

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**RECHERCHE DES SALMONELLES
DANS LES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS
PAR CONDUCTANCE-METRIE**

par

*LEGIOT Anne-Dominique, LE MAO Patrick,
CONVENANT Alette et PENOT Julia*

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL08032



R.INT.DEL/93.14/ST-MALO

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

IFREMER
2 bis rue Grout St-Georges
B.P. 46
35402 ST-MALO CEDEX

AUTEURS : LEGIOT Anne-Dominique, LE MAO Patrick, CONVENANT Alette, PENOT Julia	CODE : N° R.INT.DEL/93.14/SM
TITRE : RECHERCHE DES SALMONELLES DANS LES MOLLUSQUES BIVALVES MARINS PAR CONDUCTANCE-METRIE	date : 15/11/1993 tirage nb : 50 nb pages : 47 nb figures : 24 nb photos :
CONTRAT : <i>(intitulé)</i> N°	DIFFUSION libre : X restreinte : confidentielle :

RESUME :

La conductance-métrie est une nouvelle méthode d'analyse bactériologique. Elle est utilisée dans de nombreux produits alimentaires pour la détection des salmonelles. La réponse (absence ou présence présumée) est donnée plus rapidement par cette technique que par les techniques classiques, permettant ainsi de diminuer le risque sanitaire lié à ce pathogène.

La méthode a été testée sur différents coquillages artificiellement contaminés par les souches de salmonelles les plus fréquemment retrouvées dans le milieu naturel. Les résultats obtenus indiquent qu'elle pourrait convenir pour le milieu marin.

Toutefois des tests sur coquillages naturellement contaminés sont nécessaires pour établir sa fiabilité avant son application en routine.

MOTS-CLES : Conductance-métrie, Salmonelles, Mollusques bivalves.

SOMMAIRE

	page
ABREVIATIONS	3
Préliminaire	4
1 – OBJECTIFS DU TRAVAIL	5
2 – POINT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET	5
2.1. Généralités sur les salmonelles	5
2.1.1. famille des Enterobacteriaceae	5
2.1.2. caractères cultureux	6
2.1.3. caractères biochimiques	6
2.1.4. caractères antigéniques	6
2.1.5. pouvoir pathogène	6
2.2. Le système Malthus	7
2.2.1. généralités sur la conductance-métrie	7
2.2.2. l'appareil Malthus 2000 (modèle 2120)	8
2.2.2.1. MALTHUS et dénombrement de coliformes.....	8
2.2.2.2. MALTHUS et détection des salmonelles.....	8
2.3. Diagnostic présomptif complémentaire : le test au latex	13
2.3.1. principe	13
2.3.2. exemple.....	13
2.3.3. limites d'application	13
3 – PROTOCOLE DE L'ETUDE	14
3.1. Contamination de l'eau	14
3.1.1. mode opératoire.....	14
3.1.2. interprétation	15
3.2. Contamination des coquillages	16
3.2.1. description	16
3.2.2. intérêts	19
3.2.3. premiers essais.....	20
3.3. Changements dans le protocole.....	22
3.3.1. motifs.....	22
3.3.2. présentation du nouveau protocole.....	22

	page
4 – RESULTATS	23
4.1. Couple : <i>Salmonella bredeney</i> /huîtres	23
4.1.1. tableau récapitulatif	23
4.1.2. remarques concernant les résultats	23
4.1.3. les courbes de conductance	23
4.2. Couple : <i>Citrobacter freundii</i> /huîtres	26
4.2.1. les courbes de conductance – cas général	26
4.2.2. cas particuliers	27
4.3. Couple : <i>Citrobacter freundii</i> + <i>Salmonella bredeney</i> /huîtres	28
4.3.1. tableau récapitulatif	28
4.3.2. remarques concernant les résultats	28
4.3.3. les courbes de conductance – cas général	28
4.3.4. cas particuliers	30
4.4. Couple : <i>Salmonella bredeney</i> /coques	30
4.4.1. tableau récapitulatif	30
4.4.2. les courbes de conductance – cas général	31
4.4.3. cas particuliers	32
4.5. <i>Salmonella typhimurium</i>	33
5 – INTERPRETATION	34
5.1. Comparaison des 3 méthodes	34
5.2. Allure générale des courbes de conductance	36
5.3. Particularités des courbes selon germes, coquillages, milieux	37
5.3.1. couple <i>Salmonella bredeney</i> /huîtres	37
5.3.2. couple <i>Citrobacter freundii</i> /huîtres	38
5.3.3. couple <i>Citrobacter freundii</i> + <i>Salmonella bredeney</i> /huîtres	38
5.3.4. couple <i>Salmonella bredeney</i> /coques	38
6 – COMMENTAIRES	39
ANNEXES	40
BIBLIOGRAPHIE	46

Abréviations

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER.

AOAC : Association of Official Analytical Chemists.

DEL : Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral.

CNEVA : Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires

LCHA : Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire

AFNOR : Association Française de Normalisation

T.I.A. : Toxi Infection Alimentaire.

TMAO : Triméthylamine N oxide.

TMA : Triméthylamine.

EPTM : Eau peptonée tamponnée Malthus.

EPT : Eau peptonée tamponnée.

SS1 : Salmonella selective broth 1.

SS2 : Salmonella selective broth 2.

Intérêt de la recherche des salmonelles en milieu marin

Le milieu marin est le réceptacle de contaminations microbiologiques d'origines diverses telles que les rejets directs en mer des eaux usées urbaines ou l'entraînement par les rivières et les pluies de déjections animales. Les germes ainsi apportés sont capables de survivre malgré la salinité importante de l'eau. BUTTIAUX et LEURS (in GEVAUDAN, 1987) ont pu observer qu'après 44 h de contact avec l'eau fraîchement prélevée dans la mer du Nord, 50 % des salmonelles ensemencées étaient toujours vivantes. La dispersion des bactéries est aussi assurée grâce aux courants et aux marées.

Or ces contaminations ne se limitent pas seulement aux eaux. Les coquillages, et donc les mollusques bivalves, peuvent héberger les différentes bactéries présentes dans le milieu. Ils ont de plus un rôle concentrateur : en filtrant des quantités importantes d'eau pour assurer leur respiration et leur nutrition, ils retiennent les particules, dont les bactéries, qu'elles soient libres ou associées aux aliments absorbés. En plongeant des moules deux heures dans une eau contenant 1 bactérie pour 100 ml, la concentration dans les mollusques peut ainsi atteindre 1 bactérie par ml (WEBER in TROLOPPE, 1984).

Etant plus concentrées, les bactéries sont plus faciles à déceler dans les coquillages que dans l'eau de mer. Leur recherche sert à assurer la sécurité du consommateur mais aussi la surveillance de la qualité des eaux du littoral.

Le bio-indicateur couramment choisi pour évaluer la pollution microbiologique est *Escherichia coli*. Il semble toutefois judicieux de mettre en évidence directement les salmonelles. Celles-ci représentent en effet un risque sanitaire ; les toxi-infections alimentaires dues à ce germe en sont la preuve. La recherche de cette bactérie semble plus fiable que celle des germes témoins de contamination fécale tels que coliformes ou streptocoques fécaux, la présence de salmonelles ayant été détectée dans des secteurs considérés comme corrects selon les critères de germes-tests.

On comprend mieux alors l'importance d'une telle recherche tant pour le suivi de la qualité environnementale que pour la protection de la santé publique.

1 – OBJECTIFS DU TRAVAIL

La recherche des salmonelles peut s'effectuer par plusieurs méthodes. La méthode officielle de l'AFNOR comporte notamment un isolement sélectif sur gélose lactosée au rouge de phénol et au vert brillant (annexe 1). Une autre méthode faisant aussi appel à la microbiologie traditionnelle est fréquemment utilisée : il s'agit d'une méthode incluant un isolement sur gélose de Rambach (annexe 2).

A côté de ces méthodes conventionnelles impliquant des délais de réponses importants, sont apparues des méthodes plus rapides parmi lesquelles la conductance-métrie développée par la société Malthus Instrument (voir chapitre 2.2.). Ce procédé a été testé sur de nombreux produits alimentaires et sa fiabilité ainsi que ses avantages ont été établis. Cependant les coquillages, de par leur salinité, présentent un caractère particulier pouvant interférer sur les résultats de cette méthode.

Une étude approfondie est donc nécessaire pour apprécier la **possibilité d'utiliser le système Malthus pour la recherche des salmonelles en milieu marin**. Pour être valable, cette étude doit être la plus représentative possible de la réalité. C'est pourquoi elle s'effectue dans un premier temps à partir de **contaminations artificielles des coquillages vivants** et non à partir des broyats, puis dans un second temps, les coquillages analysés seront prélevés directement dans le **milieu naturel**.

Une comparaison est faite en parallèle avec les méthodes conventionnelles citées ci-dessus.

Cette étude est aussi l'occasion d'**apprécier en routine les avantages** couramment admis du système Malthus : fiabilité, rapidité, simplicité...

2 – POINT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET

2.1 – Généralités sur les salmonelles

2.1.1. famille des Enterobacteriaceae

Les salmonelles font partie de la famille des Enterobacteries, famille présentant les caractères communs suivants :

- bacille gram (-)
- fermentation du glucose
- oxydase négative
- réduction des nitrates en nitrites

2.1.2. caractères culturaux

Ces germes ont une respiration de type aéro-anaérobie facultatif. Ils cultivent sur milieu ordinaire à 37°C. Les colonies fraîchement isolées apparaissent rondes, bombées, lisses et brillantes.

2.1.3. caractères biochimiques

La majorité des salmonelles ne fermentent pas le lactose (sauf *Salmonella arizonae*). Elles fermentent certains sucres avec production de gaz excepté pour *S. typhi*, *S. pullorum-gallinarum* et *S. dublin*). Elles produisent en général de l'H₂S (Hydrogène sulfureux).

D'autres caractères biochimiques sont plus particulièrement intéressants pour la détection des salmonelles par conductance-métrie :

- elles possèdent une **lysine-décarboxylase** (sauf *S. paratyphi A*).
- elles **fermentent** en majorité le **dulcitol**.
- une propriété particulière aux salmonelles est utilisée pour provoquer un changement important de conductance pendant la croissance bactérienne : la **réduction du Triméthylamine N oxide (TMAO) en Triméthylamine (TMA)**.

2.1.4. caractères antigéniques

Trois types d'antigènes sont intéressants pour le sérotypage des salmonelles. Les antigènes de paroi (antigènes O), les antigènes d'enveloppe, les antigènes flagellaires (antigènes H) permettent en effet de différencier chacun des sérotypes de salmonelles (plus de 2 000).

2.1.5. pouvoir pathogène

La plupart des coquillages retiennent beaucoup de particules de diamètre compris entre 1 et 4 µm. Cet ordre de grandeur étant aussi celui des salmonelles, le risque sanitaire est bien réel pour le consommateur.

Les salmonelles sont pathogènes, soit exclusivement pour l'homme, soit exclusivement pour l'animal, soit le plus souvent pour les deux.

*D'une manière générale, chez l'homme, elles peuvent provoquer des syndromes thyphoïdiques graves. La contamination est, dans ce cas, transmise d'homme à homme par l'absorption d'eau ou d'aliments souillés par les déjections. Les salmonelles sont aussi à l'origine de nombreuses T.I.A. entraînant des gastroentérites. Elles peuvent provoquer des manifestations extradiigestives (pulmonaires, neuroméningées, ostéo-arthrites, atteintes cardio-vasculaire). L'existence de porteurs sains contribuent à la dissémination des germes.

*Dans le milieu marin, la pathogénéicité a aussi été reconnue. Ainsi BRAYTON et COLWELL (in DELATTRE 1988) ont rapporté que des suspensions de pathogènes (en particulier *S. enteridis*) après un séjour de 3 à 4 jours en eau de mer devenaient non cultivables sur milieu approprié mais restaient infectieuses et que le passage sur l'animal constituait un excellent moyen de

revivification (ce pouvoir pathogène des germes stressés n'est cependant pas systématique). La possibilité de T.I.A. par l'intermédiaire des mollusques bivalves a été montrée par plusieurs auteurs. *S. typhi* est un germe pathogène avec une dose minimale infectieuse faible, comparée aux autres entéropathogènes. Ainsi l'ingestion de *S. typhi* avec une nourriture riche en protéines telle que les huîtres peut provoquer une T.I.A. (NISHIO Takama et coll. 1981). De même des moules non purifiées sont à l'origine de salmonelloses dans la population de Conwy (UK) (THOMAS et JONES in M.M. Al. JEBOURI et D.R. TROLOPPE 1984).

