmonella* doivent systématiquement prévoir une étape de confirmation des résultats positifs à partir d'une colonie caractéristique dans leur protocole d'analyse.

Lorsque la détection par PCR cible *Salmonella* spp., celle-ci comprend la détection de *S. Typhimurium* et celle de ses variants (*S. 1,4,[5],12:i:-* ; *S. 1,4,[5],12:-:1,2* et *S. 1,4,[5],12:-:-*). Lorsque la PCR est spécifique du sérotype *S. Typhimurium*, les informations du fournisseur permettent de confirmer si les variants sont pris en compte dans

cette détection (ce qui est par exemple le cas pour la méthode SureTect™ *Salmonella* species Typhimurium et Enteritidis).

Par ailleurs, certaines méthodes alternatives permettent de réaliser un sérotypage moléculaire en remplacement du sérotypage conventionnel. Toutefois, ces méthodes restent limitées à certains sérotypes (ex : Check & Trace *Salmonella* 2.0).

3.10 Différenciation des souches vaccinales et sauvages de *Salmonella* par PCR

La différenciation entre les souches vaccinales et les souches sauvages peut principalement se faire de deux façons : *via* l'évaluation de la résistance à des antimicrobiens (les souches vaccinales présentant des résistances particulières en comparaison des souches sauvages) ou *via* des outils de détection PCR spécifiques des souches vaccinales. Les vaccins vivants introduits en élevage sont systématiquement accompagnés d'une méthode PCR spécifique, recommandée et validée par le fabricant pour leur détection (Tableau 3). À ce jour, les méthodes alternatives de détection des salmonelles, pour la certification NF validation, n'incluent pas les souches vaccinales de *Salmonella* dans leur liste de souches obligatoires à tester.

Tableau 3 : Méthodes de différenciation disponibles pour les souches de *Salmonella* vaccinales

Vaccins	Méthodes de différenciation des souches de <i>Salmonella</i> vaccinales des souches sauvages (proposées par les fournisseurs de vaccins)	
	Profil d'antibiorésistance	PCR
AVIPRO SALMONELLA DUO (ELANCO) <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium	- Résistance à la streptomycine - Résistance à l'acide nalidixique - Résistance à la rifampicine - Sensible aux fluoroquinolones - Sensible à l'érythromycine	- PCR « Home Made recommandée par ELANCO » ou - PCR Kylt® SE DIVA 2 (avec pour recommandation de réaliser la PCR Kylt® Salm spp. 2.0 en amont)
Salmovac 440 (CEVA) <i>Salmonella</i> Enteritidis	- Résistance à la sulfamérazine (seul) - Sensible à l'ampicilline, au céfotaxime, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à la gentamycine, à la kanamycine, à l'oxytétracycline, à la streptomycine. - Sensible à la sulfamérazine et au triméthoprime en association.	- PCR Kylt® SE DIVA 1 (avec pour recommandation de réaliser la PCR Kylt® Salm spp. 2.0 en amont)

4. CONCLUSION

Le recours à des méthodes alternatives n'est autorisé que si celles-ci sont validées conformément à la norme NF EN ISO 16140, et qu'elles démontrent une équivalence en termes de spécificité, sensibilité, et robustesse par rapport à la méthode de référence, et ce, sur les matrices d'intérêt (notamment les productions primaires). L'utilisation d'une méthode alternative validée pour la détection de *Salmonella* dans le cadre des contrôles officiels présente l'avantage de réduire les délais d'obtention des résultats, ce qui facilite la gestion, en particulier en cas de résultats négatifs. En revanche, en cas de résultats positifs, les méthodes alternatives reposant sur des principes moléculaires ou immunologiques doivent permettre l'isolement de la souche et l'identification

complète de son sérotype, deux exigences de la réglementation française en vigueur. Les méthodes alternatives validées disponibles à ce jour pour la détection de *Salmonella* dans les fientes/fèces sont recensées dans cet AST. Concernant la détection de *S. Typhimurium* et de ses variants, dans les échantillons au stade des productions primaires, une méthode moléculaire alternative certifiée NF Validation, est actuellement disponible.

Le délai d'acheminement et de la mise en analyse des échantillons peuvent avoir un impact négatif sur la détection de *Salmonella* même lors de l'utilisation de la PCR. De plus, les méthodes PCR ne constituent pas une alternative à la vérification des absences de pousse sur milieu sélectif.

La différenciation des souches de *Salmonella* vaccinales des souches sauvages peut être réalisée à l'aide de PCR spécifiques à partir de souches isolées en suivant les recommandations des fournisseurs.

MOTS-CLÉS

Salmonella, méthode normative, méthode alternative.

BIBLIOGRAPHIE

- Huneau-Salaün, G. Tribehou, J. Jachacz, L. Bonifait, S. Carles, I. Tapie, S. Le Bouquin (2024) Bilan du programme de lutte contre *Salmonella* dans les troupeaux des espèces de *Gallus gallus* et *Meleagris gallopavo* en 2022 en France. Bulletin Epidémiologique. Volume 100, Article 08

REFERENCES REGLEMENTAIRES

- RÈGLEMENT (CE) No 2160/2003 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire. Journal officiel de l'Union européenne du 12.12.2003
- Arrêté du 27 février 2023 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation et dans les troupeaux de reproducteurs de l'espèce *Gallus gallus* ou *Meleagris gallopavo*.
- Arrêté du 3 mai 2022 listant les maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime
- Arrêté du 24 avril 2013 relatif à la lutte contre les infections à salmonelles considérées comme dangers sanitaires de première catégorie dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement et fixant les modalités de déclaration des salmonelles considérées comme dangers sanitaires de deuxième catégorie dans ces troupeaux
- 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>
- NF U 47-100 (2007) : Méthodes d'analyse en santé animale - Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales

- NF U47-101 (2007) : Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux
- NF EN ISO 6579-1 (2017) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : recherche des *Salmonella* spp.
- NF EN ISO 6579-1/A1 (2020) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : recherche des *Salmonella* spp. - Amendement 1 : extension de la plage de températures pour l'incubation, amendement du statut de l'Annexe D et correction de la composition des milieux MSRV et SC
- FD CEN ISO/TR 6579-3 (2014) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et la sérotypie des *Salmonella* - Partie 3 : lignes directrices pour la sérotypie des *Salmonella* spp.
- NF EN ISO 6579-4 (2025) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 4: identification du variant monophasique de *Salmonella Typhimurium* (1,4,[5],12:i:-) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
- NF EN ISO 16140-2 (2016) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence
- NF EN ISO 16140-2/A1 (2024) : Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence - Amendement 1 : Révision de l'évaluation des données des études de comparaison de méthodes qualitatives, des calculs du niveau de détection de l'étude interlaboratoires et de l'interprétation de l'étude de justesse relative, et ajout d'un protocole pour la détermination de la stérilité commerciale pour des produits spécifiques
- NF EN ISO/IEC 17025 (2017) : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais

CONTRIBUTEURS A L'AST

Mme Marianne CHEMALY : Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP), chef d'unité

Mme Caroline LE MARECHAL : Unité HQPAP, chef d'unité adjointe

Mme Muriel GUYARD : Unité HQPAP, chargée de projets de recherche

Mme Laetitia BONIFAIT : Unité HQPAP, responsable LNR *Salmonella*