

N°713.7 DEL E

ETUDE MICROBIOLOGIQUE DES MOULES  
DE LA REGION NORD-PAS DE CALAIS

RECHERCHE DE SALMONELLA ET YERSINIA  
AU STADE DE LA CUEILLETTE

JEAN-FRANÇOIS HERNANDEZ, CATHERINE OGER  
JEAN-MARIE DELATTRE

SERVICE DES EAUX  
INSTITUT PASTEUR DE LILLE  
RUE CAMILLE GUÉRIN  
59019 LILLE CEDEX

Etude réalisée avec le concours financier de  
l'Institut Français pour la Recherche et  
l'Exploitation de la Mer (IFREMER)  
-Convention n° 83/7214-

AOUT 1984

## INTRODUCTION

- Les problèmes de santé publique liés à la fréquentation du bord de mer sont multiples, mais les plus souvent cités sont en relation avec la baignade, avec le contact du sable des plages, et avec la consommation des coquillages.

L'incidence de la baignade ne semble pas prépondérante dans le Nord - Pas de Calais. En effet les baigneurs y sont rarement nombreux et le bain est généralement court, à cause de la température relativement basse des eaux.

De même les contaminations par le sable sont a priori réduites sur ces côtes soumises à d'importantes marées.

La consommation des coquillages locaux pourrait donc avoir une place prépondérante dans les risques sanitaires liés à la fréquentation du littoral. La température assez basse et l'ensoleillement limité incitent plus, en effet, à la cueillette des moules qu'à la baignade, et on peut estimer à 1000 tonnes/an la cueillette sauvage dans la région, qui s'ajoutent aux 2000 tonnes/an provenant de concessions autorisées (7).

Or les mollusques filtreurs concentrent les contaminants microbiens des eaux, et celles du secteur sont précisément de qualité bactériologique médiocre (\*), ce que confirment les observations de l'ISTPM sur la contamination des moules et coques en germes - tests de contamination fécale (6).

... / ...

---

(\*) DDASS, RNC etc...

Pour toutes ces raisons, il a donc semblé intéressant d'aborder les problèmes épidémiologiques liés à la consommation des coquillages dans la région, en commençant par évaluer le contenu en germes pathogènes au premier stade, celui de la cueillette.

Pour cela, après des travaux de laboratoire destinés à améliorer les techniques de recherche des Salmonella et Yersinia, on a choisi, en se fondant sur les résultats de l'ISTPM en 1983 (6), six gisements de moules sur lesquels ces germes pathogènes ont été recherchés à plusieurs reprises, en même temps que le dénombrement des indicateurs réglementaires de contamination fécale (Escherichia coli et streptocoques fécaux). —

## 1ERE PARTIE

### MISES AU POINT ANALYTIQUES

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des travaux en laboratoire ont eu pour but la mise au point des techniques de recherche des Salmonella et des Yersinia (\*) dans les moules. Pour cela nous avons déterminé le seuil de détection de ces différentes techniques :

- sur une suspension bactérienne ;
- puis sur un broyat de moules artificiellement contaminé ;
- et, enfin, sur des moules ayant séjourné dans une eau contaminée en bactéries pathogènes.

#### SUSPENSION BACTERIENNE

Nous avons employé une suspension à  $10^8$  bactéries/ml et ses dilutions décimales successives.

Les souches utilisées ont été :

- S. brandenburg
- Y. enterocolitica

isolées à partir d'eau de rivière et identifiées par Le Minor (IPP) et Mollaret (IPP).

#### BROYAT ARTIFICIELLEMENT CONTAMINE

Salmonella et Yersinia ont été recherchées dans 25 ml de broyat de moules artificiellement contaminé par ajout de 1-5, 10-50 et 100-500 germes/ml.

---

(\*) agents de gastroentérites (S et Y), pseudo appendicites (Y), typhoïde (S. typhi.) ou paratyphoïdes (S. paratyphi A et B).

MOULES AYANT SEJOURNE DANS UNE EAU CONTAMINEE EN PATHOGENES

La recherche a porté, dans un premier temps, sur 25 ml de broyat de moules qui avaient séjourné 24 à 48 heures dans un bassin contenant 5 litres d'eau contaminée par 5-20 ou 50-200 ou 500-2000 pathogènes/litre. En supposant que les 5 l d'eau sont entièrement filtrés par les moules, cela conduit à des concentrations de 25-100, 250-1000 et 2500-10000 germes pathogènes/25 ml de broyat de moules soit les mêmes concentrations que lors de l'expérience précédente.

Dans un deuxième temps, ces bassins contenaient de l'eau de mer contaminée en E. coli ( $10^7/1$ ), streptocoques fécaux ( $10^7/1$ ) et bactéries pathogènes aux mêmes teneurs que précédemment. De plus les germes pathogènes avaient au préalable subi un séjour d'une semaine à 30° C dans de l'eau de mer stérile.

TECHNIQUES DE RECHERCHE /

SALMONELLA

Nous avons testé pour les Salmonella deux techniques de recherche :

- 1) Une technique avec revivification qui comporte un premier passage sur NOY à 37° C pendant 24 h suivi d'un passage en bouillon au sélénite à 43° C pendant 48 h (Bio Mérieux 5.112-1),
- 2) Une technique sélective avec ensemencement direct en bouillon au sélénite incubé à 43° C pendant 48 h.

Les isolements sont faits sur DCL (IPP code n° 50853) et gélose HEKTOEN (IPP code n° 64287).

---

NOY bacto peptone 10 g., NaHPO<sub>4</sub> 6,7 g., KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g., désoxycholate de sodium à 2 %  
 PBS tampon phosphate salin pH = 7,0  
 DCL (désoxycholate citrate lactose) pour Salmonella et Shigella  
 Milieu de Leifson - Hynes / IPP code n° 50853

YERSINIA

On a testé trois milieux liquides (NOY, PBS et bouillon au sélénite), deux temps d'incubation (24 à 48 h), avec ou sans traitement à la potasse, suivi ou non d'une filtration sur membrane 0,45 um.

La combinaison de ces 4 paramètres conduit à 18 techniques différentes, auxquelles s'ajoute pour le bouillon au sélénite une incubation à 4° C pendant 1, 2 et 3 semaines. Soit un total de 21 techniques à comparer.

Les repiquages sont dans tous les cas effectués sur milieu gélosé de MC CONKEY (IPP code n° 51602).

## RÉSULTATS

### SALMONELLA

Les deux techniques choisies permettent de détecter :

- 1) Les Salmonella ajoutées à raison de 1-5/ml à du broyat de moules (chair + liquide intervalvaire),
- 2) et les Salmonella absorbées par des moules ayant séjourné 24 à 48 h dans une eau de mer contenant seulement 5 à 20 Salmonella/l (que ce soit en présence ou non d'E. coli et streptocoques fécaux,  $10^7$ /l) (tab. 1).

### YERSINIA - (tableaux 2 et 3)

#### Suspension en eau distillée :

Le bouillon au sélénite incubé à 26° C, quel que soit la technique utilisée, ne permet pas d'isoler de Yersinia même à partir d'une suspension de 1000-5000 germes/ml. Lorsque le sélénite est mis à 4° C, après 2 semaines, la recherche est positive, mais seulement pour des concentrations supérieures ou égales à 100-500 germes/ml.

Avec le milieu PBS incubé 24 à 48 h à 26° C, la recherche est positive pour des concentrations supérieures ou égales à 1-5 germes/ml. Le traitement à la potasse élimine au moins 99,9 % des Yersinia puisqu'après un tel traitement la recherche est négative même à partir d'une suspension de 1000-5000 germes/ml.