2.2. Le système Malthus

2.2.1. généralités sur la conductance-métrie

Cette technique est devenue une alternative aux méthodes conventionnelles à partir de 1970 avec le développement des instruments électroniques et de la micro informatique (RICHARDS et Al. 1978).

Le principe de la conductance-métrie repose sur l'évolution d'un paramètre électrique d'un milieu de culture au cours du développement bactérien. A température constante, les produits du métabolisme bactérien font varier la concentration ionique du milieu de culture en jouant le rôle de dipôles électriques, modifiant ainsi sa conductance.

La mesure de la variation de conductance est donc directement fonction de la croissance microbienne.

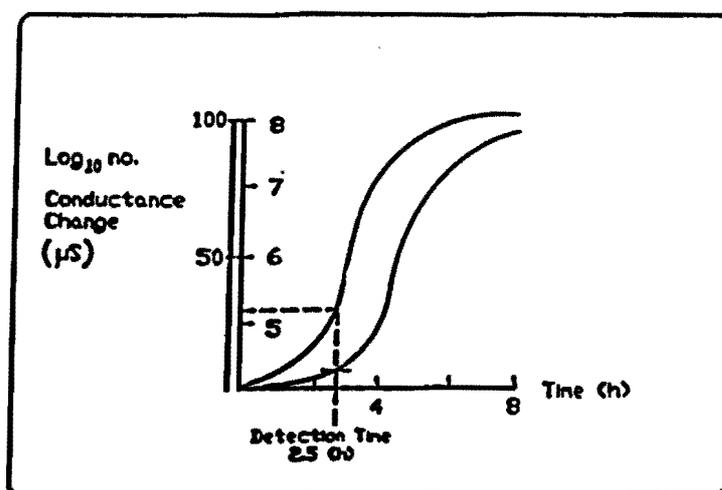


Figure 1 : Courbes de croissance et de conductance de *Staphylococcus aureus* (37°C MCB).

(Malthus instrument)

2.2.2. l'appareil Malthus 2000 (modèle 2120)

2.2.2.1. MALTHUS et dénombrement de coliformes

Une évaluation de l'application de la mesure de conductance à la colimétrie des coquillages marins vivants a été effectuée avec le système d'analyse MALTHUS (DUPONT et al., 1989). Les résultats obtenus ayant été validés, cette méthode a été adoptée en routine pour la colimétrie des coquillages et les laboratoires côtiers de la D.E.L. sont en cours d'équipement avec ce matériel (figure 2). La méthode utilisée est maintenant fiable et bien définie (MENARD, 1992).

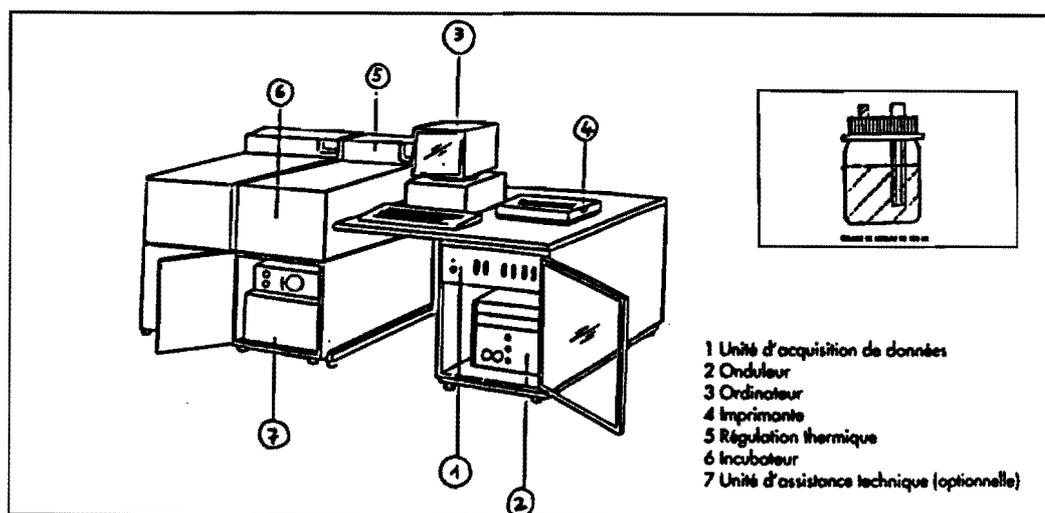


Figure 2 : Analyseur microbiologique MALTHUS

2.2.2.2. MALTHUS et détection des salmonelles

Le système Malthus pour la détection des salmonelles dans tous les aliments a reçu un certificat d'agrément par l'"Association of Official Analytical Chemists" (AOAC) en 1990. C'est la première méthode de conductance-métrie pour la détection d'un pathogène à être reconnue par l'AOAC.

L'appareil Malthus comporte :

- un incubateur à température constante de 37°C (+0,002°C) pouvant contenir 120 cellules. (A 43°C *Salmonella typhi* est inhibée et les réponses de conductance sont plus lentes et plus petites).
- des cellules de mesures de 10 ml réutilisables et autoclavables renfermant les échantillons. Celles-ci ont la forme d'ampoules afin de favoriser la microaérophilie, condition de respiration donnant les meilleurs résultats.
- des électrodes de platine avec une base de céramique entre lesquelles passent un courant alternatif de 10 KHz.
- un ordinateur. Le système informatique gère l'analyse en continu (logiciels H2.02.01 et H2.02.06 développés par Malthus).
- un onduleur.

Les milieux de culture

Ils sont répartis dans les cellules de mesure à raison de 5 ml par ampoule.

* composition

Pour chaque échantillon testé, il est nécessaire d'employer deux milieux d'enrichissement sélectif : certaines salmonelles présentent, en effet, des caractères particuliers ne permettant pas leur croissance sur l'un ou l'autre des milieux.

Le milieu SS1 (Salmonella selective broth 1) d'EASTER et GIBSON (1985) est composé de :

- Peptone bactériologique	5,0 g/l
- Phosphate de sodium dipotassique (Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O)	10,0 g/l
- Triméthylamine N oxide HCL	5,6 g/l
- Dulcitol.....	5,0 g/l
- Bisélénite de sodium	4,0 g/l

pH = 7,2

Le milieu SS2 (Salmonella selective broth 2) ou milieu à la lysine de OGDEN (1988) est composé de :

- Hydrolysate d'albumine	5,0 g/l
- D-Glucose	10,0 g/l
- L-Lysine	10,0 g/l
- Bisélénite de sodium	4,0 g/l

pH = 6,5

Après avoir ajusté le pH des milieux, les passer à la vapeur 10 mn. Ajouter juste avant l'emploi 1 ml de solution de L-cystine pour 100 ml de milieu (préparée en dissolvant 0,1 g de L-cystine dans 15 ml de soude normale à laquelle on ajoute 100 ml d'eau distillée).

* rôle des composants spécifiques employés dans les milieux

Dans le milieu SS1 :

Le Triméthylamine N oxyde (TMAO), molécule non chargée, est un accepteur d'électrons. Or les salmonelles, comme nous l'avons vu précédemment, peuvent réduire le TMAO. EASTER et GIBSON ont testés 66 souches de salmonelles, toutes capables de réduire le Triméthylamine N oxyde en Triméthylamine (TMA). Le produit ainsi obtenu est hautement basique ce qui provoque une augmentation de la conductance. Il est à noter que, si le pH est inférieur à 7,0, l'ionisation est faible.

Le Dulcitol est un sucre fermenté par les salmonelles à plus de 95 %. Par contre sa fermentation est une propriété variable pour les autres espèces. La production d'acide à partir de ce sucre augmente la conductance et permet l'obtention des courbes de variation de conductance.

Dans les milieux SS1 et SS2 :

Seul composant commun aux deux milieux, le Bisélenite de sodium, à une concentration adéquate, inhibe la croissance des coliformes et des enterocoques dans les 12 heures suivant le début de l'incubation ; les salmonelles, en revanche, sont peu inhibées dès le début.

Résultats

* Le logiciel permet d'établir une courbe de conductance en fonction du temps. Les salmonelles donnent une courbe caractéristique, pour chacun des deux milieux, définie par plusieurs critères : le **temps de détection**, la **pente**, le **maximum de conductance** atteint.

Le temps de détection correspond au temps à partir duquel la conductance dévie de la ligne de base pour produire une réponse reconnaissable. Concrètement il représente le temps pour lequel trois mesures consécutives changent d'au moins $1\mu\text{S}$.

La pente dépend de la vitesse de croissance des différents microorganismes. Elle est donc caractéristique du germe présent dans le milieu.

* D'une manière générale, on observe les résultats suivants :

– sur le milieu SS1 :

- . 94 % des salmonelles sont **détectées entre 8 et 16 h** et 98 % avant 24 h.
- . la **pente est supérieure à $25\mu\text{S/h}$** pendant au moins 3 h et est en général de $100\mu\text{S/h}$.
- . le **plateau** est atteint pour des valeurs de conductance supérieures à $400\mu\text{S}$. La plupart du temps les valeurs maximales avoisinent $800\mu\text{S}$.
- . la **rupture de la pente est rapide**.

– sur le milieu SS2 :

Les résultats observés sont identiques à ceux du milieu SS1 en ce qui concerne le temps de détection, la pente et la rupture de pente.

En revanche la valeur du **plateau** change : elle est toujours supérieure à $100\mu\text{S}$ et généralement proche de $400\mu\text{S}$. Cette diminution de la valeur maximale de conductance s'explique par l'absence de TMAO dans le milieu SS2.

* Les salmonelles donnent des réponses positives dans l'un ou l'autre ou les deux milieux. Ainsi *S. stanley* présente des courbes caractéristiques sur les deux milieux, *S. bredeney* seulement en SS1 et *S. typhimurium*, *S. enteridis*, *S. panama* seulement en SS2.

La réponse est donnée en 30 h maximum. En effet le sélénite présent dans le milieu inhibe la croissance des bactéries autres que les salmonelles dans les 12 heures suivant le début de l'incubation. Ensuite, l'action inhibitrice diminue lentement. Prolonger le temps d'incubation risque de provoquer un nombre inacceptable de faux-positifs.

* La présence de salmonelles peut ne pas être détectée si après l'enrichissement, le nombre de germes reste inférieur à 10^6 salmonelles/ml. Ce nombre correspond en effet à la quantité minimale de germes nécessaire à un changement de conductance visible. L'ordre de grandeur des échantillons préenrichis contaminés par un petit nombre de salmonelles étant de 10^2 – 10^6 /ml, la limite de détection de cette méthode est basse et permet de conclure à une présence ou une absence de salmonelles dans 25 g de chair et liquide intervalvaire, ce qui répond aux normes concernant les zones conchylicoles.

Problèmes

. Le milieu SS2 présente deux inconvénients. D'une part certaines salmonelles donnent de petits changements de conductance (150 – $200 \mu\text{S}$) et d'autre part, même pour les courbes où les changements de conductance sont plus importants, la confirmation par les méthodes classiques n'est pas toujours positive.

. A cela s'ajoute les problèmes posés par quelques souches particulières. Ainsi *S. arizonae* donne une faible réponse de conductance : le plateau est atteint pour des valeurs comprises entre 500 et $600 \mu\text{S}$ et la pente maximale n'est que de $50 \mu\text{S/h}$. Néanmoins, l'incidence de cette salmonelle sur l'homme étant négligeable, son intérêt en est limité. *S. gallinarum*–*pullorum* ne donne pas une courbe caractéristique de salmonelles. Cependant, comme elle est spécifique des volailles, aucun risque sanitaire associé à ce germe n'est à craindre pour l'homme.

. Mais le problème le plus préoccupant est celui occasionné par les faux-positifs. En effet quelques souches de *Providencia alcalifaciens*, d'*Escherichia coli* et d'*Hafnia alvei* parviennent à se développer dans les milieux d'enrichissement pour salmonelles et donnent des courbes similaires.

Toutefois, c'est le genre *Citrobacter* qui, de par ces nombreux points communs avec *Salmonella*, apparaît comme le faux-positif le plus gênant sur milieu SS1. Un caractère cependant les différencie : *Salmonella* possède une lysine-décarboxylase alors que cette enzyme est absente chez *Citrobacter*. Or la décarboxylation de la lysine donne une bonne courbe de conductance. De plus, l'emploi d'eau peptonnée tamponnée spéciale dite eau peptonnée tamponnée Malthus (EPTM) composée d'eau peptonnée, de lysine et de glucose est préférable pour la phase de préenrichissement. La lysine-décarboxylase y est ainsi induite, diminuant le temps de détection.

