

NOUVELLE METHODE DE RECHERCHE RAPIDE  
DES SALMONELLES DANS LES BIVALVES



MONFORT P. - BOULBEN S. - LE GAL D. - LE SAUX JC. - RAGUENES P.

46415  
400.1

# IFREMER



Adresse :  
  
IFREMER  
13, rue de Kérose  
29900 CONCARNEAU

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL  
SERVICE  
STATION/LABORATOIRE CONCARNEAU

AUTEUR(S) MONFORT P. - BOULBEN S. - LE GAL D. - LE SAUX JC. - RAGUENES P.		CODE : N° : R. INT. DEL/91.09
TITRE Nouvelle méthode de recherche rapide des salmonelles dans les bivalves.		date : 02/07/1991 tirage nb : 80 Nb pages : 22 Nb figures : 4 Nb photos : 1
CONTRAT (intitulé)  N° _____		DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

**RESUME**

De par leur habitat hydrique et leur mode d'alimentation, les coquillages sont susceptibles d'héberger des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires parmi lesquelles les salmonelloses imposent une vigilance toute particulière.

La technique employée à ce jour ne répondant pas aux exigences de rapidité et simplicité souhaitées par les laboratoires, nous avons testé une nouvelle méthode rapide, associant un pré-enrichissement de courte durée à l'emploi d'une gélose spécifique (milieu de RAMBACH) qui procure une distinction tinctoriale des colonies de salmonelles.

Les résultats mettent en évidence les imperfections de la méthode traditionnelle (16% de faux négatifs) dans l'isolement du pathogène pour l'aliment considéré. Ils font ressortir l'intérêt d'y substituer le nouveau protocole (3,1% de faux négatifs) dont les avantages de simplicité, rapidité et fiabilité compensent largement le léger désagrément de la technique à savoir un repiquage en milieu sélectif après 6 à 8 heures d'incubation.

La gélose Rambach, élément clef de ce gain de temps entre le prélèvement et le diagnostic, s'avère un outil bactériologique performant en raison des faibles taux de faux positifs (0% dans notre étude) et faux négatifs (1 à 2% selon son auteur) engendrés par des souches atypiques

**mots-clés :** Salmonelles, bivalves, techniques, pathogènes.

**key words :**

© IFREMER - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer 1991



I - INTRODUCTION

II - MATERIEL ET METHODES

II.1 - ECHANTILLONNAGE

II.2 - PROTOCOLES ANALYTIQUES

II.3 - ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

III - RESULTATS

IV - DISCUSSION

V - CONCLUSION

VI - BIBLIOGRAPHIE

VII - ANNEXES

VII.1 - CYCLE DE CONTAMINATION DES SALMONELLES

VII.2 - TECHNIQUE CLASSIQUE - PROTOCOLE ANALYTIQUE

VII.3 - MILIEU DE RAPPAPORT-VASSILIADIS (R 10)

VII.4 - AGAR LACTOSE SACCHAROSE VERT BRILLANT ROUGE DE PHENOL

VII.5 - TECHNIQUE RAPIDE - PROTOCOLE ANALYTIQUE

VII.6 - MILIEU SALMO SYST

VII.7 - GELOSE RAMBACH

VII.8 - CROISSANCE DES SALMONELLES SUR MILIEU DE RAPPAPORT

## I - INTRODUCTION

Malgré l'amélioration notable des conditions d'hygiène dans le domaine alimentaire, l'incidence des toxico-infections alimentaires (T.I.A.) et en particulier des salmonelloses ne cesse de s'affirmer sur le territoire national (17285 souches isolées chez l'homme en 1989, 5702 malades dont 23 décès), constituant la préoccupation majeure des hygiénistes.

La recherche et l'identification des salmonelles en bactériologie conchylicole s'accroissent mal de la méthode normalisée en raison de la lourdeur analytique compréhensible en cas d'expertise mais inapplicable pour une mise en routine dans le cadre d'un suivi permanent des zones de production. Indépendamment de l'incidence financière, les délais imposés par cette technique entre le prélèvement et l'obtention du résultat ne permettent pas une intervention efficace du laboratoire et n'autorise nullement une gestion optimale des prélèvements en cas de problèmes sanitaires majeurs.

S'il paraît vain de penser éradiquer les salmonelles de notre environnement du fait de la multiplicité des circuits de dissémination (annexe 1), du moins devons nous en limiter l'impact tant sanitaire qu'économique par une maîtrise des procédés technologiques ainsi que l'utilisation de méthodes simples, fiables et rapides d'identification des germes.