Dans le bouillon NOY incubé 24 à 48 h à 26° C, les Yersinia se multiplient. Il est alors possible de les retrouver à partir d'une suspension à 1-5 germes/ml, même après un traitement à la potasse.

#### Broyat artificiellement contaminé :

Le sélénite incubé à 26° C ou mis à 4° C ne permet pas d'isoler les Yersinia additionnées à du broyat de moules à la concentration de 100-500 germes/ml.

SALMONELLA

TABLEAU I

<i>Expériences</i>	<u>Seuils de détection (S/ml d'eau ou broyat)</u>		<u>Concentrations en S/l d'eau de bassin conduisant à la détection dans 25 ml de broyat</u>	
	1	2	3	4
<u>Techniques</u>				
Sélénite 43° C - 48 h + DCL	1-5	1-5	5-20	5-20
Sélénite 43° C - 48 h + HEKTOEN	1-5	1-5	5-20	5-20
NOY 37° C - 24 h + sélénite 43° C 48 h + DCL	1-5	1-5	5-20	5-20
NOY 37° C - 24 h + sélénite 43° C 48 h + Hektoen	1-5	1-5	5-20	5-20

1 - suspension en eau distillée

2 - broyat de moules artificiellement contaminé

3 - séjour de 24 h dans une eau contaminée en Salmonella

4 - séjour de 24 h dans une eau contaminée en E. coli, streptocoques fécaux et Salmonella



YERSINIA
----------

TABLEAU 2

<i>Expériences</i>	<u>Seuils de détection</u> <i>(Y./ml d'eau ou de broyat)</i>	
	<i>1</i>	<i>2</i>
<u>Techniques</u>		
<i>PBS 26° C - 24 h</i>	1-5	> 500
<i>PBS 26° C - 48 h</i>	1-5	> 500
<i>PBS 26° C - 24 h + KOH</i>	> 5000	> 500
<i>PBS 26° C - 48 h + KOH</i>	> 5000	10-50
<i>PBS 26° C - 24 h + KOH + Filtration</i>	> 5000	10-50
<i>PBS 26° C - 48 h + KOH + Filtration</i>	> 5000	10-50
<i>NOY 26° C - 24 h</i>	1-5	> 500
<i>NOY 26° C - 48 h</i>	1-5	> 500
<i>NOY 26° C - 24 h + KOH</i>	1-5	1-5
<i>NOY 26° C - 48 h + KOH</i>	1-5	1-5
<i>NOY 26° C - 24 h + KOH + Filtration</i>	1-5	1-5
<i>NOY 26° C - 48 h + KOH + Filtration</i>	1-5	1-5
<i>Sélénite 26° C - 24 h</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 26° C - 48 h</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 26° C - 24 h + KOH</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 26° C - 48 h + KOH</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 26° C - 24 h + KOH + Filtration</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 26° C - 48 h + KOH + Filtration</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 4° C - 1 semaine</i>	> 5000	> 500
<i>Sélénite 4° C - 2 semaines</i>	100 - 500	> 500
<i>Sélénite 4° C - 3 semaines</i>	100 - 500	> 500

1 - suspension en eau distillée

2 - broyat de moules artificiellement contaminé

YERSINIA
----------

TABLEAU 3

<i>Expériences</i>	<u>Concentration en Y./l d'eau de bassin conduisant à la détection dans 25 ml de broyat</u>	
	3	4
<u>Techniques</u>		
PBS 26° C - 24 h	-	-
PBS 26° C - 48 h	-	-
PBS 26° C - 24 h + KOH	-	-
PBS 26° C - 48 h + KOH	>2000	-
PBS 26° C - 24 h + KOH + Filtration	>2000	-
PBS 26° C - 48 h + KOH + Filtration	>2000	-
NOY 26° C - 24 h	-	-
NOY 26° C - 48 h	-	-
NOY 26° C - 24 h + KOH	>2000	-
NOY 26° C - 48 h + KOH	5-20	5-20
NOY 26° C - 24 h + KOH + Filtration	>2000	-
NOY 26° C - 48 h + KOH + Filtration	>2000	-
Sélénite 26° C - 24 h	-	-
Sélénite 26° C - 48 h	-	-
Sélénite 26° C - 24 h + KOH	-	-
Sélénite 26° C - 48 h + KOH	-	-
Sélénite 26° C - 24 h KOH + Filtration	-	-
Sélénite 26° C - 48 h + KOH + Filtration	-	-
Sélénite 4° C - 1 semaine	-	-
Sélénite 4° C - 2 semaines	-	-
Sélénite 4° C - 3 semaines	-	-

3 - Séjour de 24 h dans une eau contaminée en Yersinia

4 - Séjour de 24 h dans une eau contaminée en E. coli, streptocoques fécaux et Yersinia

Avec le PBS et le NOY incubés à 26° C on ne retrouve les Yersinia qu'après un traitement à la potasse qui sélectionne les Yersinia au détriment de la flore bactérienne contenue dans les moules.

La technique d'enrichissement en NOY est un peu plus sensible puisqu'elle permet de retrouver les Yersinia à des teneurs de 1-5 germes/ml de broyat alors qu'avec le PBS le seuil de détection est de 10-50 germes/ml.

Moules ayant séjourné dans une eau contaminée en Yersinia :

Seul le milieu NOY incubé 48 h à 26° C suivi d'un traitement à la potasse permet de retrouver les Yersinia à partir de moules ayant séjourné 24 à 48 h dans une eau contenant 5 à 20 Yersinia/litre en présence ou non d'E. coli et de streptocoques fécaux ( $10^7$ /litre).

## CONCLUSIONS

### SALMONELLA

Les deux techniques testées présentant la même sensibilité, nous avons choisi la plus rapide :

- ensemencement de 25 ml de broyat dans 225 ml de bouillon au sélénite,
- incubation 48 h à 43° C
- isolement sur gélose DCL (Désoxycholate Citrate Lactose)

### YERSINIA

Des 21 techniques testées, la plus sensible est sans doute :

- ensemencement de 25 ml de broyat dans 225 ml de NOY
- incubation 48 h à 26° C
- traitement à la potasse pendant 1 mn (0,5 ml de bouillon ajoutés à 4,5 ml de potasse à 0,5 %)
- isolement sur gélose MC CONKEY.

## 2EME PARTIE

### TRAVAUX DE TERRAIN

#### PRÉLÈVEMENT

Les prélèvements de moules (M. edulis) ont été effectués, à la fréquence d'un par mois, entre Novembre 1983 et Mai 1984, en six points du littoral Nord/Pas de Calais, entre Le Portel et Dunkerque. Les stations ont été repérées par un numéro de 1 à 6 sur les cartes ci-jointes en annexe.

#### ANALYSES

Sur le lieu de prélèvement les moules sont soigneusement nettoyées extérieurement et ouvertes à l'aide d'un couteau flambé. L'on récupère ainsi 50 g. de chair que l'on broie dans un mortier avec du sable de Fontainebleau stérile. Le broyat est récupéré et complété à 75 ml à l'aide d'un diluant (NaCl 8,5 g ; eau distillée 1000 ml).

- 25 ml sontensemencés dans 225 ml de bouillon NOY pour incubation 48 h à 26° C, traitement à la potasse et isolement sur gélose de MC CONKEY pour la recherche des Yersinia ;
- 25 ml sontensemencés dans 225 ml de bouillon au sélénite pour incubation 48 h à 43° C et isolement sur gélose DCL pour la recherche des Salmonella

... / ...