Cette différence de propriété ne permet cependant pas une distinction nette entre les courbes des deux espèces. Seule la cassure de la courbe de conductance apparaît plus nette dans le cas des salmonelles.

comparaison avec d'autres appareils

Une comparaison a été réalisée entre les instruments Malthus et Bactometer M123. Sur des échantillons artificiellement contaminés, la mesure de conductance donne des résultats similaires pour les deux appareils. De même la mesure d'impédance par l'intermédiaire de l'appareil Bactometer donne des résultats analogues à ceux obtenus par conductance même si, dans ce cas, la ligne de base n'est pas aussi régulière. (Rapid and automated detection of *Salmonella* by electrical measurements ; EASTER, 1984).

Mais dans une bibliographie plus récente, les auteurs constatent une différence entre des instruments produits par plusieurs constructeurs au point de vue de l'ampleur et/ou de la vitesse du changement de conductance (Reproducibility of electrical conductance assay results for the detection of salmonella, 1990).

Le laboratoire AES revend un analyseur : Rapide Automated Bacterial Impedance Technique (RABIT) décrite, dans un document publicitaire, comme donnant les premières mauvaises nouvelles après 1 à 2 h d'enrichissement, comme étant la plus souple et la moins chère de toutes les méthodes rapides en microbiologie.

Ces quelques éléments demeurent trop succincts pour pouvoir établir une réelle comparaison.

Avantages théoriques du système Malthus par rapport aux autres méthodes testées

La garantie d'efficacité, la fiabilité, but premier de toute méthode, est assurée par la mesure de conductance.

La simplicité du système Malthus, le traitement automatique des analyses font de cette méthode une technique facile d'emploi en laboratoire, pouvant aisément être utilisée en routine. De plus, le temps-agent se trouvant réduit et la quantité de milieux étant moindre, le prix de l'analyse est abaissé.

Cependant, les intérêts du système Malthus ne sont pas uniquement d'ordre pratique : l'avantage primordial avancé par la société Malthus Instrument est basé sur la **rapidité de réponse** de la conductance-métrie. Ainsi la présomption de salmonelles peut être obtenue dès 24 h et au maximum au terme de 40 h contre 64 h pour les méthodes utilisant la microbiologie traditionnelle. Si le taux de présomptions confirmées est élevé, cela permet, dans le cas des zones conchylicoles, de réduire les délais pour l'interdiction provisoire de la commercialisation directe de coquillages, en attendant une confirmation ou une infirmation de la présence de salmonelles.

Par contre, le temps pour confirmer la présence de salmonelles est environ identique par les différentes méthodes. Il est, en effet, nécessaire d'effectuer un isolement sélectif après l'enrichissement sur les milieux SS1 et SS2.

Les méthodes Malthus et traditionnelles donnant des résultats équivalents, le risque est donc réduit en utilisant la méthode de conductance-métrie : la consommation de coquillages éventuellement contaminés est, en effet, plus rapidement stoppée.

En terme de santé publique, le système Malthus est par conséquent, a priori, préférable aux méthodes traditionnelles.

2.3. Diagnostic présomptif complémentaire : le test au latex

2.3.1. principe

Le test au latex repose sur une technique immunologique : des antisérums polyvalents préparés à partir d'une grande variété d'antigènes flagellaires de salmonelles sont utilisés pour recouvrir des particules de latex. En présence d'une suspension de salmonelles contenant ces antigènes, les particules de latex agglutinent rapidement (en 2 minutes maximum).

2.3.2. exemple

(Détection des *Salmonella* dans les aliments par impédancemétrie. B. CORBION, F. MOURY, C. OUDART, C. BAUER)

96 échantillons d'aliments divers contaminés ont été testés par conductance-métrie sur Malthus 1000S et en parallèle par une méthode conventionnelle. Cette dernière a permis la détection de 16 échantillons positifs alors que, après agglutination au latex, il a été observé :

- 2 échantillons positifs trouvés préalablement négatifs par la méthode de référence AFNOR ISO 6579 ainsi que par la méthode CNEVA-LCHA.
- 2 échantillons faussement positifs
- 2 échantillons faussement négatifs

Le taux de corrélation entre les résultats (positifs + négatifs) obtenus par la méthode rapide et la méthode de référence est de 98 %. La spécificité de la technique Malthus est ainsi mise en évidence et renforcée par la technique immunologique.

Remarque : les résultats discordants peuvent s'expliquer par la différence de protocole selon la méthode considérée.

2.3.3. limites d'application

Les souches "rugueuses" (Rough) provoquent des auto-agglutinations non spécifiques et ne peuvent donc pas être testées par cette méthode.

Des souches non mobiles peuvent ne pas être détectées par le test au latex.

Des organismes oxydase (+) donnent des résultats faussement positifs.

Les résultats positifs doivent obligatoirement être confirmés par un repiquage en milieu d'isolement suivi de tests biochimiques et sérologiques.

3 – PROTOCOLE DE L'ETUDE

Les coquillages sont contaminés par l'intermédiaire d'une eau contenant une concentration supposée connue en salmonelles. Une vérification de cette concentration est cependant nécessaire pour éviter un biais expérimental préjudiciable à toute la suite des opérations.

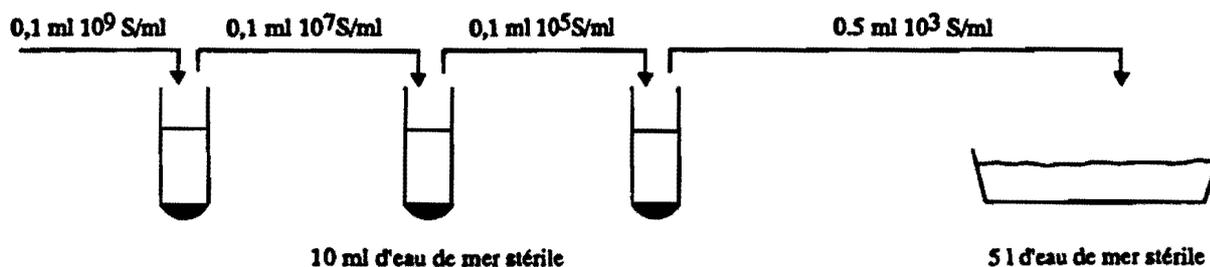
3.1. Contamination de l'eau

3.1.1. mode opératoire

* contamination

Si la concentration recherchée est de 10 salmonelles/100 ml dans un bac de 5 l, 500 salmonelles sont nécessaires.

Sur une culture de 18 h en milieu cerveau-cœur à 37°C, on estime la quantité de salmonelles à 10^9 /ml. A partir de là, on obtient la quantité désirée en réalisant les dilutions suivantes :



* numération

Celle-ci s'effectue par filtration sur membrane d'une quantité d'eau constante et égale à 100 ml. Pour avoir un nombre adéquat de colonies sur les membranes, il est parfois nécessaire de réaliser des dilutions de l'eau contaminée.

Concentration supposée de l'eau contaminée (salmonelle/100 ml)	nombre de ml d'eau contaminée	nombre de ml d'eau stérile ajoutés
10	100	0
100	5	95
1 000	0,5	95,5

Tableau 1 : dilutions réalisées avant filtration de l'eau

La membrane est ensuite posée soit sur une gélose au Vert Brillant soit sur une gélose P.C.A., géloses incubées 24 h à 37°C.

3.1.2. interprétation

* aspect des colonies

Sur la gélose P.C.A., les colonies jaunâtres, rondes et bombées sont peu visibles. Par contre, sur la gélose au Vert Brillant les colonies rondes sont facilement reconnaissables par la couleur rose que prend le milieu de culture sous ces colonies.

* numération

Concentration supposée de l'eau contaminée (salmonelles/100 ml)	Nombre de colonies observées		Concentration moyenne réelle de l'eau contaminée (salmonelles/100 ml)
	sur gélose P.C.A.	sur gélose au vert brillant	
10	5 3	5 4	4
100	0x 4	5 7	50
1 000	3 4	6 2	400

x mauvaise filtration (membrane mal positionnée)

Tableau 2 : numération des salmonelles dans l'eau contaminée

Les concentrations théoriques de l'eau contaminée sont donc multipliées par deux par rapport à la réalité. Cependant, la concentration réelle des salmonelles dans l'eau est du même ordre de grandeur que la concentration théorique. Les échantillons artificiellement contaminés contiennent donc des quantités de salmonelles pouvant être rencontrées dans le milieu naturel.

3.2. Contamination des coquillages

3.2.1. description

* présentation générale

-> les analyses sont réalisées sur **3 coquillages** : coques, moules, huîtres.

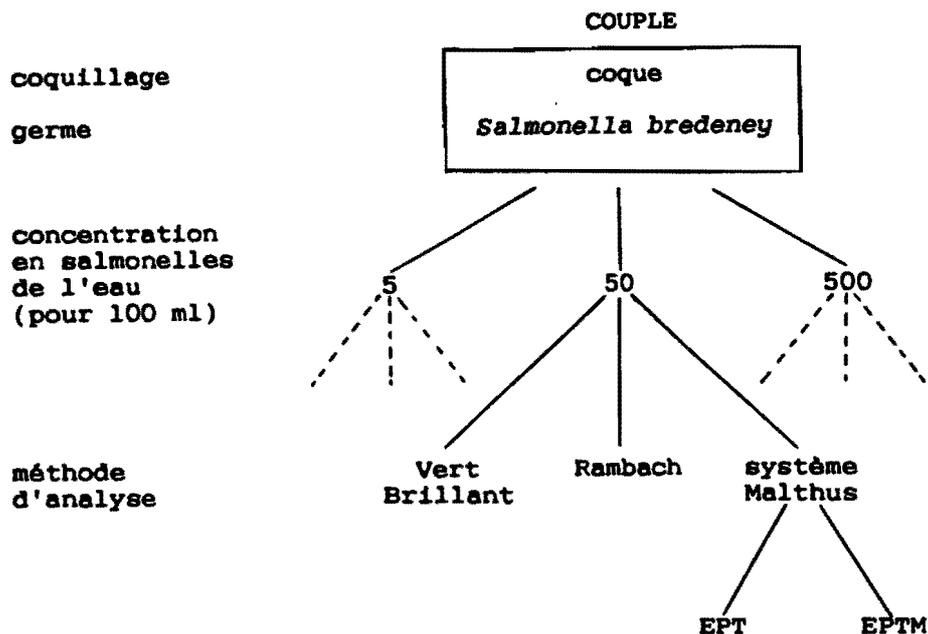
-> chaque coquillage est successivement contaminé avec les **5 germes** suivants :

Salmonella panama ; *Salmonella bredeney* ; *Salmonella typhimurium* ; *Salmonella paratyphi B* et *Citrobacter feundii*.

-> chaque germe est introduit dans l'eau servant à la contamination des coquillages à **3 concentrations** différentes : 5, 50 et 500 salmonelles pour 100 ml d'eau.

-> pour chaque concentration, le coquillage contaminé est analysé par **3 méthodes** faisant respectivement intervenir la gélose au Vert Brillant, la gélose de Rambach et le système Malthus. Dans ce dernier cas, deux eaux peptonées sont testées : une classique (EPT) et l'autre additionnée de lysine et de glucose(EPTM).

* exemple



*** échantillonnage**

Les coquillages, prélevés dans le milieu naturel, sont passés en claires pendant un minimum de 72 heures afin d'obtenir des coquillages dépourvus d'un nombre important de bactéries. Les interférences avec des germes "parasites" sont ainsi éliminées.

*** mode de contamination**

L'eau de mer stérile est contaminée de manière à obtenir la concentration désirée en salmonelles (voir chapitre 3.1.2.). Les coquillages filtrent alors l'eau contaminée pendant une durée au moins égale à une heure.