Récemment, différentes techniques sont apparues sur le marché telles que la détection immunoenzymatique, les tests d'agglutination, l'impédance-métrie, les sondes nucléiques, la radiométrie voire l'emploi de bactériophages. Celles-ci ne semblent pas pour l'instant apporter toutes les garanties d'efficacité ou présenter suffisamment de facilité d'emploi pour une recherche systématique au sein des laboratoires.

Aussi, nous nous sommes intéressés à l'évaluation d'une méthode rapide de recherche de cette entérobactérie se référant aux techniques bactériologiques classiques. Cet abaissement du temps de réponse est le résultat conjugué d'un court pré-enrichissement associé à l'emploi d'une gélose spécifique, le milieu de RAMBACH. En effet, les milieux d'isolement commercialisés à ce jour ne présentent pas de distinction tinctoriale des colonies de salmonelles permettant de les repérer facilement, ce qui implique une confirmation biochimique des colonies suspectes. L'innovation de ce produit réside dans le dépistage présomptif des salmonelles en les différenciant des autres entérobactéries grâce à un caractère phénotypique propre, l'utilisation du propylène glycol avec formation d'acide.

## II - MATERIEL ET METHODES

### II.1 - ECHANTILLONNAGE

L'évaluation de cette nouvelle technique s'est effectuée sur des échantillons de coquillages (moules, huîtres et coques) issus de l'ensemble des zones conchylicoles du Finistère. Cette approche a pour objectif de ne pas s'intéresser exclusivement à un site fortement contaminé et corrélativement d'apprécier l'efficacité de cette méthode dans diverses situations.

### II.2 - PROTOCOLES ANALYTIQUES

La chair et le liquide intervalvaire des mollusques sont recueillis et pesés (>50g) dans un bol broyeur de type waring blender. Après une dilution au 1/3 à l'aide d'un mélange tryptone - sel, l'échantillon est broyé pendant 30 à 40 secondes à 15000t/mn.

#### II.2.1 Méthode classique

La technique de recherche et d'identification des salmonelles par la méthode classique (90 heures - annexe 2) a été légèrement allégée afin de permettre une multiplication du nombre d'analyses. Après un pré-enrichissement de 16 à 18 heures à 37°C en eau peptonée tamponnée, on opère un transfert sur deux tubes contenant un milieu sélectif, le bouillon de Rappaport modifié par Vassiliadis (annexe 3); l'un de ceux-ci est incubé à l'étuve 24 heures à 37°C, l'autre à 42°C pendant une durée identique. L'étape suivante consiste en un isolement sur une gélose au vert brillant rouge de phénol (annexe 4), incubée à 37°C pendant 24 heures. L'appartenance des colonies caractéristiques, c'est à dire de couleur rose, rondes, bombées, au genre *Salmonella* se vérifie au moyen de tests biochimiques sur galerie API 20E. Ensuite, les souches de salmonelles sont soumises au sérotypage pour une identification complète. Cette ultime opération a été menée en collaboration avec Mr Guirriec, responsable du laboratoire de l'hôpital à Concarneau.

#### II.2.2 Méthode rapide

Ce nouveau protocole (72 - 78 heures - annexe 5) comporte un pré-enrichissement en bouillon salmosyst (Annexe 6) étuvé à 37°C pendant 6 à 8 heures. La seconde étape consiste en l'adjonction d'un comprimé sélectif (Annexe 6) à 10 ml de pré-enrichissement puis l'incubation des tubes à l'étuve soit à 37°C soit à 42°C pendant 18 à 22 heures. Enfin, un isolement sur la gélose RAMBACH permet une distinction tinctoriale des colonies de salmonelles à partir de 17 heures d'incubation à 37°C (Annexe 7). La confirmation au genre de ces dernières (rouge fuschia) est assurée sur galerie API 20E puis complétée par le sérotypage des souches.

### II.3 - ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Le traitement statistique appliqué dans notre cas se réfèrera à la comparaison des pourcentages de séries appariées (application des deux techniques sur le même échantillon). On montre qu'il faut ici faire abstraction des paires de réponses concordantes qui n'apportent aucun élément à la question de savoir quelle est la meilleure méthode (classique : A - rapide : B).

On examinera donc si les effectifs (A+, B-) et (A-, B+) sont compatibles avec l'hypothèse nulle (H0) d'équivalence des techniques (tableau 3). A cette fin, on observe si A diffère de B en formant l'écart réduit  $|\Sigma| = |A-B| / \sqrt{A+B}$

Si  $|\Sigma| < 1.96$  les pourcentages ne diffèrent pas significativement et les méthodes sont jugées comparables.