- Les 25 ml restant et leurs dilutions décimales étant ensemencés selon la technique du nombre le plus probable (NPP) sur les milieux suivants :

- . + bouillon lactosé au bromocrésol pourpre, incubé 48 h à 30° C avec repiquage sur milieu de Schubert à 44° C pour dénombrement d'E. coli,
- . + Rothe incubés 48 h à 37° C pour dénombrement des streptocoques fécaux avec repiquage sur milieu de Litsky 48 h à 37° C.

Les Salmonella et Yersinia sont identifiées sur gélose API 20E et confirmées par sérologie (Prof. Le Minor et Mollaret, IPP).

## RÉSULTATS

Les résultats concernant le dénombrement des E. coli, des streptocoques fécaux et la recherche des pathogènes sont regroupés dans les tableaux 4 à 9.

### A / RESULTATS DU DENOMBREMENT DES E. COLI /

On constate que le nombre moyen d'E. coli/100 ml de broyat est très élevé pour chacune des six stations étudiées. En effet, les moyennes logarithmiques des différents sites sont :

- Dunkerque .....	6,0 . 10 <sup>2</sup>
- La crèche .....	1,8 . 10 <sup>3</sup>
- Grand Fort .....	4,3 . 10 <sup>3</sup>
- Calais .....	5,4 . 10 <sup>3</sup>
- Wimereux .....	6,3 . 10 <sup>3</sup>
- Le Portel .....	2,0 . 10 <sup>5</sup>

... / ...

L'arrêté interministériel du 12 Octobre 1976 fixe le nombre le plus probable d'E. coli à ne pas dépasser pour que les coquillages soient considérés comme salubres, à 300/100 ml de broyat et aucune des 6 stations étudiées ne se situe en dessous de cette norme.

Les résultats d'analyses bactériologiques étant aléatoires, nous avons fait appel à une méthode statistique (Régression Log-Normale) afin de calculer pour l'ensemble des sites le niveau médian de contamination en E. coli (courbe n° 1).

Ce niveau médian est de  $4,0 \cdot 10^3$  E. coli/100 ml de broyat ( $1448 < 4040 < 11269$ ) (intervalles de confiance à 95 %).

Il apparaît alors que Dunkerque est significativement le site le moins contaminé et Le Portel significativement le plus contaminé en E. coli.

Le même type d'analyse statistique (courbe n° 2) conduit à partir des résultats de l'ISTPM en 1983 à un niveau médian de contamination égal à  $2,8 \cdot 10^3$  E. coli/100 ml de broyat ( $1864 < 2757 < 4078$ ) avec moins de 5 % des sites conformes à la norme de salubrité. Il apparaît que la différence de contamination en E. coli entre les 6 sites étudiés en 1984 et l'ensemble des sites étudiés par l'ISTPM en 1983 n'est pas significative.

#### B / DENOMBREMENT DES STREPTOCOQUES FECAUX /

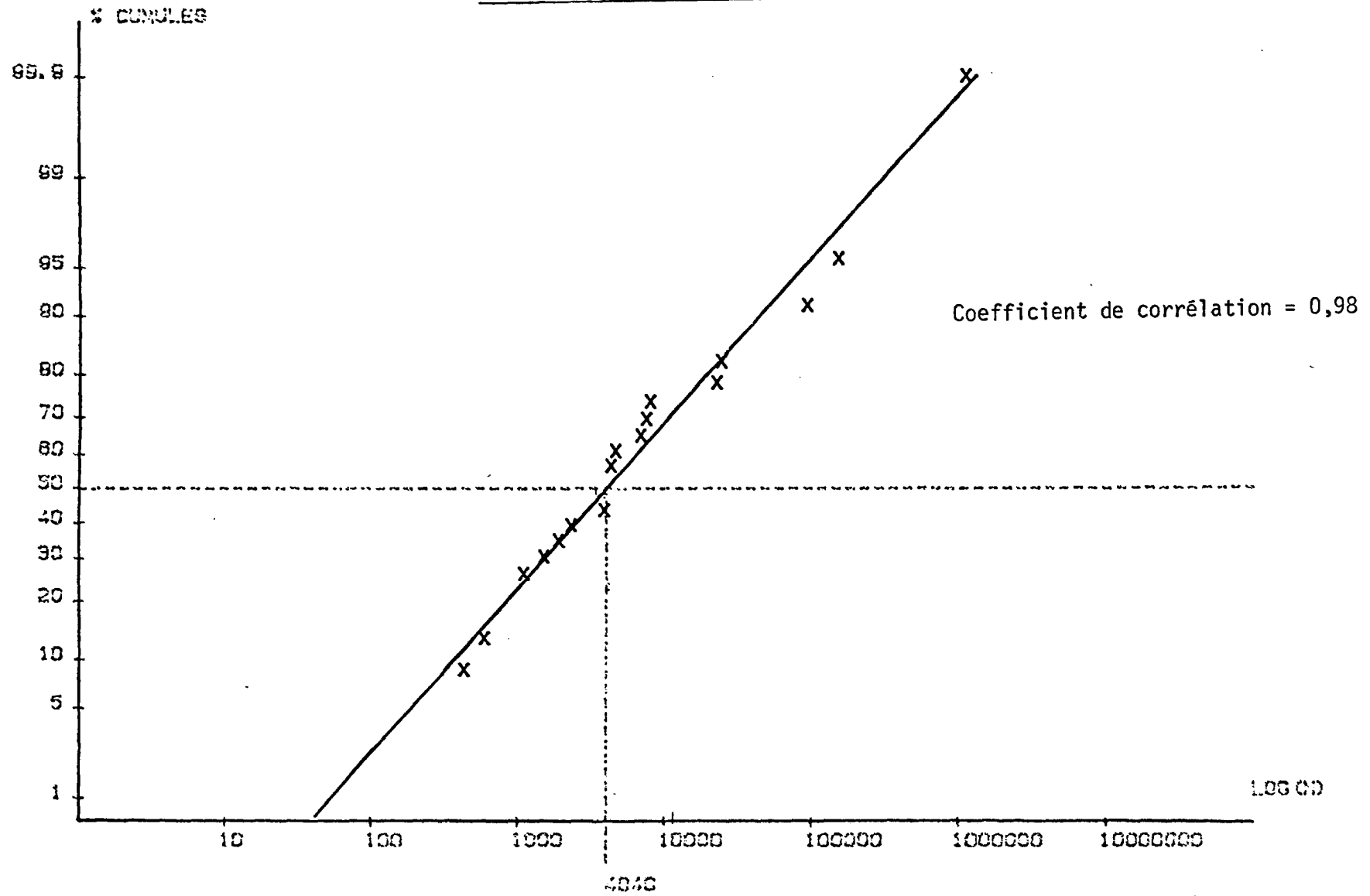
Les moyennes logarithmiques en streptocoques fécaux des différents sites sont :

- Dunkerque	.....	$4,7 \cdot 10^3$ / 100 ml de broyat
- La Crèche	.....	$7,9 \cdot 10^3$
- Wimereux	.....	$1,9 \cdot 10^4$
- Calais	.....	$2,6 \cdot 10^4$
- Grand Fort	.....	$3,3 \cdot 10^4$
- Le Portel	.....	$5,6 \cdot 10^4$

Le niveau médian de contamination est égal à  $1,1 \cdot 10^4$  streptocoques fécaux/100 ml de broyat ( $5338 < 10988 < 22616$ ) (Courbe n° 3).