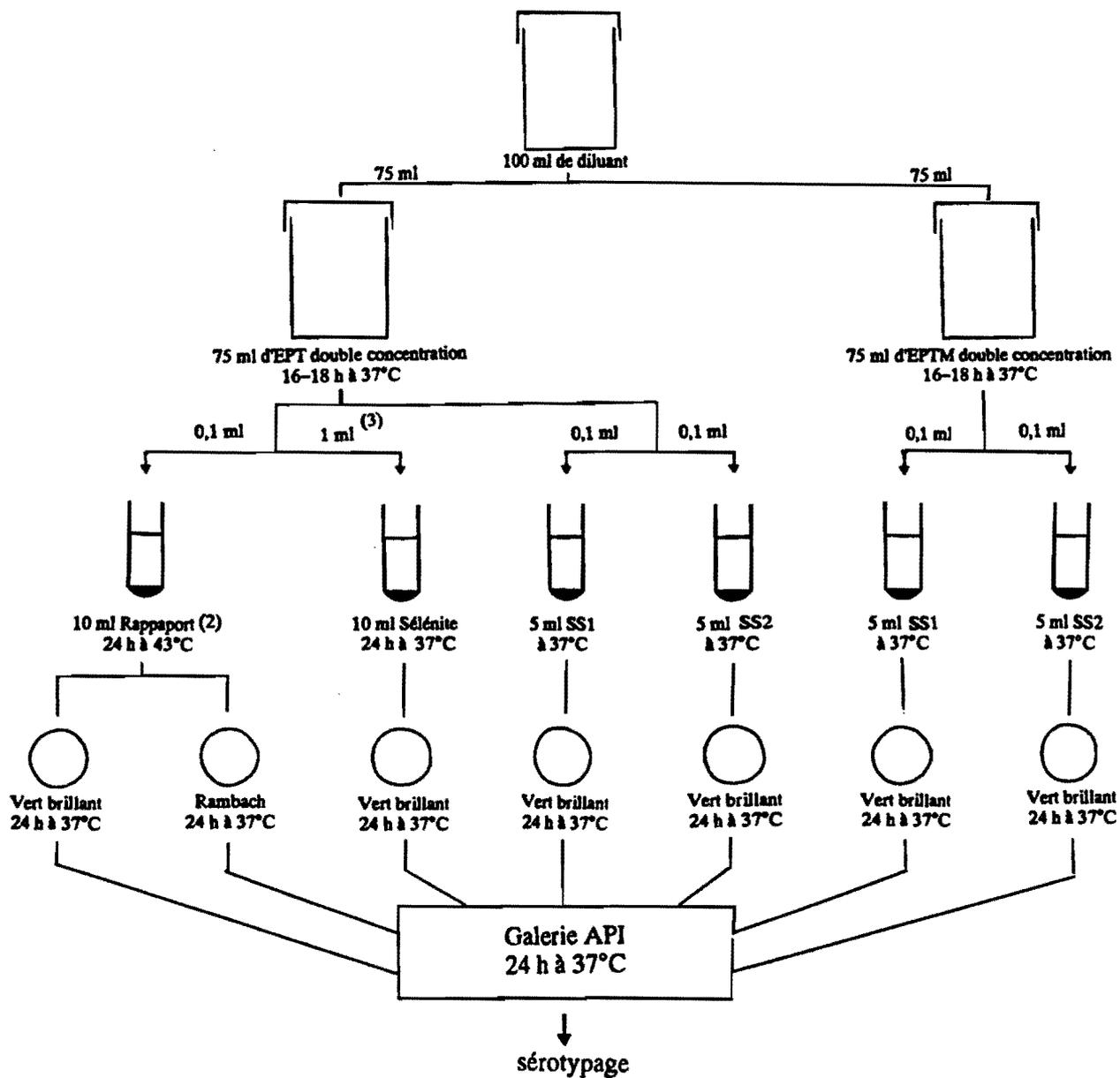
A titre indicatif, WILIENSEN (1952) a constaté que les coques de 30 à 40 mm filtraient 0,5 l en 1 h. Etant donné qu'une vingtaine de coques sont introduites dans un volume de 5 l, on peut considérer qu'après une heure, la majeure partie des salmonelles se retrouve dans les coques et plus généralement dans les mollusques bivalves.

*** protocole analytique des 3 méthodes employées (voir exemple en page suivante)**

La composition des milieux et leur lecture sont décrits en annexe (annexes 1 à 5).

Les différentes analyses réalisées
à partir d'un échantillon de coquillages

50 g. de coquillages broyés ⁽¹⁾



(1) : broyage 40 s à 1500 tr/min dans un bol de type Waring blender puis repos 20 min à température ambiante.

(2) : étape supprimée dans le cas des analyses effectuées à partir de contaminations artificielles.

(3) : méthode supprimée dans le cas des analyses effectuées à partir des contaminations artificielles.

3.2.2. intérêts

* les 3 coquillages

Les trois coquillages sont tous des bivalves. Cependant de nombreux caractères les différencient.

Les coques sont des fouisseurs : ils creusent facilement dans le sable, la vase, pouvant ainsi s'y déplacer ; ils recueillent leur nourriture par l'intermédiaire d'un siphon.

Les moules et les huîtres, à l'opposé des coques, sont sédentaires et vivent fixées à un support. Ce sont des filtreurs : leur alimentation est assurée par filtration de l'eau au travers de branchies lamellaires.

Expérimentalement, les germes semblent plus difficiles à retrouver, par les méthodes classiques, dans les huîtres que dans les moules.

Il est donc nécessaire d'observer les différences éventuelles des courbes de conductance selon le mode d'alimentation du coquillage mais aussi selon l'espèce considérée.

* les 5 germes

Dans le chapitre 2.2.4., nous avons vu que, selon le sérotype de salmonelle, les réponses de conductance étaient positives sur les deux milieux d'enrichissement ou sur l'un ou l'autre uniquement. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier plusieurs espèces de salmonelles. *S. bredeney* donne une réponse positive sur SS1, *S. typhimurium* sur SS2. *S. panama* présente, comme *S. typhimurium*, une courbe caractéristique sur SS2. La similitude des courbes de conductance de ces deux sérotypes peut ainsi être vérifiée. *S. paratyphi B* est plus particulièrement étudiée à cause du risque sanitaire qu'elle représente (fièvres parathypoïdiques).

Citrobacter, quant à lui, représente un faux positif potentiel (chapitre 2.2.5.). Son étude est donc primordiale.

Ces germes ont été choisis en raison de leur fréquence élevée dans le milieu marin.

Ainsi, de janvier 1988 à juin 1992, en Bretagne Nord, sur un total de 130 salmonelles isolées, ont été identifiées :

- 22 *Salmonella paratyphi B*
- 18 *Salmonella panama*
- 9 *Salmonella bredeney*
- 7 *Salmonella typhimurium*

* les 3 concentrations

La plus forte permet d'apprécier la similitude entre les courbes obtenues en milieu marin et les courbes caractéristiques décrites précédemment (chapitre 2.2.4.). Les autres concentrations sont utiles pour vérifier la limite de détection du système Malthus et pour constater une éventuelle proportionnalité entre le nombre de germes présents dans les coquillages et les valeurs de conductance.

* les 3 méthodes

Une comparaison entre le système Malthus et la méthode actuellement utilisée (gélose au Vert Brillant) permet de vérifier les similitudes et, le cas échéant, les différences (présence de faux-négatifs, de faux-positifs et/ou de salmonelles détectées uniquement par le système Malthus).

L'étude de la méthode Rambach et sa comparaison aux autres techniques se fait dans la perspective éventuelle de son emploi en routine.

* les 2 eaux peptonées

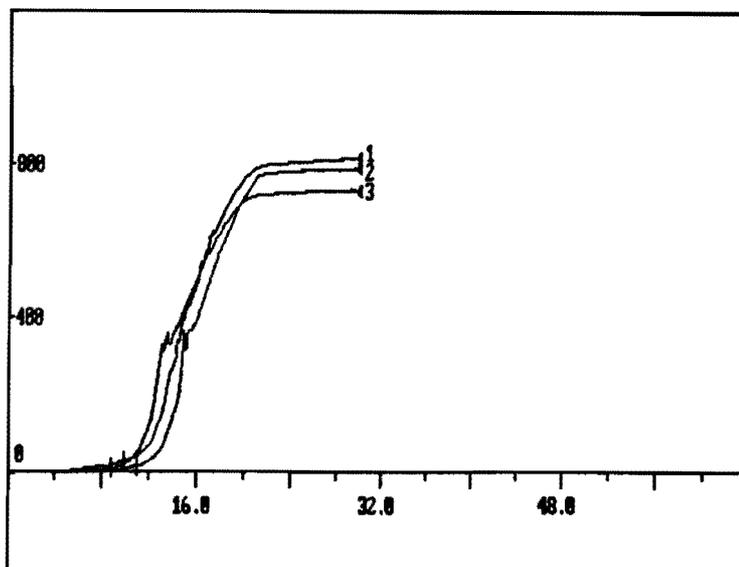
Il est intéressant de voir si l'eau peptonée préconisée par la société Malthus Instrument, de composition plus complexe que celle employée classiquement, améliore réellement l'allure des courbes de conductance.

3.2.3. premiers essais

Les premiers essais ont été réalisés sur des coques contaminées par *Salmonella bredeney*. Les résultats sont intéressants sur le milieu SS1 uniquement (aucun changement de conductance significatif n'a été observé à partir du milieu SS2).

* concentrations : 5, 50, 500 salmonelles/100 ml

. préenrichissement : EPTM

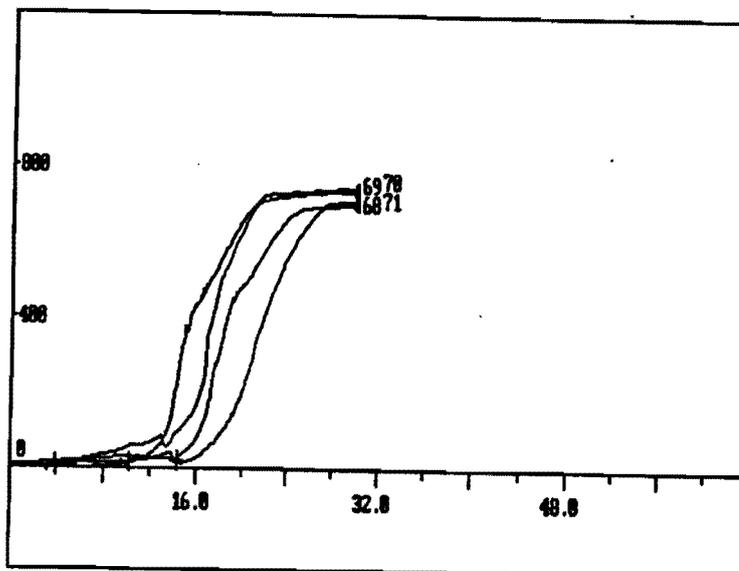


Courbe 2 :
Salmonella bredeney/coques
 EPTM. SS1
 concentration (pour 100 ml) : - 1-→ 5
 - 2-→ 50
 - 3-→ 500

Pour la plus forte concentration, les courbes apparaissent donc caractéristiques des salmonelles telles qu'elles ont été décrites au chapitre 2.2.4.. **Le système Malthus semble a priori pouvoir s'adapter au milieu marin.**

Une réponse de conductance caractéristique étant obtenue pour une concentration de 50 mais aussi de 5 salmonelles/100 ml, la limite de détection est inférieure à cette dernière. De plus, les méthodes faisant appel à la microbiologie traditionnelle font apparaître une variation du nombre de bactéries dans les coquillages en fonction de la concentration en germes dans l'eau. Or les courbes de conductance sont similaires quelque soit la concentration considérée. Les essais réalisés selon notre protocole **ne permettent donc pas d'établir un lien de proportionnalité** entre le nombre de salmonelles présent dans les coquillages et la réponse de conductance.

- * concentration : 5 salmonelles/100 ml
- . préenrichissement : EPT et EPTM, milieu SS1.



Courbe 3 :
Salmonella bredeney/coques
 SS1
 concentration (pour 100 ml) : 5
 préenrichissement : - 68 et 69 → EPTM
 - 70 et 71 → EPT

Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence une différence de l'aspect des courbes de conductance suivant le préenrichissement subi par l'échantillon.

3.3. Changements dans le protocole

3.3.1. motifs

Les essais réalisés à la plus faible concentration donnant des courbes de conductance caractéristiques et les réponses ne semblant pas être proportionnelles au nombre de salmonelles dans les coquillages, l'intérêt d'étudier 3 concentrations est limité. Il apparaît plus intéressant de **ne retenir que la plus faible concentration**. Celle-ci correspond, dans le milieu naturel, à des **échantillons faiblement contaminés**. Les résultats seront donc a fortiori valables pour des échantillons plus fortement contaminés.

De plus 30 analyses minimum par couple germe(s)/coquillage sont nécessaires pour pouvoir établir des conclusions fiables, pouvant servir à la comparaison des différents paramètres : coquillage, salmonelle, méthode, eau peptonée. Vu le temps imparti, la durée d'une analyse, le matériel disponible, l'étude est concentrée sur :

- 1 filtreur et 1 fouisseur : respectivement l'huître et la coque

- 1 salmonelle : *Salmonella bredeney*

- 1 faux positif : *Citrobacter freundii*

- 1 mélange de germes : *Salmonella bredeney* et *Citrobacter freundii*. En effet, en mettant en concurrence une salmonelle et un citrobacter, n'existe-t-il pas un risque d'interférence du *Citrobacter* sur la courbe de conductance ?

Remarque : quelques essais sont aussi réalisés à partir d'une souche de *Salmonella typhimurium* pour étudier la réponse de conductance sur le milieu SS2.

3.3.2. présentation du nouveau protocole

-> les analyses sont réalisées sur **2 coquillages** : huîtres ; coques.

-> chaque échantillon de coquillages est successivement contaminé avec les **germes** suivants :

Salmonella bredeney ; *Citrobacter freundii* ; un mélange de *Salmonella bredeney* et *Citrobacter freundii*.

-> chaque germe : salmonelle ou citrobacter, que ce soit seul ou en mélange, est introduit dans l'eau servant à la contamination des coquillages à **la concentration de 5 germes/100 ml d'eau**.

-> chaque coquillage contaminé est analysé par les **3 méthodes** décrites dans le protocole initial, avec de même, les deux eaux peptonées.

4 – RESULTATS

Dans cette partie, la concentration de l'eau est **toujours égale à 5 salmonelles/100 ml et/ou 5 Citrobacters/100 ml**

L'eau peptonée tamponnée sera abrégée EPT et l'eau peptonée tamponnée + lysine + glucose (eau peptonée tamponnée Malthus) sera appelée EPTM.

Le critère retenu pour déclarer un **résultat positif** par conductance-métrie est la **pen**te : celle-ci doit être supérieure à **50 μ S/h pendant 3 h en milieu SS1 ou SS2**.

4.1. Couple *Salmonella bredeney*/huîtres

Chaque analyse est réalisée avec 5 ou 6 huîtres creuses de taille 3.

4.1.1. tableau récapitulatif

méthode d'analyse		nombre de positifs	nombre de négatifs	nombre d'analyses par méthode
Vert Brillant		30	2	32
Rambach		30	2	32
Système Malthus (milieu SS1)	EPTM	30	1	31
	EPT	32	1	33

Tableau 3 : détection par 3 méthodes d'analyses de *S. bredeney* dans des huîtres artificiellement contaminées

4.1.2. remarques concernant les résultats

L'analyse négative sur Malthus (EPTM et EPT) l'est aussi par les méthodes faisant appel à la microbiologie traditionnelle.

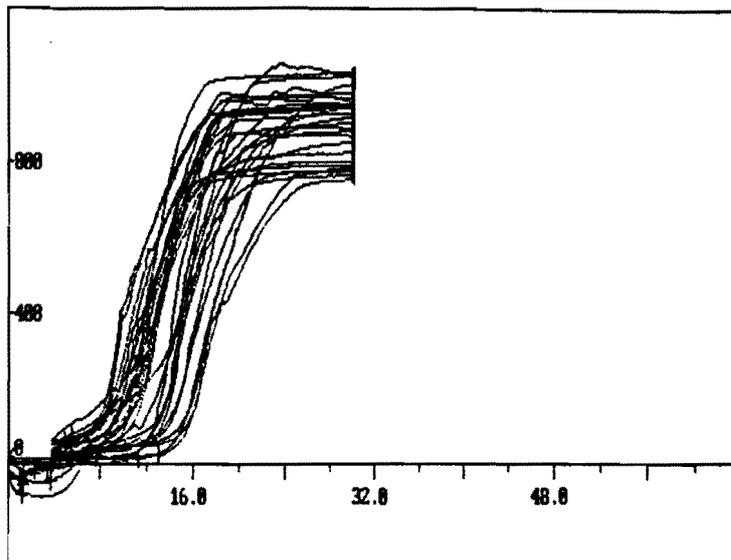
La seconde analyse négative sur la gélose au Vert Brillant ne correspond pas à l'échantillon donnant une réponse négative sur la gélose de Rambach.

4.1.3. les courbes de conductance

Il n'est pas tenu compte ici de l'analyse négative par les trois méthodes.

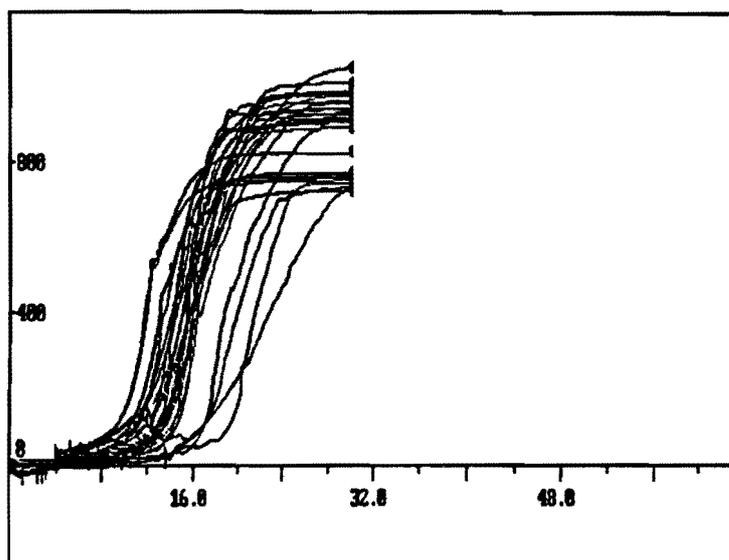
-> allure des courbes

. préenrichissement en EPTM, milieu SS1. Ensemble des courbes.



Courbe 4 :
Salmonella bredeney/huitres
EPTM. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5

. préenrichissement en EPT, milieu SS1. Ensemble des courbes



Courbe 5 :
Salmonella bredeney/huitres
EPT. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5

-> caractéristiques

		EPTM	EPT
temps de détection inférieur à 16 h	+	30 (100 %)	31 (97 %)
	-	0	1
vitesse supérieure à 100 μ S/h pendant 6 h	+	30 (100 %)	31 (97 %)
	-	0	1
présence d'un plateau avant 30 h	+	29 (97 %)	29 (91 %)
	-	1	3
rupture de pente nette	+	20 (67 %)	21 (66 %)
	-	10	11

Tableau 4 : caractéristiques des courbes de conductance de *Salmonella bredeney* introduite dans des huîtres (selon l'eau peptonée)

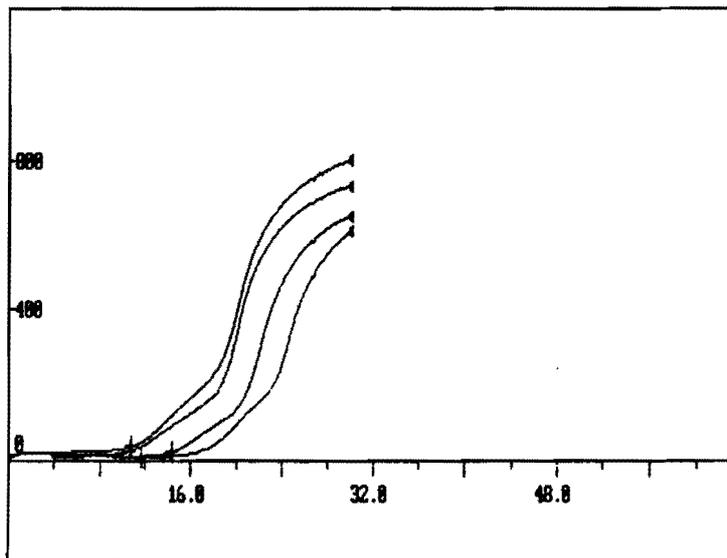
Les plateaux atteignent des valeurs de conductance variant de 750 à 1 050 μ S.

4.2. Couple *Citrobacter freundii*/huîtres

4.2.1. les courbes de conductance – cas général

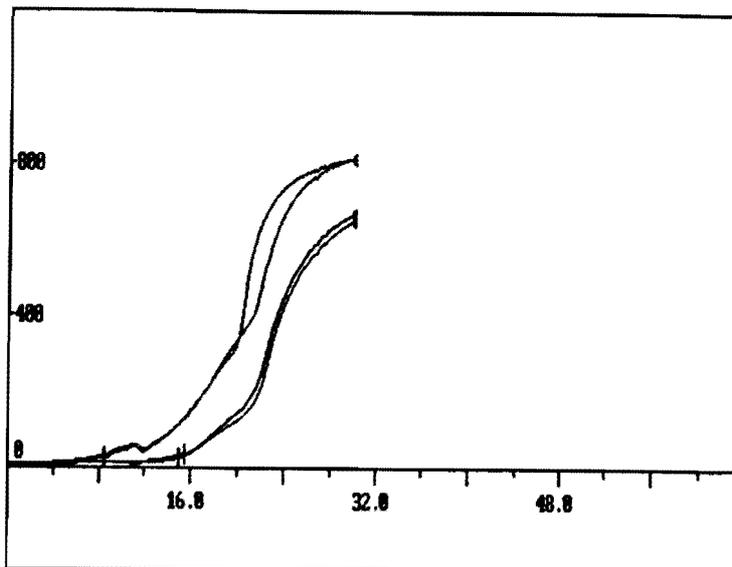
-> allure

. préenrichissement en EPTM, milieu SS1. Exemple.



Courbe 6 :
Citrobacter freundii/huîtres
 EPTM. SS1
 concentration (pour 100 ml) : 5

. préenrichissement en EPT, milieu SS1. Exemple.



Courbe 7 :
Citrobacter freundii/huîtres
 EPT. SS1
 concentration (pour 100 ml) : 5

-> caractéristiques

Que ce soit avec un préenrichissement en EPT ou en EPTM, on constate un temps de détection inférieur à 16 h uniquement dans la moitié des cas (6 courbes sur 12 pour chaque eau peptonée).

Les courbes de conductance sont généralement composées de 2 pentes : la vitesse de la première étant inférieure à 50 $\mu\text{S}/\text{h}$ et celle de la seconde étant supérieure à 100 $\mu\text{S}/\text{h}$.

Le plateau n'est jamais atteint après 30 h d'incubation excepté pour deux échantillons préenrichis en EPT.

Les valeurs de conductance atteintes après 30 h d'incubation, lorsque le plateau est présent ou lorsque les valeurs de conductance tendent à se stabiliser, varient de 600 à 900 $\mu\text{S}/\text{h}$.

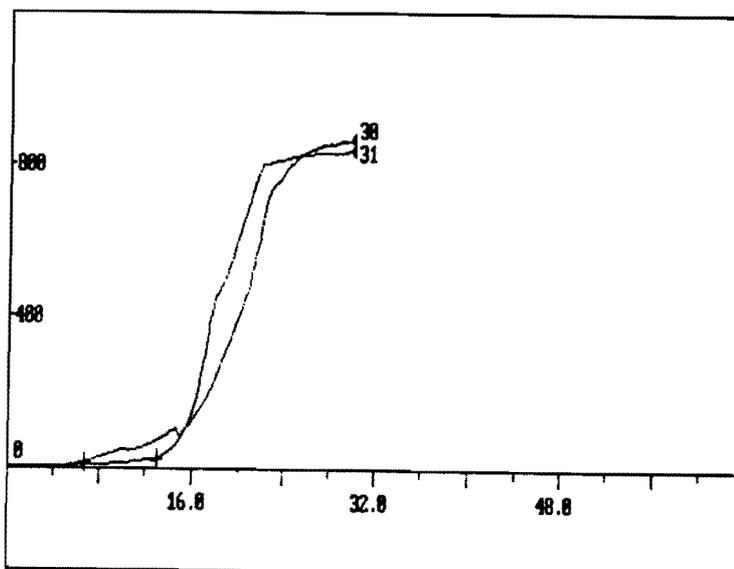
Pour parvenir au plateau, les courbes s'infléchissent lentement sans rupture brutale de la pente.

4.2.2. cas particuliers

-> allure

. préenrichissement en EPT, milieu SS1.

Citrobacter freundii/huîtres (en comparaison avec *Salmonella bredeney*/huîtres)



Courbe 8 :
EPT. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5
30-> *Citrobacter freundii*/huîtres
31-> *Salmonella bredeney*/huîtres

-> caractéristiques

Deux courbes d'échantillons préenrichis en EPT peuvent être confondues avec celles d'une salmonelle ; elles présentent en effet les particularités suivantes :

- une seule pente avec une vitesse de conductance supérieure à 100 $\mu\text{S}/\text{h}$ pendant 6 h.
- un temps de détection inférieur à 16 h.
- une valeur maximale de conductance avoisinant 800 $\mu\text{S}/\text{h}$.