COURBE n° 1

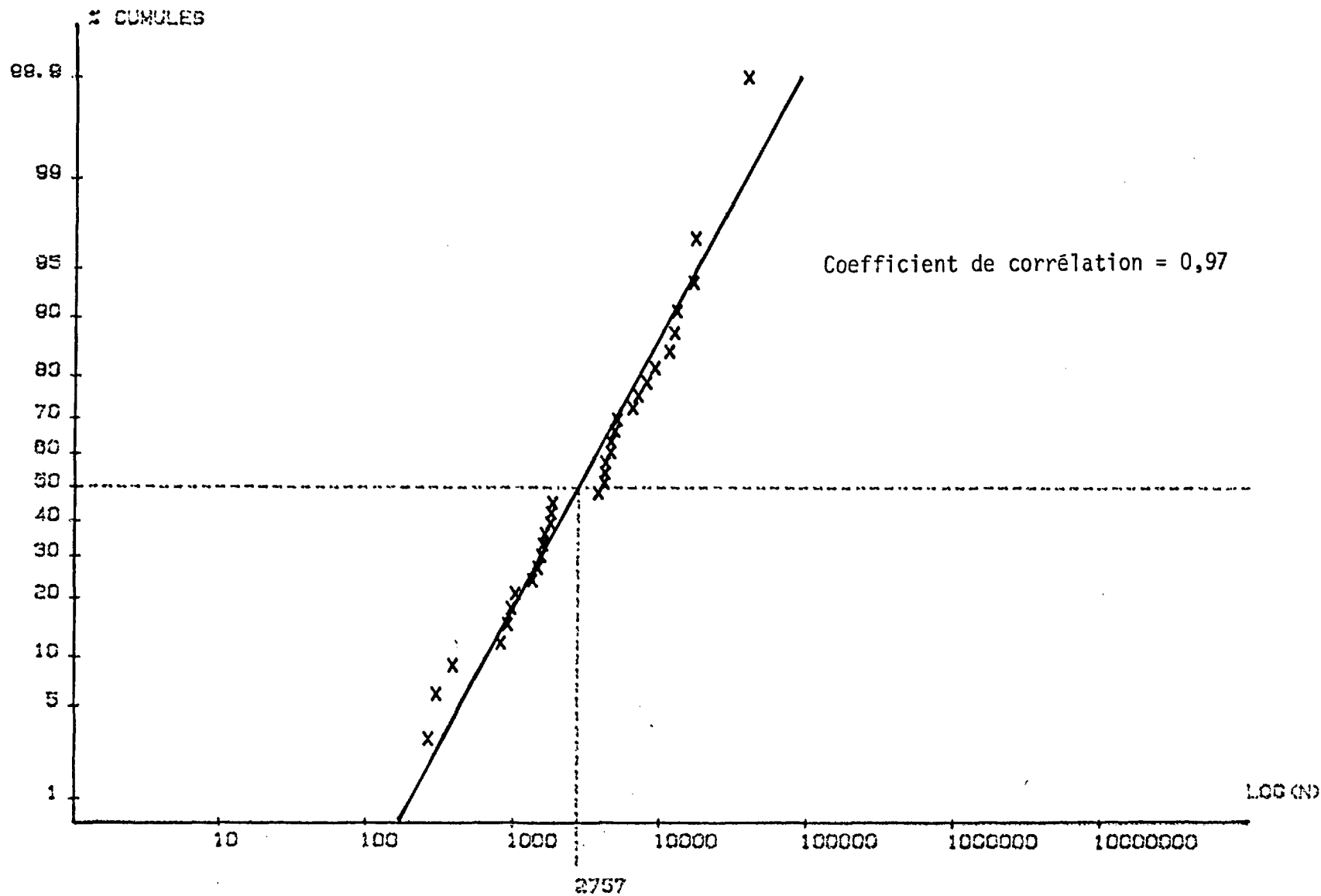
NIVEAU MEDIAN EN *E. coli* DANS LES MOULES (1984)





COURBE n° 2

NIVEAU MEDIAN EN *E. coli* DANS LES MOULES (1983)



L'on constate tout comme pour E. coli, que Dunkerque est le site significativement le moins contaminé en streptocoques fécaux. Par contre, Calais, Grand Fort Philippe et Le Portel sont les sites significativement les plus contaminés en streptocoques fécaux.

Les résultats de l'ISTPM pour 1983 (courbe n° 4) donnent un niveau médian de contamination égal à  $4,3 \cdot 10^3$  streptocoques fécaux/100 ml de broyat (3133 < 4283 < 5855). Les 6 sites étudiés en 1984 sont donc significativement plus contaminés en streptocoques fécaux que l'ensemble des sites étudiés en 1983.

Aucune norme officielle ne fixe le nombre de streptocoques fécaux à ne pas dépasser dans les coquillages à la production. Cependant, si à la vue des résultats en E. coli, l'on considère que moins de 5 % des sites étudiés en 1983 étaient salubres, on est amené à proposer comme nombre le plus probable admissible 1000 streptocoques fécaux/100 ml, pour que les coquillages soient considérés comme salubres.

Sur la base de ce chiffre les 6 sites que nous avons étudiés seraient considérés comme insalubres.

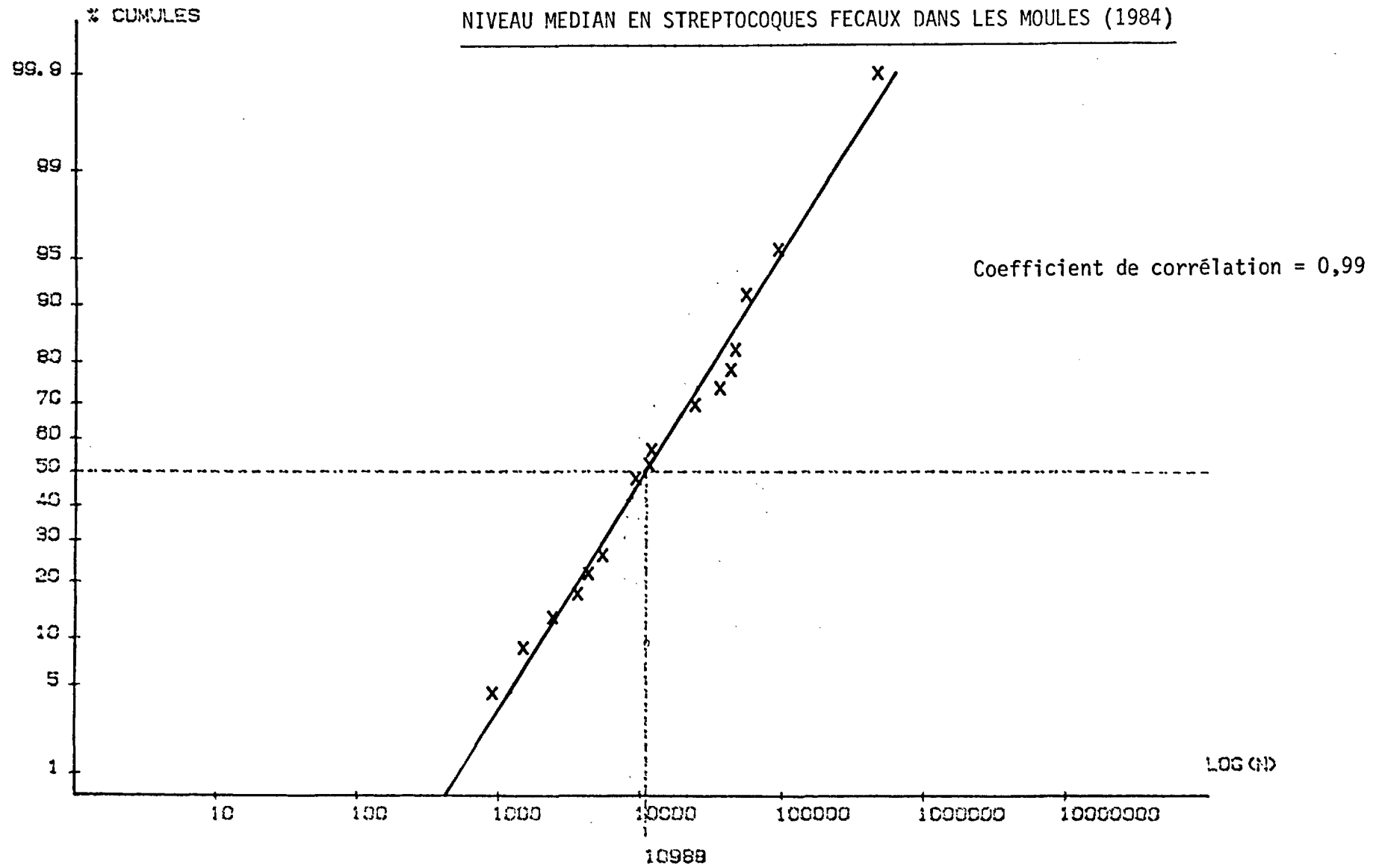
Pour les moules le taux de contamination en streptocoques fécaux est supérieure à celui en E. coli, le rapport streptocoques fécaux/E. coli variant entre 1 et 5 avec une valeur moyenne de 2, ce rapport diminuant lorsque la contamination est forte.

#### C / RECHERCHE DES SALMONELLA /

Sur les 23 séries de recherche de Salmonella effectuées, 2 seulement se sont avérées positives, soit moins de 10 % des prélèvements. Les deux fois, les coquillages avaient pour origine le site du Portel. Au mois de Janvier, il s'agissait de S. enteritidis et les teneurs en germes indicateurs étaient de 93000 E. coli et 24000 streptocoques fécaux pour 100 ml de broyat.

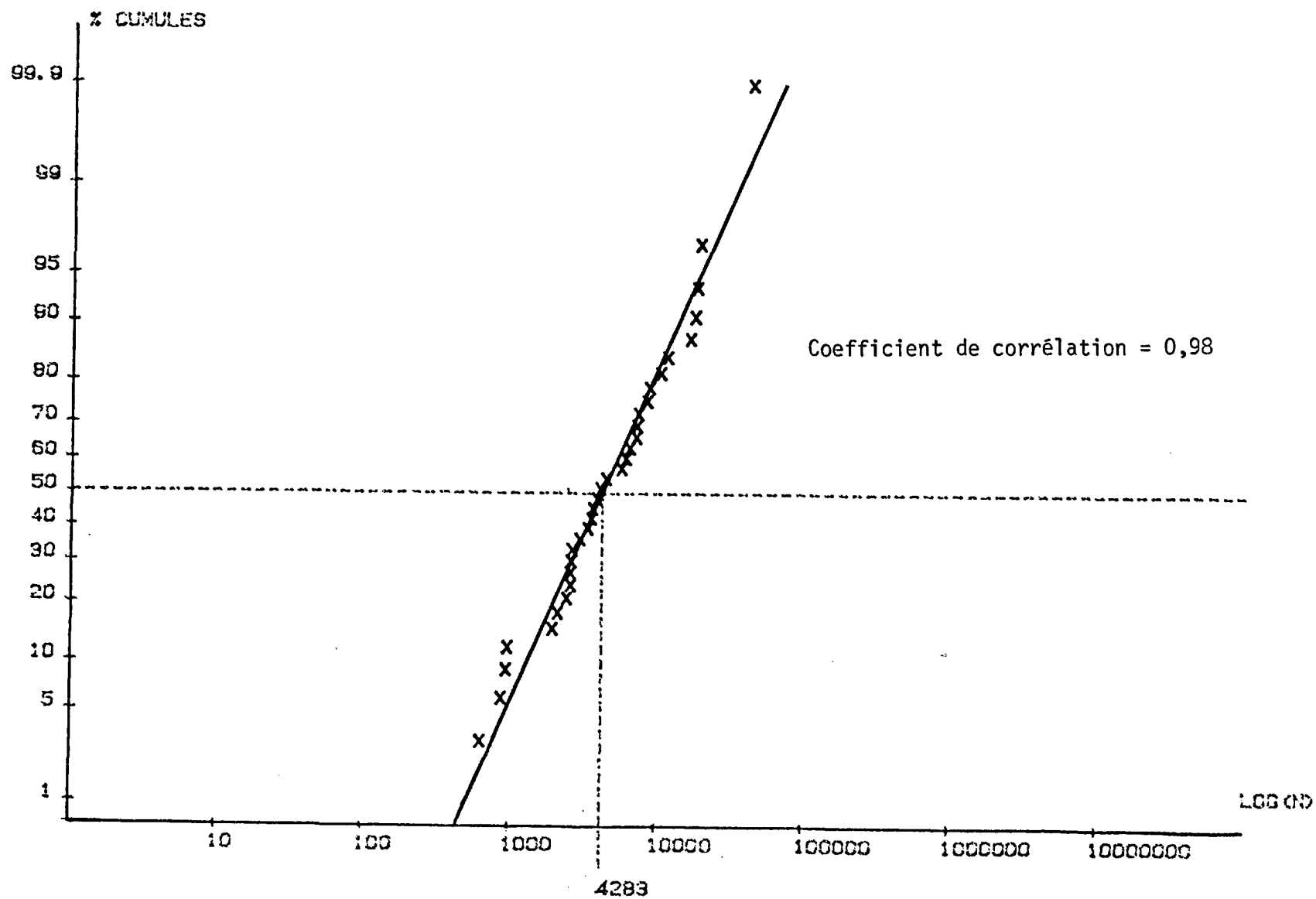
En Mars, nous avons isolé une S. typhimurium et les teneurs en indicateurs étaient de 150000 E. coli et 43000 streptocoques fécaux pour 100 ml de broyat.

COURBE n° 3



COURBE n° 4

NIVEAU MEDIAN EN STREPTOCOQUES FECAUX DANS LES MOULES (1983)



Le nombre de prélèvements contenant des Salmonella est cependant insuffisant pour que l'on puisse rechercher une relation entre indicateurs et pathogènes.