Par contre une seule atteint un plateau et dans les deux cas, la rupture de la pente n'est pas marquée.

4.3. Couple *Citrobacter freundii* + *Salmonella bredeney*/huîtres

4.3.1. tableau récapitulatif

méthode d'analyse		nombre de positifs	nombre de négatifs	nombre d'analyses par méthode
Vert Brillant		29	1	30
Rambach		29	1	30
Système Malthus (milieu SS1)	EPTM	28	2	30
	EPT	28	2	30

Tableau 5 : détection par 3 méthodes d'analyses de *C. freundii* + *S. bredeney* dans des huîtres artificiellement contaminées

4.3.2. remarques concernant les résultats

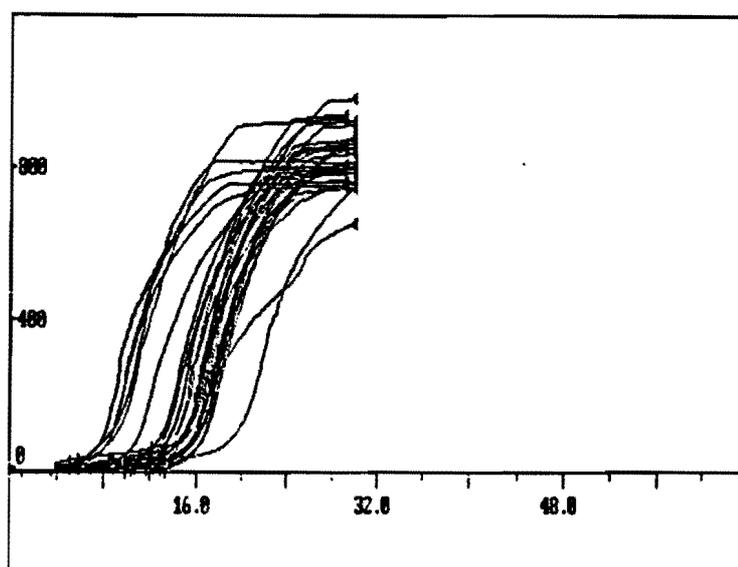
Les analyses négatives par une méthode se révèlent positives pour les deux autres.

Seule une réponse négative par le système Malthus avec un préenrichissement en EPTM l'est aussi sur la gélose de Rambach.

4.3.3. les courbes de conductance – cas général

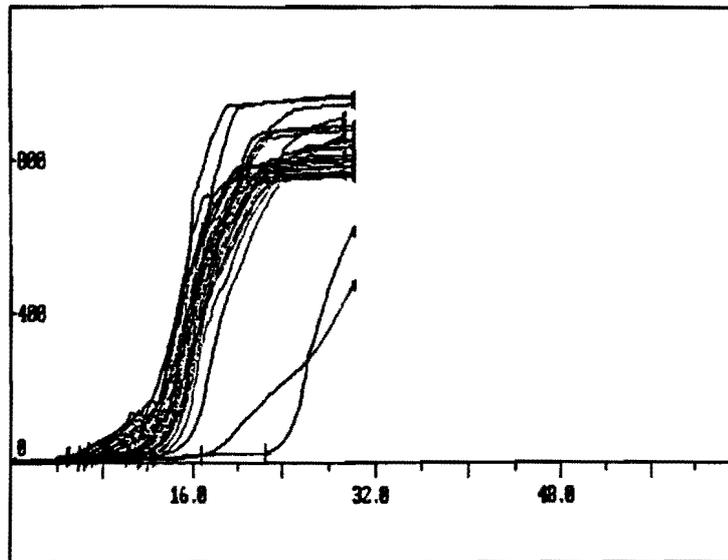
-> allure

. préenrichissement EPTM, milieu SS1. Ensemble des courbes.



Courbe 9 :
Salmonella bredeney + *Citrobacter freundii*/huîtres
EPTM. SS1
concentration (pour 100ml) : 5

. préenrichissement EPT milieu SS1. Ensemble des courbes.



Courbe 10 :
Salmonella bredeney + *Citrobacter freundii*/huîtres
 EPT. SS1
 concentration (pour 100ml) : 5

-> caractéristiques

		EPTM	EPT
temps de détection inférieur à 16 h	+	29 (97 %)	28 (93 %)
	-	1	2
vitesse supérieure à 100 μ S/h pendant 6 h	+	29 (97 %)	29 (97 %)
	-	1	1
présence d'un plateau avant 30 h	+	24 (80 %)	24 (80 %)
	-	6	6
rupture de pente nette	+	20 (67 %)	23 (77 %)
	-	10	7

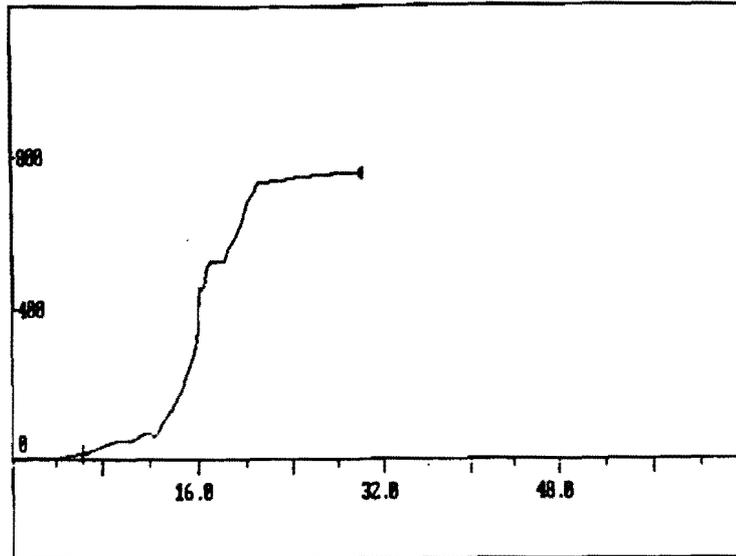
Tableau 6 : caractéristiques des courbes de conductance de
Salmonella bredeney + *Citrobacter freundii*
 introduits dans des huîtres (selon l'eau peptonée)

Les plateaux atteignent des valeurs de conductance comprises entre 700 et 1 000 μ S.

4.3.4. cas particuliers

-> allure

. préenrichissement EPT, milieu SS1.



Courbe 11 :
Salmonella bredeney + *Citrobacter freundii*/hultres
 EPT. SS1
 concentration (pour 100ml) : 5

-> caractéristiques

3 courbes provenant toutes d'échantillons préenrichis en EPT présentent ainsi des artéfacts.

4.4. couple *Salmonella bredeney*/coques

Chaque analyse est réalisée avec une quinzaine de coques de 40 mm environ.

4.4.1. tableau récapitulatif

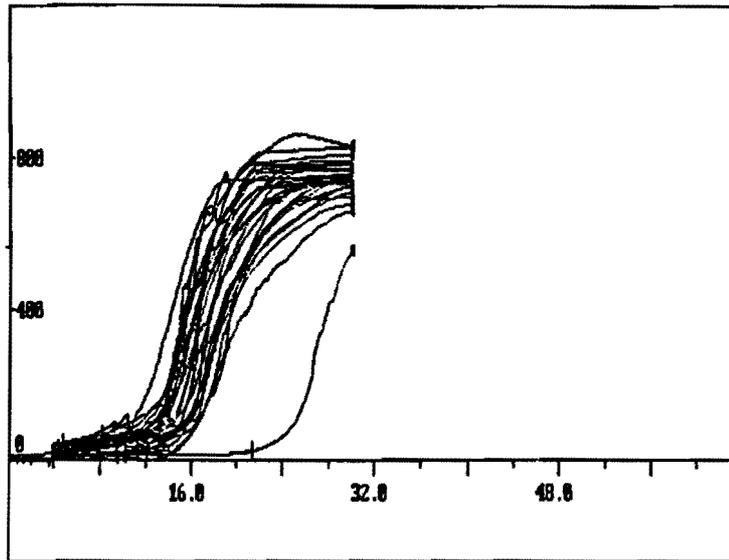
méthode d'analyse		nombre de positifs	nombre de négatifs	nombre d'analyses par méthode
Vert Brillant		28	0	28
Rambach		26	2	28
Système Malthus (milieu SS1)	EPTM	28	0	28
	EPT	28	0	28

Tableau 7 : détection par 3 méthodes d'analyses de *Salmonella bredeney* dans les coques artificiellement contaminées

4.4.2. les courbes de conductance – cas général

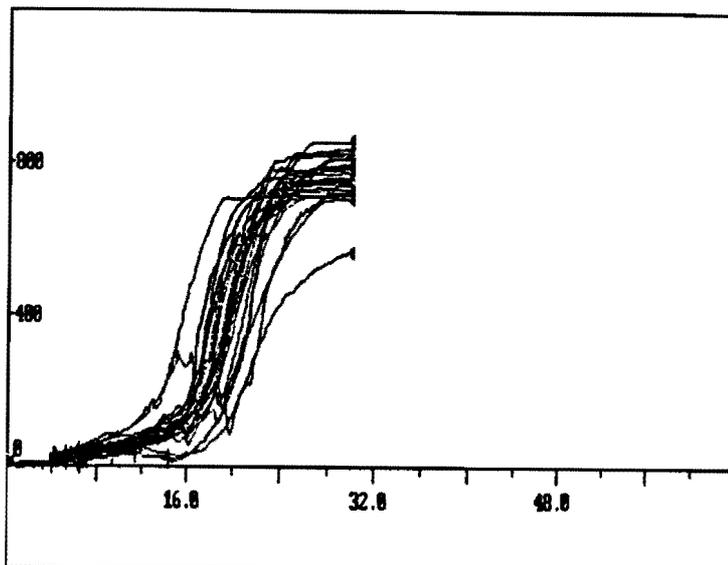
-> allure des courbes

. préenrichissement en EPTM, milieu SS1. Ensemble des courbes.



Courbe 12 :
Salmonella bredeney/coques
EPTM. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5

. préenrichissement en EPT, milieu SS1. Ensemble des courbes.



Courbe 13 :
Salmonella bredeney/coques
EPT. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5

-> caractéristiques

		EPTM	EPT
temps de détection inférieur à 16 h	+	27 (96 %)	26 (93 %)
	-	1	2
vitesse supérieure à 100 $\mu\text{S}/\text{h}$ pendant 6 h	+	28 (100 %)	28 (100 %)
	-	0	0
présence d'un plateau avant 30 h	+	20 (71 %)	26 (93 %)
	-	8	2
rupture de pente nette	+	13 (46 %)	14 (50 %)
	-	15	14

Tableau 8 : caractéristiques des courbes de conductance de *Salmonella bredeney* introduite dans des coques (selon l'eau peptonée)

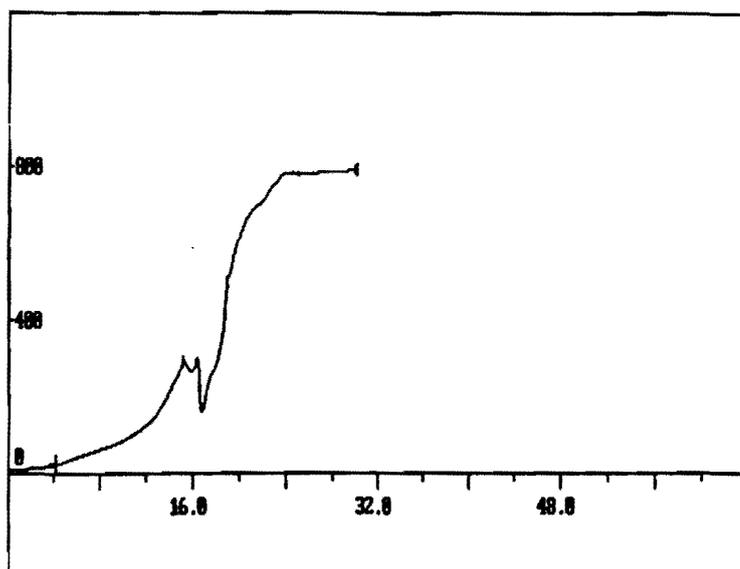
Le maximum de conductance varie de 700 à 900 μS .

4.4.3. cas particuliers

* présence d'artéfacts

-> allure

. préenrichissement en EPT, milieu SS1.