D / RECHERCHE DES YERSINIA /

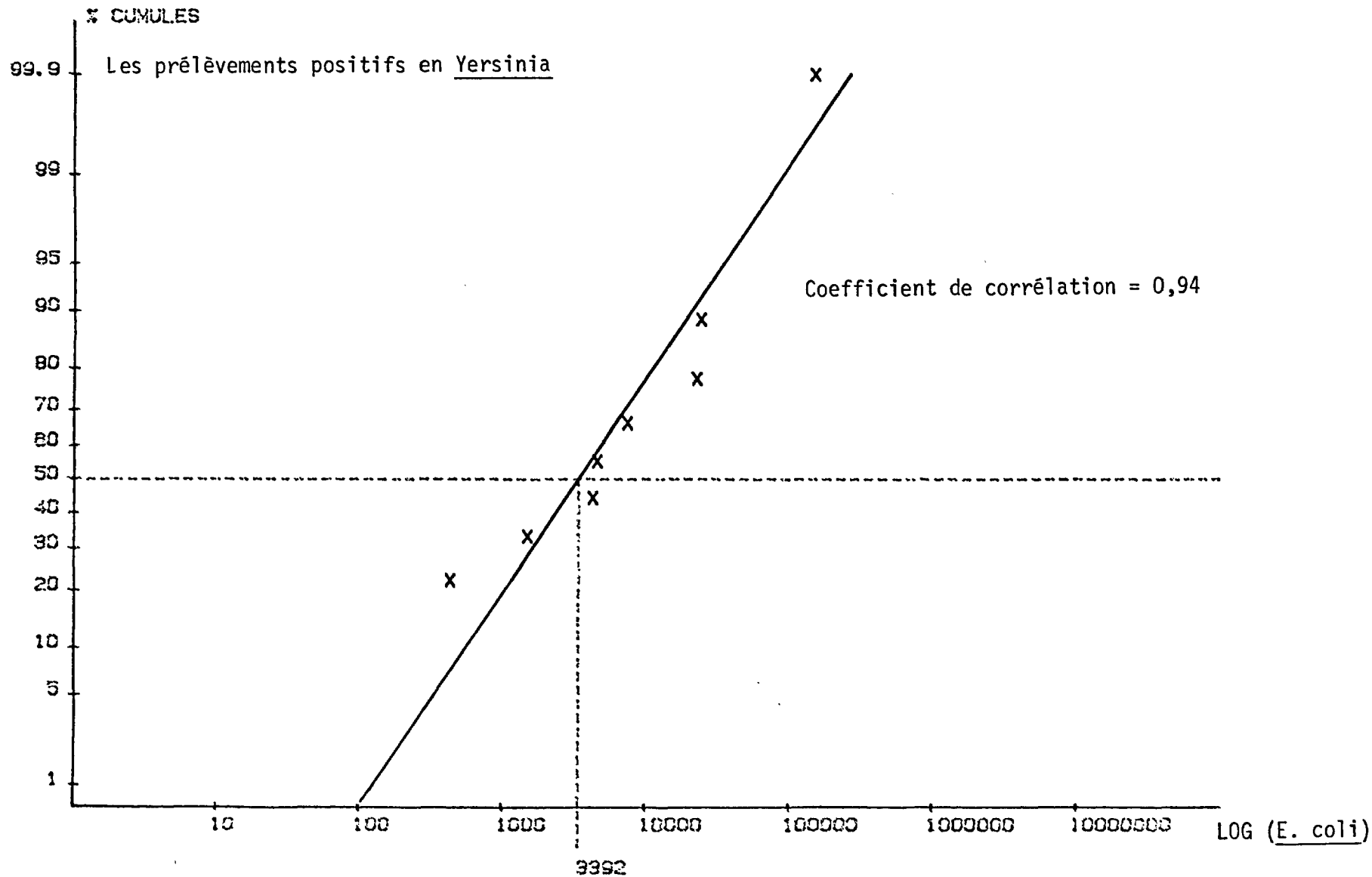
En parallèle avec les recherches de Salmonella nous avons effectué 23 recherches de Yersinia. Les 8 premiers prélèvements effectués en Novembre, Décembre et Janvier ont été incubés en sélénite à 4° C et n'ont pas permis d'isoler de Yersinia. Par contre sur les 15 derniers prélèvements analysés suivant la technique mise au point au laboratoire, 9 se sont révélés positifs en Yersinia. Seul le site de Calais a toujours été négatif.

Le nombre de prélèvements positifs en Yersinia étant assez important nous avons pu rechercher une relation entre le pourcentage de prélèvements positifs et la teneur en indicateurs (courbes n° 5 et 6). Il est apparu que les Yersinia étaient étroitement corrélées avec E. coli et les streptocoques fécaux (coefficient de corrélation respectivement égaux à 0,94 et 0,93). Une preuve de la validité de cette relation est apportée par le fait qu'avec un niveau médian de contamination égal à 4000 E. coli/100 ml de broyat nous devrions trouver statistiquement 55 % de prélèvements positifs en Yersinia. Nous en avons trouvé 60 % en réalité. Sur la base de cette relation, si les coquillages respectaient la norme de salubrité le pourcentage de prélèvements positif en Yersinia serait inférieur à 5 %.

Bien entendu, la relation que nous avons trouvée entre indicateurs et Yersinia demande à être confirmée sur un plus grand nombre de points, en d'autres sites et pendant la saison estivale, quand l'eau est plus chaude.

COURBE n° 5

RELATION ENTRE YERSINIA ET E. coli



COURBE n° 6

RELATION ENTRE YERSINIA ET STREPTOCOQUES FECAUX

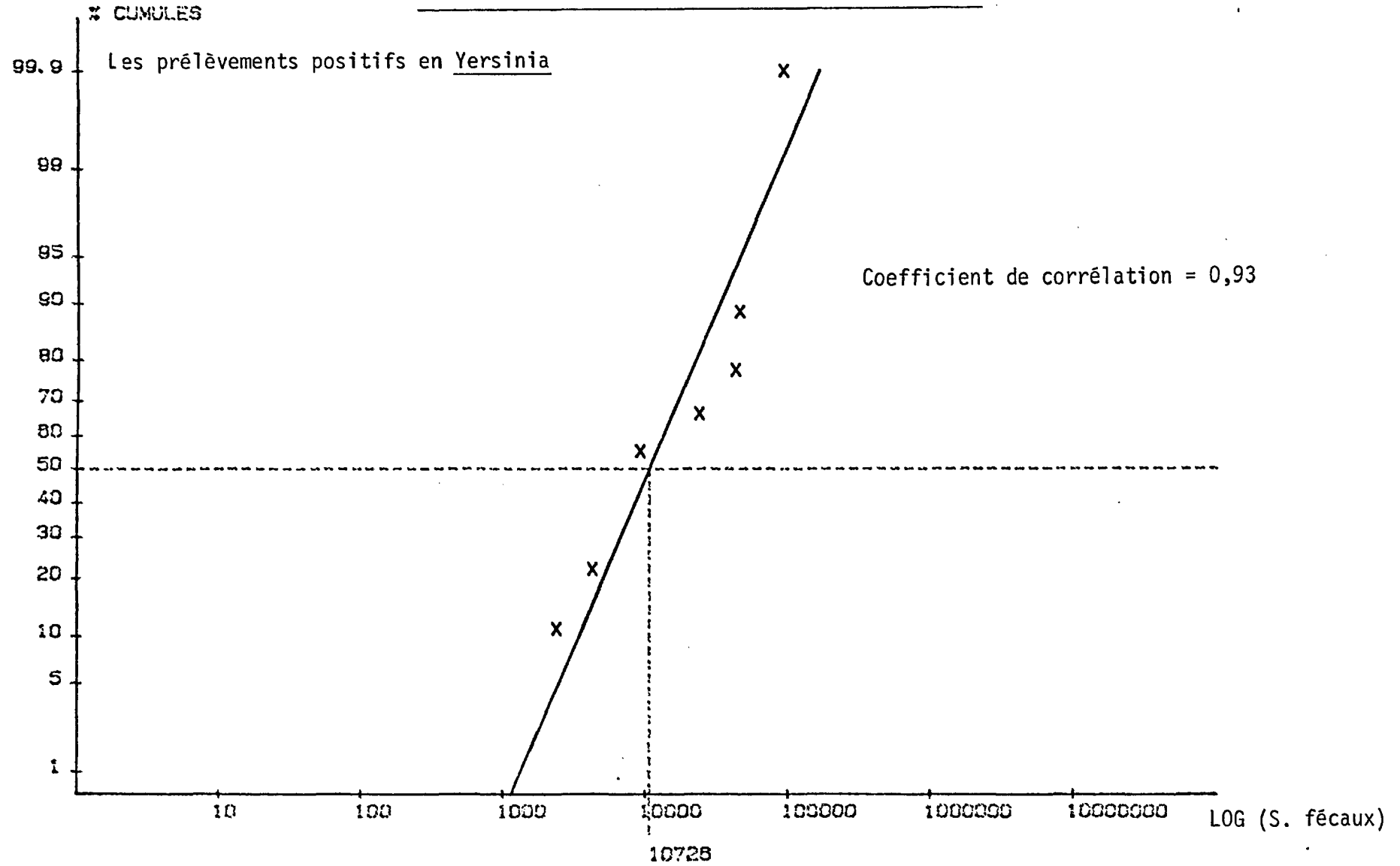


TABLEAU 4

Mois de : NOVEMBRE

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1				
2				
3				
4	1900	5400	<1	<1
5	1100	11500	<1	<1
6				