Courbe 14 :
Salmonella bredeney/coques
EPT. SS1
concentration (pour 100 ml) : 5

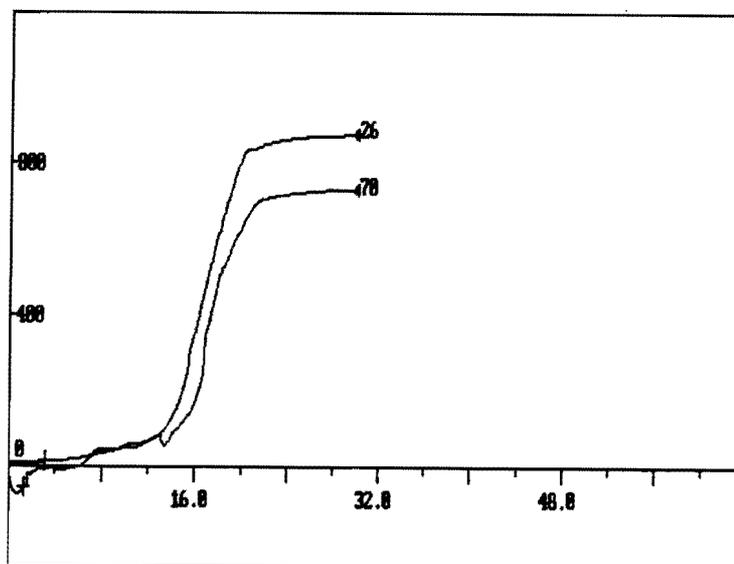
-> caractéristiques

9 artéfacts sont ainsi observés lorsque le préenrichissement a lieu en EPT contre deux en EPTM.

* comparaison entre les courbes moyennes des huîtres et des coques artificiellement contaminées avec *Salmonella bredeney*.

-> allure

. préenrichissement en EPTM, milieu SS1.



Courbe 15 :

EPTM. milieu SS1

concentration (pour 100 ml) : 5

26-> *Salmonella bredeney*/huîtres

70-> *Salmonella bredeney*/coques

-> caractéristiques

D'une manière générale, le plateau est atteint pour une valeur de conductance plus élevée et le temps de détection est moindre dans le cas des échantillons d'huîtres.

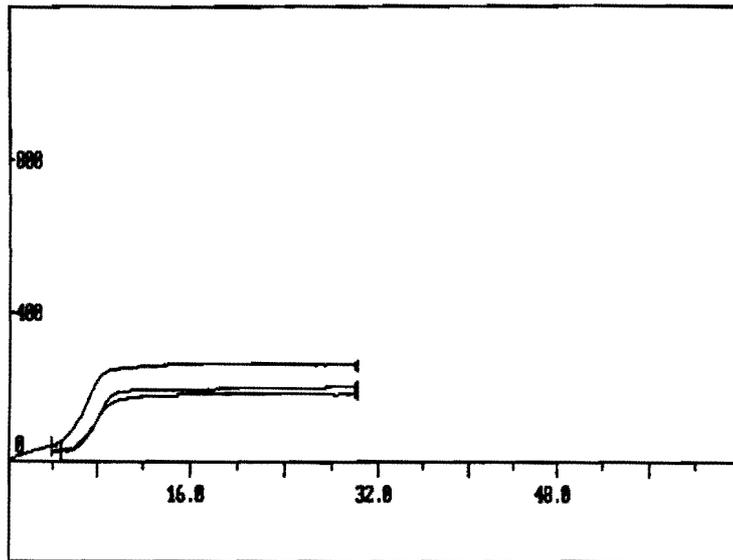
Les mêmes phénomènes s'observent après un préenrichissement en EPT.

4.5. *Salmonella typhimurium*

Dans ce cas, la salmonelle n'est pas introduite dans les coquillages par contamination artificielle ; elle est cultivée directement dans les différents milieux, le but de cette étude étant d'apprécier les changements de conductance dans le milieu SS2.

-> allure

. préenrichissement en EPTM, milieu SS2.



Courbe 16 :
Salmonella typhimurium
EPTM. SS2

-> caractéristiques (sur le milieu SS2)

Les 3 courbes présentent un temps de détection inférieur à 16 h.

La vitesse de conductance dépasse $50 \mu\text{S}/\text{h}$ pendant 3 heures.

Les plateaux, toujours présents, atteignent des valeurs de 150 à 200 μS .

La rupture de la pente n'est pas très marquée par rapport à celle pouvant être observée avec *Salmonella bredeney* dans le milieu SS1.

Remarque : aucune courbe caractéristique n'est observée avec un préenrichissement en EPT.

5 - INTERPRETATION

5.1. Comparaison des 3 méthodes

Dans le cadre du suivi bactériologique des zones conchylicoles et du milieu naturel, la **rapidité** d'obtention du résultat ainsi que les divers avantages d'ordre pratique sont à prendre en considération lors du choix d'une méthode analytique.

Ces facteurs ne doivent cependant pas interférer de manière significative avec l'objectif premier de toute méthode : la **fiabilité**.

* Pour le diagnostic présomptif comme pour l'identification, le **temps agent** d'une analyse (préparation des milieux, ensemencement, lecture) est similaire quelque soit la technique employée.

* Une première différence apparaît entre les deux méthodes traditionnelles lors de la **lecture** des résultats. Sur gélose au Vert Brillant, les caractéristiques des salmonelles (couleur, taille, forme) sont nettement différentes de celles des autres germes et plus particulièrement de *Citrobacter freundii*. Par contre, ce dernier, isolé seul sur la gélose de Rambach ressemble, de par sa taille et sa couleur, à une salmonelle. Mais les différences entre ces deux germes sont mises en évidence par leur comparaison sur une même gélose : la pratique rend donc la discrimination aisée.

Pour la méthode Malthus, il apparaît difficile de conclure quant à l'impact des autres germes sur la courbe de conductance au seul vu des résultats obtenus pour le mélange *Citrobacter* + *Salmonella*. A priori, vis-à-vis de *Citrobacter freundii*, comme dans le cas de la gélose de Rambach, la distinction semble plus facile avec l'habitude et la pratique.

* Les **résultats** obtenus ne nous permettent pas de conclure à une différence significative des résultats selon la méthode employée.

Par les 3 méthodes, la très grande majorité des résultats sont positifs ; les quelques résultats négatifs pouvant être attribués à des erreurs de manipulation. La limite de détection des salmonelles est donc inférieure à 5 germes/100 ml d'eau quelque soit la méthode employée. Cette concentration correspondant à une faible concentration, les méthodes **testées artificiellement** sont toutes d'une grande **sensibilité** et d'une grande **fiabilité**.

* Par contre la **rapidité de réponse** diffère selon la technique employée :

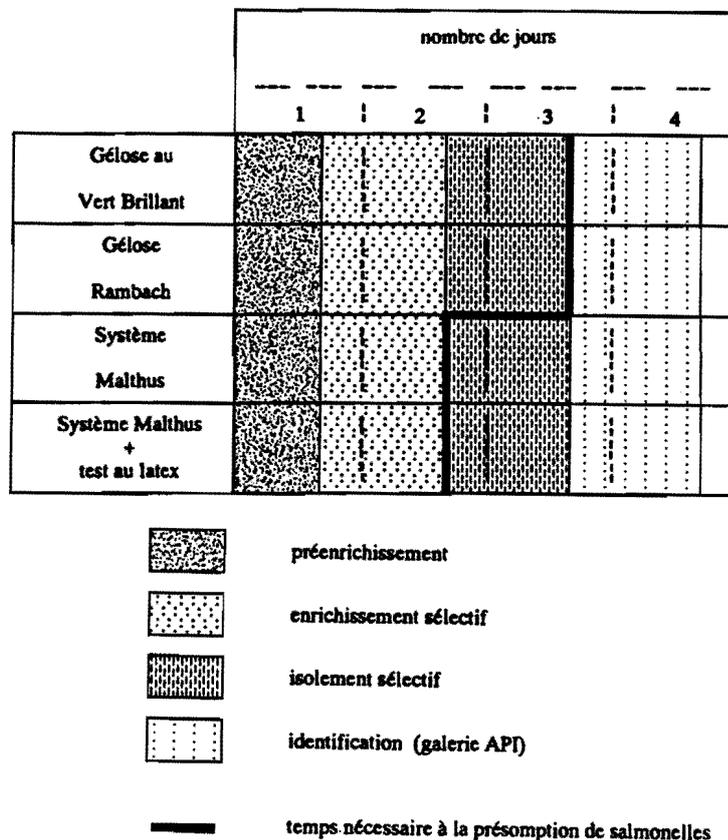


Tableau 9 : comparaison des différents temps de réponse pour la détection des salmonelles suivant la méthode employée.

Le système Malthus permet, en général, de donner une réponse présumptive en deux jours. Les méthodes traditionnelles, elles, nécessitent un délai de 3 jours.

La répercussion de ce gain de temps sur la santé publique peut être important.

Si le nombre de courbes de conductance faussement caractéristiques est négligeable ou si le test au latex élimine efficacement les faux positifs (hypothèses à vérifier), le risque d'interdire à tort une zone conchylicole sera faible ; la fermeture sera donc possible dès lors qu'un diagnostic présumptif s'avèrera positif, empêchant ainsi plus rapidement l'expédition et la vente des coquillages.

Par contre, le temps global de confirmation de la présence d'une salmonelle étant identique pour les 3 méthodes il n'est pas un critère de choix de l'une de ces techniques.

* La facilité d'emploi des différents milieux, la manipulation aisée des échantillons sont des avantages communs aux 3 méthodes ; par contre le système Malthus, grâce à son **automatisation** et son informatisation, permet une analyse en continu, avantage que ne possède pas les méthodes traditionnelles. Grâce à cette visualisation permanente des résultats, les salmonelles peuvent parfois être détectées dès 8 h d'incubation en milieu d'enrichissement SS1 ou SS2, **réduisant encore ainsi le temps de réponse présumptive.**

Tout en conservant les mêmes avantages que la microbiologie traditionnelle (temps-agent relativement faible, interprétation des résultats aisée, coût financier modeste, auxquels s'ajoute bien sûr la fiabilité) la conductance-métrie possède un atout supplémentaire : la réduction du temps de réponse.

Le caractère attrayant de cette méthode est toutefois à relativiser : les résultats encourageants obtenus par contaminations artificielles doivent être confirmés par les essais en milieu naturel.

5.2. Allure générale des courbes de conductance

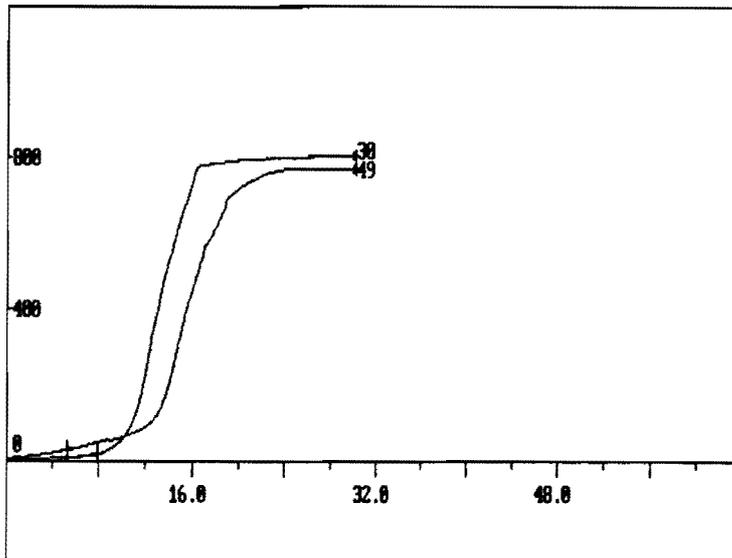
Les courbes de conductance des échantillons artificiellement contaminés avec une souche pure de salmonelle apparaissent légèrement différentes selon le milieu de préenrichissement employé et le coquillage contaminé.

Toutefois, globalement les courbes de conductance présentent les **caractéristiques décrites par la société Malthus**, à savoir :

-> sur le milieu SS1 (cas de *Salmonella bredeney*) :

- temps de détection compris entre 8 et 16 h.
- pente de 100 $\mu\text{S/h}$ pendant 6 h.
- plateau obtenu pour des valeurs de conductance avoisinant 800 $\mu\text{S/h}$.
- rupture de pente.