TABLEAU 5

Mois de :    *DECEMBRE*

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1	1100	12000	< 1	< 1
2	1100	55000	< 1	< 1
3	8000	55000	< 1	< 1
4				
5				
6				

TABLEAU 6

Mois de :      JANVIER

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1				
2				
3				
4	93000	24000	<1	<1
5	4300	9300	<1	<1
6	93000	24000	<u>S. enteritidis</u>	<1

TABLEAU 7

Mois de : FEVRIER

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1	6900	36000	< 1	< 1
2	22500	46000	< 1	<u>Y. enterocoli-</u> <u>tica</u>
3	590	3600	< 1	< 1
4	4600	9300	< 1	<u>Y. enterocoli-</u> <u>tica</u>
5	430	4300	< 1	<u>Y. enterocoli-</u> <u>tica</u>
6	1100000	460000	< 1	< 1

C 1  
S 0:34  
L X0

C 1  
S 0:16  
L X3

C 1  
S 0:6,30  
L Xz

C : chimiotype  
S : sérotype  
L : lysotype

TABLEAU 8

Mois de : MARS

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1	430	2400	< 1	<u>Yersinia</u>
2	4300	9300	< 1	<u>Y. enterocoli- tica</u>
3	4300	9300	< 1	< 1
4	1500	93000	< 1	<u>Yersinia</u>
5	7500	9300	< 1	<u>Y. enterocoli- tica</u>
6	150000	43000	<u>S. typhimurium</u>	<u>Y. frederik- senii</u>

nag  
L Xz

C 1 DNase +  
S 0:36  
L X0

Y. frederiksenii S16 L Xz  
Y. enterocolitica C1 S16 L X0

C 1  
S 0:5  
L Xz

S nag  
L X0

C : chimiotype  
S : sérotype  
L : lysotype  
nag : non-agglutinable

TABLEAU 9

Mois de : MAI

Stations	E. coli	Strepto. féc.	<u>Salmonella</u>	<u>Yersinia</u>
1				
2				
3				
4	2300	1500	<1	<1
5	3900	910	<1	<1
6	24000	24000	<1	<u>Y. frederiksenii</u>

S16 L XO

C : chimiotype  
S : sérotype  
L : lysotype

## DISCUSSION

La teneur en E. coli et streptocoques fécaux dans les moules du littoral Nord / Pas de Calais confirme leur mauvaise qualité bactériologique. Avec une médiane de 4000 E. coli/100 ml de broyat, soit près de 15 fois la norme de salubrité exigée, moins de 5 % des prélèvements respectent cette norme.

Le facteur de concentration des bactéries dans les moules, par rapport à l'eau (médiane calculée à partir des résultats de la DDASS pour les plages situées à proximité du lieu de prélèvement) varie de façon significative avec le germe étudié : il est en moyenne de 20 pour E. coli et de 350 pour les streptocoques fécaux.

Cette concentration préférentielle des streptocoques se retrouve dans tous les sites étudiés et peut-être rapprochée des résultats déjà observés par Delattre ( x 10 pour E. coli et x 150 pour streptocoques fécaux) (4) et par Mazière ( x 30 pour les coliformes dans les huitres) (9).

Différentes explications ont été apportées à cette concentration différentielle. Ainsi Morton (12) évoque l'aspect en amas des streptocoques qui pourrait favoriser leur rétention, alors que Jansen (8) avance l'hypothèse d'une survie différentielle après absorption par le coquillage.

Heureusement, malgré des teneurs élevées en germes indicateurs la présence de Salmonella est assez rare puisque seulement 8,7 % des prélèvements se sont révélés positifs en Salmonella, pourcentage comparable à celui de Andrews (11 %), Hood (7,5 %) et Pellegrino (4 %) (1, 5, 13). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'apport de germes pathogènes par les matières fécales n'est pas constant mais intermittent puisque la présence de Salmonella dans l'environnement maritime (eaux d'égouts, eaux littorales, sédiments, fruits de mer, sable) est intimement liée à la situation endémo-épidémique, au taux de survie des germes et au type de traitement des eaux d'égouts qui constituent une source importante de la contamination.

Une consultation au Centre National de référence des Salmonella (Prof. Le Minor/IPP) nous a permis de constater que 114 souches de Salmonella avaient été isolées en France à partir de coquillages depuis 1980, soit 0,2 % du total des souches de Salmonella répertoriées pour ce Centre.

Durant cette période, les sérotypes les plus fréquemment isolés à partir des coquillages sont : S. senftenberg (20 %), S. infantis (10 %), et S. saint paul (10 %), alors que chez l'homme S. typhimurium (40 %), S. panama (10 %) et S. enteritidis (5 %) dominant.

Il serait vain de chercher à relier ces données et nos résultats. En effet les recherches poursuivies au sein des populations humaines concernent des malades, des convalescents, ou des porteurs sains. Elles rassemblent des souches qui ont manifesté leur présence par des événements cliniques. A l'opposé, les recherches de Salmonella dans les coquillages ne sont que des opérations ponctuelles, limitées dans le temps et l'espace (une ville, quelques points d'un littoral). Inutile même d'espérer isoler assez de Salmonella des moules fraîches pour comparer aux Salmonella isolées en clinique.

En ce qui concerne les Yersinia enterocolitica, les différences entre souches sont de 3 ordres : biochimique d'abord conduisant à l'individualisation de 5 chimiotypes distincts ; antigénique ensuite, avec l'existence de 34 antigènes O ; lysotypique enfin, avec une douzaine de lysotypes principaux et de nombreux sous groupes.

Avec ces trois types de marqueurs on parvient à distinguer :

- d'une part les souches adaptées à un hôte déterminé (homme, porc, lièvre, chinchilla) ils appartiennent aux chimiotypes 2, 3 et 4 et aux groupes sérologiques 0:1, 0:2, 0:3 et 0:9
- et d'autre part les souches "non adaptées", appartenant à tous les autres groupes sérologiques et isolées occasionnellement chez les espèces les plus diverses.

Les souches Y. enterocolitica que nous avons isolées appartiennent toutes au chimiotype 1 et sont non lysotypables. L'examen du tableau n° 10 montre qu'elles sont soit propres à l'homme (lysotype Xo) mais peu ou pas pathogènes et de toutes façons n'entraînant pas de syndromes "classiques" de l'infection à Y. enterocolitica, soit communes à l'homme et à d'autres espèces (lysotype Xz) mais dans ce cas elles restent considérées comme non pathogènes pour l'homme, chez lequel elles n'ont encore été rencontrées que comme saprophytes intestinaux.

Outre Y. enterocolitica nous avons isolé à trois reprises des souches de Y. frederiksenii qui se distinguent par la fermentation du rhamnose.