Pour ce dernier point, la société Malthus insiste sur la netteté et la rapidité de la cassure de la pente. Les différents échantillons analysés font apparaître une **rupture** mais celle-ci est **plus ou moins brutale** selon les cas. Les courbes suivantes illustrent cette constatation.



Courbe 22 :
Salmonella bredeney/huitres
 EPT. SS1

-> sur le milieu SS2 (cas de *Salmonella thyphimurium*)

- temps de détection compris entre 8 et 16 h.
- pente de 50 $\mu\text{S}/\text{h}$ pendant 3 h.
- plateau obtenu pour des valeurs de conductance avoisinant 200 μS .
- rupture de la pente (peu marquée).

5.3. Particularités des courbes selon les germes, les coquillages, les milieux.

Dans cette partie, pour les échantillons artificiellement contaminés, une comparaison des méthodes d'isolement pour chaque couple germe/coquillage n'est pas effectuée, les résultats étant pour la grande majorité positifs.

5.3.1. couple : *Salmonella bredeney*/huitres

Les courbes de conductance ont l'aspect caractéristique des salmonelles telles qu'elles sont décrites en 5.2. Leur interprétation aisée permet de penser que *Salmonella bredeney*, introduite dans les huitres, a un comportement identique à celui observé dans les autres produits alimentaires qui ont servi de modèle à la Société MALTHUS.

Le préenrichissement ne semble influencer que faiblement l'allure de la courbe : la rupture de pente apparaît seulement plus nette après passage en EPTM. L'emploi de cette eau peptonée spéciale ne semble pas, dans ce cas, justifié.

5.3.2. couple *Citrobacter freundii*/huîtres

Les résultats sur ce couple sont comparés à ceux de *Salmonella bredeney* introduite dans le même coquillage afin d'apprécier la présence éventuelle de faux positifs.

En général, les courbes de conductance des deux germes diffèrent par deux critères. D'une part la vitesse de conductance a tendance, en fin de courbe, à diminuer très progressivement pour *Citrobacter freundii* alors que cette diminution est plus rapide pour *Salmonella bredeney* (même si la cassure n'est pas toujours nette). D'autre part, et c'est là la principale différence, la pente est composée de deux valeurs de conductance (50 puis 100 $\mu\text{S/h}$) pour *Citrobacter* alors que cette vitesse est unique pour *Salmonella* (100 $\mu\text{S/h}$).

Mais cette différence n'est pas observée pour deux des échantillons préenrichis en EPT : leur pente, de valeur constante, est similaire à celle des salmonelles. L'allure générale de ces deux courbes pouvant être confondue avec celle des salmonelles, ces échantillons apparaissent comme des faux positifs.

Ainsi, même si le nombre d'analyses est insuffisant pour conclure avec certitude, il semble que le nombre de faux positifs ne soit pas négligeable (2 sur 24 soit 8 %). De plus, les faux positifs ayant été observés uniquement après un préenrichissement en EPT, l'emploi de l'eau peptonée Malthus suffirait-il à résoudre le problème ? Une réponse pourra peut-être être apportée au vu des résultats obtenus en milieu naturel, la fréquence de *Citrobacter* y étant élevée.

Il est aussi intéressant de constater que les faux positifs sont obtenus à partir de la même culture pure de *Citrobacter freundii* que les résultats négatifs. La présence de faux positifs n'est donc pas due à une souche particulière de *Citrobacter* mais peut-être aux conditions expérimentales (pourtant a priori identiques).

5.3.3. couple *Citrobacter freundii* + *Salmonella bredeney*/huîtres

D'une manière générale, les courbes ont un aspect comparable à celui des échantillons contaminés uniquement avec *Salmonella bredeney*. Seule la légère différence observée entre les deux préenrichissements n'est plus visible : les ruptures de pente sont relativement nettes dans les deux cas.

La présence de *Citrobacter freundii* ne semble donc pas interférer sur la courbe de conductance de *Salmonella bredeney*.

5.3.4. couple *Salmonella bredeney*/coques

Les réponses de conductance de *Salmonella bredeney* issue de 2 coquillages différents (huîtres et coques) apparaissent globalement identiques.

Les temps de détection sont parfois légèrement supérieurs dans le cas des coques, entraînant ainsi un faible raccourcissement du plateau. Ce phénomène est plus marqué dans le cas de l'eau peptonée normale. A cela s'ajoute une absence plus fréquente de plateaux lorsque le coquillage contaminé est une coque.

Ces nuances de courbes de conductance, peut-être dues à de petites variations des facteurs expérimentaux, (température du laboratoire, temps de repos des broyats, état physiologique des coquillages...) n'influent pas sur l'appréciation globale de la courbe, à savoir son aspect caractéristique d'une Salmonelle.

Donc *Salmonella bredeney*, dans les coques comme dans les huîtres, présente les mêmes caractéristiques, en conductance-métrie, que dans une autre denrée alimentaire.

Remarque : la présence occasionnelle d'artéfacts, certainement due à un dégagement gazeux dans les cellules, ne gêne nullement l'interprétation des courbes et n'a d'inconvénient qu'un désagrément esthétique.

6 - COMMENTAIRES

La recherche des salmonelles en milieu marin par conductance-métrie n'en est qu'à ces débuts. De nombreuses analyses sont encore nécessaires avant de l'adopter en routine et pour en faire éventuellement une méthode de numération de ce pathogène. Ce rôle de la conductance-métrie serait d'autant plus important qu'actuellement aucune technique de routine ne permet le dénombrement des salmonelles : la qualité des travaux sur l'étude de l'environnement du littoral en souffre. Une deuxième phase d'essais s'impose donc à présent, la recherche de salmonelles sur des coquillages naturellement contaminés pour valider les résultats obtenus dans notre étude.

ANNEXES

ANNEXE 1 : GELOSE AU VERT BRILLANT

ANNEXE 2 : GELOSE DE RAMBACH

**ANNEXE 3 : EAU PEPTONNEE TAMPONNEE
EAU PEPTONNEE MALTHUS**

**ANNEXE 4 : GELOSE P.C.A.
BOUILLON CERVEAU-COEUR**

**ANNEXE 5 : DILUANT TRYPTONE-SEL
MILIEU DE RAPPAPORT
BOUILLON AU SELENITE DE SODIUM**

Annexe 1

GELOSE AU VERT BRILLANT

Composition

- Protéose peptone n°3 Difco	10.0 g/l
- Extrait de levure.....	3.0 g/l
- Lactose.....	10.0 g/l
- Saccharose	10.0 g/l
- Chlorure de sodium.....	5.0 g/l
- Rouge de phénol	0.08 g/l
- Vert brillant.....	0.0125 g/l
- Agar agar	20.0 g/l
- H2O	1000 ml

Aspect des colonies

Si des colonies blanches, translucides de 1 à 2 mm de diamètre apparaissent sur un milieu rose framboise, il y a une forte présomption de salmonelles. Cependant d'autres colonies peuvent présenter des apparences similaires, d'où la nécessité d'une confirmation biochimique des colonies suspectes.

Sont inhibés : les gram (+), partiellement les coliformes et proteus mais également les shigelles et mêmes certaines souches fragiles de salmonelles (*Salmonella typhi*). *Salmonella arizonae*, étant lactose +, n'est pas repérée en tant que salmonelle sur ce milieu.

Annexe 2

GELOSE DE RAMBACH

Composition

- Propylène glycol	10 g/l
- Peptone	5 g/l
- Extrait de levure.....	3 g/l
- Désoxycholate de sodium	1 g/l
- Rouge neutre	0.03g/l
- 5 Bromo 4 chloro 3 indolyl galactopyranoside.....	1.5 g/l
- Agar	20g/l
- H2O	1000 ml

Aspect des colonies

- 97 % des souches de salmonelles présentent une couleur rouge fushia. La différenciation d'avec les autres enterobactéries se fait grâce à un caractère phénotypique propre : l'utilisation du propylène glycol avec formation d'acide.

- Les colonies de citrobacter apparaissent bordeau avec centre gris foncé, de diamètre compris entre 2 et 3 mm, avec un halot clair.

- Des problèmes particuliers sont observés avec certaines souches : *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella typhi*, *Salmonella arizonae*, qui se singularisent du point de vu biochimique par rapport aux autres sérotypes, ne prennent pas cette coloration rouge vif caractéristique. Les colonies sont incolores ou absentes.

- De rares souches de pseudomonas faussement positives sont éliminées en utilisant le test à l'oxydase.

Annexe 3**EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE**

- Peptone pancréatique de viande.....	20.0 g/l
- Phosphate disodique anhydre	7 g/l
- Phosphate monopotassique.....	3 g/l
- Chlorure de sodium.....	10 g/l
- H ₂ O	1000 ml

EAU PEPTONÉE TAMPONNÉE MALTHUS

- Eau peptonée tamponnée	20 g/l
- L-lysine	5 g/l
- D-glucose	5 g/l
- H ₂ O	1000 ml

Annexe 4**GELOSE P.C.A.****Composition**

- Pastone	5 g/l
- Extrait de levure	2.5 g/l
- Glucose	1 g/l
- Agar	15 g/l

BOUILLON CERVEAU-COEUR**Composition**

- Protéose peptone	10 g/l
- Infusion de cervelle de veau	12.5 g/l
- Infusion de coeur de boeuf	5 g/l
- Chlorure de sodium	5 g/l
- Phosphate disodique	2.5 g/l
- Glucose	2 g/l
- H2O	1000 ml

Annexe 5**DILUANT TRYPTONE-SEL**

- Tryptone.....	1 g/
- Chlorure de sodium.....	8.5 g/l
- H2O	1000 ml

MILIEU DE RAPPAPORT

- Peptone de caseine	4.0 g/l
- Chlorure de magnésium	36.0 g/l
- Chlorure de sodium.....	8.0 g/l
- Di potassium hydrogénophosphate.....	0.4 g/l
- Di hydrophosphate de sodium	0.6 g/l
- Vert de malachite	0.036 g/l
- H2O	1000 ml

BOUILLON AU SELENITE DE SODIUM

- Polypeptone	5 g/l
- Lactose.....	4 g/l
- Phosphate dipotassique.....	10 g/l
- Sélénite de sodium	4 g/l
- H2O	1000 ml

BIBLIOGRAPHIE

BUTTIAUX R. & LEURS Th. (1953).

Survie des salmonella dans l'eau de mer.

Académie nationale de médecine – séance du 28/07/53.

CORBION B., MOURY F., OUDART C., BAUER C.

Détection des Salmonella dans les aliments par Impédancemètrie.

DELATTRE J.M. (1988)

Indicateurs fécaux et stress en milieu marin. Etude des variations à court terme .

Océanis 14 (1) p. 89-95.

EASTER M.C., and GIBSON D.M. (1984)

Rapid and automated detection of salmonella by electrical measurements .

Journal of Hygiene – 1985 – 94 p. 245-262.

AL. JEBOURI M.M. and TROLOPPE D.R. (1984)

Indicators bacteria in freshwater and marine molluscs.

Hydrobiologia 111 p. 93-102.

NISHIO, JUNZONAKAMORI and KAZUOMIYAZAKI (1981)

Survival of salmonella typhi in oysters .

Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B 172 p. 415-426.

OGDEN I.D. (1988)

A conductance medium to distinguish between Salmonella and Citrobacter spp. .

Internationnal Journal of Food Microbiology – 1988 – 7 p. 287-297.

OGDEN I.D. (1990)

The effect of air on the reponse of salmonellas in conductance-metrie .

Applied Microbiology – 1990 – 11 p. 193-196.

OGDEN I.D. (1990)

Salmonella detection by a modified Lysine conductance medium .

Applied Microbiology – 1990 – 11 p. 69-72.

OGDEN I.D. and CANN D.C. (1987)

A modified conductance medium for the detection of Salmonella spp .

Applied Microbiology – 1987 – 63 p.459-464.

RICHARDS J.C.S., JASON A.C., HOBBS G., GIBSON D.M., CHRISTIE R.H. (1978)

Electronic measurement of bacterial growth

J. Phys. E.: Sci. Instrum. 11 p. 560-569.

SMITH P.J., BOLTON F.J. and GAYNER V.E. (1990)

Reproductibility of electrical conductance assay results for the detection of Salmonella
Applied Microbiology - 1991 - 12 p. 78-80.

TROLOPPE D.R. (1984)

Microbiological methods for environmental biotechnology.
Society for applied bacteriology - 393-408

WILLIENSEN J. (1952)

Quantities of water pumped by mussels *Mytilus edulis* and cockles *Cardium edule* .
Arch. Neer. Zool. 10 p. 153-160.