L'habitat de Y. frederiksenii serait, selon Brenner (3) le milieu hydrique, où elles seraient des composantes normales de la flore aquatique et représenteraient environ 10 % des souches de Yersinia d'origine hydrique. Par contre, nous n'avons pas isolé à partir des coquillages de souches de phénotype 4/0:3/VIII et de phénotype 2/0:9/X3. Cette rareté des souches de Y. enterocolitica responsables des syndromes "classiques" est un fait remarquable déjà observé pour les souches isolées à partir des eaux (10).

On peut supposer que les bactéries incriminées en pathologie humaine qu'il est convenu d'appeler les souches "adaptées", une fois excrétées dans le milieu extérieur ont un temps de survie plus court que les souches indigènes (du fait de pressions biologiques auxquelles ces souches seraient soumises dans le milieu aquatique).

Cependant si les souches incriminées en pathologie humaine n'ont pu être isolées dans les coquillages, la présence d'autres chimiotypes de Y. enterocolitica et d'espèces nouvelles comme Y. frederiksenii, en tant que pathogène potentiel, doit être interprétée avec prudence, le pouvoir pathogène de ces souches ne pouvant encore être évalué.



TABLEAU n° 10

CR. PJO-TYPE	AG. O	LYSC-TYPE	H O T E	SYNDROMES CAUSES	PAYS			
melli- biose O  raffi- nose O  mélibiose + raffinose +  nitrate réductase type a nitrate réductase type b	rhamnose +  indole +  rhamnose O  indole O	(lipase variable)	17 ou N°	X <sub>0</sub>  X <sub>2</sub>	homme  homme micromammifères oiseaux aliments d'origine animale (lait, viande)	porteurs sains et syndromes inhabituels (plaies, abcès, conjonctivite, pharyngite, urines)  porteur sain porteurs sains porteurs sains	Etats-Unis  France Europe Europe	
			variable ou N°	X <sub>2</sub>	eaux poissons homme	porteurs sains surinfection	Norvège, Japon, France Europe France	
			1 10k1 2 13 4 13,7 5 14 6 15 7 16 8	X <sub>2</sub> parfois	micromammifères oiseaux aliments (végétaux)	porteurs sains	Europe	
				X <sub>0</sub>	homme	porteurs sains surinfection septicémie et syndromes inhabituels	France Europe Etats-Unis, France	
			②	9	X <sub>3</sub>	homme  porc	syndromes "classiques": gastro-entérites, syndromes de la F.I.D., polyarthrites, Reiter  porteur sain	Europe Europe (Scandinavie) Europe
			②-③	5,27	X <sub>2</sub> ou X <sub>0</sub>	homme  porc	variables  porteur sain	Canada (Ontario) Canada (Ontario)
			③	1 1,2a 1,2a3	II	chinchilla	lésions "pseudotuberculeuses" (épisooties)	Canada (Ontario) Canada (Ontario) Canada (Ontario)
			④	3	VIII IX b IX a	homme - porc  homme - porc  homme - porc	lésions "pseudotuberculeuses" syndromes de la F.I.D., septicémies  porc : porteur sain	Europe (Amérique du Nord ?)  Europe, Japon, Zaire, Brésil Exclusivement Canada Exclusivement Afrique du Sud**
⑤	2a 2b 3	XI (parfois II)	lièvres	lésions "pseudotuberculeuses" (entérites)	Europe			

Référence (11)

N\* : Souches non-applutinables par les sérums anti O:1 à O:34

## CONCLUSION

Malgré la très mauvaise qualité microbiologique des moules de la région (par rapport aux normes en vigueur) qui a été confirmée lors de cette étude, moins de 10 % des échantillons contenaient les bactéries pathogènes recherchées (Salmonella et Yersinia) et présentaient de ce fait un risque certain pour la santé du consommateur.

Toutefois, cette conclusion optimiste doit être tempérée par plusieurs faits :

- Les contrôles n'ont pas porté sur les coques, ni en période estivale,
- Le pouvoir pathogène de certaines souches de Yersinia trouvées (Y. frederiksenii) n'est pas encore très bien défini,
- L'analyse a été effectuée directement sur le terrain, quelques minutes après la cueillette.

On ne sait actuellement rien sur l'influence du stockage, du transport, du mode de cuisson des coquillages, qui sont sans doute des facteurs importants et qui ne peuvent être négligés. Ces derniers points devraient donc être abordés avant même de songer à entreprendre une enquête épidémiologique proprement dite.

- (1) ANDREWS W.H., DIGGS C.D., PRESNELL M.W., MIESCIER J.J., WILSON C.R., GOODWIN C.P., ADAMS W.N., FURFARI S.A. and MUSSELMAN J.F.  
 "Comparative validity of members of the total coliform and fécal coliform groups for indicating the presence of Salmonella in the eastern oyster, Crassostea virginica".  
 J. Milk Food Technol. ; 1975 ; 38 (8) : 453-456
- (2) AULISIO C.C.G., MEHLMAN I.J., and SANDERS A.C.  
 " Alkali method for rapid recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from foods "  
 Appl. and Env. Microbiol. 1980, 39 (1) : 135-140.
- (3) BRENNER D.J., URSING J., BERCOVIER H., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G., BRAULT J. and MOLLARET H.H..  
 "Y. frederiksenii, a new species of enterobacteriaceae composed of rhamnose positive strains".  
 Current Microbiol., 1980, 4 : 213-217
- (4) DELATTRE J.M. et DELESMONT R.  
 "L'analyse de coquillages peut-elle servir au contrôle microbiologique du littoral ?".  
 Rev. Int. Oceanogr. Hed. 1981, tomes LXIII-LXIV
- (5) HOOD M.A., NESS G.E. and BLAKE N.J.  
 "Relation ship among fecal coliforms, Escherichia coli and Salmonella spp in shelfish".  
 Appl. and Environ. Microbiol., 1983, 45 (1) : 122-126
- (6) ISTPM  
 "Pollution bactérienne des moules et des coques sur le littoral Nord/ Pas de Calais".  
 Rapport de contrat CNEXO 1983.
- (7) ISTPM  
 Communication personnelle.
- (8) JANSEN J.  
 " Hygiène de l'environnement maritime".  
 In Brisou J.F. and DENIS F.A. ed. MASSON 1978 - PARIS.

- (9) MAZIERE J.  
"Contribution à l'étude des coliformes dans les eaux marines et les huitres - application à l'hygiène ostréicole".  
Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 1963, 27 : 3-111
- (10) MELIS R., MOLLARET H.H.  
"Présence de Yersinia enterocolitica dans les eaux - Etat actuel des connaissances".  
Journal Français d'Hydrologie 1981, 12 (35) : 175-186
- (11) MOLLARET H.H.  
"Contribution à l'étude épidémiologique des infections à Yersinia enterocolitica : III bilan provisoire des connaissances".  
Med. et Mal. Infect. 1976, 6 et 10 bis : 422-448
- (12) MORTON B.  
"A new theory of feeding and digestion in filter-feeding".  
Lamellibranchia malacologia, 1972, 14 : 63-79
- (13) PELLEGRINO C., CARLI A., CEVASCO M.P. et SCASSO M.I.  
"The Mytilus galloprovincialis Lamark as an accumulator and indicator of pathogenic telluric micro-organisms in the seawater an improved method for the isolation of the Salmonella sp".  
Rev. Int. Oceanogr. Hed. 1977, XLVII : 155-159

A N N E X E

POINTS DE PRELEVEMENTS