Si  $|\Sigma| \geq 1.96$  les pourcentages diffèrent de manière significative et le risque correspondant à  $|\Sigma|$  lu dans la table de l'écart réduit fixe le degré de signification.

On soulignera que ce traitement n'est applicable que si le nombre de paires considérées est supérieur ou égal à 10.

## III - RESULTATS

TABLEAU 1 : RESULTATS DES ECHANTILLONS ANALYSES

ESPECES	T. CLASSIQUE		T. RAPIDE	
	37°C	42°C	37°C	42°C
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	S. TYPHIMURIUM	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	S. PANAMA	S. PANAMA
COQUES	absence	absence	S. PANAMA	S. PANAMA
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
MOULES	S. BREDENEY	S. BREDENEY	S. BREDENEY	S. BREDENEY
MOULES	absence	absence	absence	absence
OLIVES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	S. BREDENEY	S. BREDENEY
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence

ESPECES	T. CLASSIQUE		T. RAPIDE	
	37°C	42°C	37°C	42°C
COQUES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	absence	absence
H CREUSES	absence	absence	S. TAKSONY	S. TAKSONY
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	S. BREDENEY	absence	S. BREDENEY
COQUES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	S. BREDENEY	S. BREDENEY	S. BREDENEY
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	S. BREDENEY	S. BREDENEY	S. BREDENEY
MOULES	absence	absence	S. PANAMA	S. PANAMA
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	S. PANAMA	S. PANAMA	S. PANAMA
MOULES	S. AGONA	S. AGONA	S. AGONA	S. AGONA
MOULES	S. AGONA	S. AGONA	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	S. INDIANA	S. INDIANA
MOULES	S. ST PAUL	S. ST PAUL	S. ST PAUL	S. ST PAUL
MOULES	absence	absence	absence	absence
MOULES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	S. LILLE	S. LILLE	S. LILLE
MOULES	absence	S. PANAMA	S. PANAMA	S. PANAMA
MOULES	absence	S. SCHWARZ (1)	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	absence	absence
COQUES	absence	absence	S. BREDENEY	S. BREDENEY
COQUES	absence	S. BREDENEY	S. BREDENEY	S. BREDENEY
MOULES	absence	absence	S. MELEAGRIDIS	S. MELEAGRIDIS
MOULES	absence	absence	S. BRANDENBURG	S. BRANDENBURG
H. CREUSES	absence	absence	absence	absence
H. CREUSES	absence	absence	S. PANAMA	S. PANAMA
MOULES	absence	absence	absence	absence

(1) - S. SCHWARZENGRUND

TABLEAU 2 : POURCENTAGE DE RECHERCHES POSITIVES

	Nombre de recherches	Nombre de positifs	Pourcentage positif (%)
T.CLASSIQUE - A	87	12	13.8
T.RAPIDE - B	87	22	25.3

TABLEAU 3 : TEST STATISTIQUE DE COMPARAISON DES METHODES

T.CLASSIQUE (A)	T.RAPIDE (B)	EFFECTIFS
-	-	63
+	-	2
-	+	12
+	+	10

$$\Sigma = |2 - 12| / \sqrt{2 + 12} = 2.67$$

$$2.67 > 1.96$$

LES TECHNIQUES DIFFERENT SIGNIFICATIVEMENT

TABLEAU 4 : EVALUATION DES FAUX POSITIFS SUR GELOSES

	COLONIES SUSPECTES	SALMONELLES CONFIRMÉES	SUSPECTS NEGATIFS (%)
T.CLASSIQUE - A	21	12	9 (43%)
T.RAPIDE - B	22	22	0 (0%)

**TABLEAU 5 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION SUR L'ISOLEMENT DES SALMONELLES - MILIEU RAPPAPORT**

37° C	42° C	EFFECTIFS
+	+	4
-	+	8
+	-	0

**TABLEAU 6 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION SUR L'ISOLEMENT DES SALMONELLES - MILIEU SALMOYSYST**

37° C	42° C	EFFECTIFS
+	+	19
-	+	1
+	-	2

#### IV - DISCUSSION

Cette étude initiée pour évaluer la fiabilité d'une technique rapide de recherche des salmonelles dans les coquillages a permis également de mieux appréhender les facteurs limitants de la méthode classique.

Les résultats portant sur l'analyse de 87 échantillons de bivalves provenant des différents sites conchylicoles du Finistère nous montrent un pourcentage de recherches positives très contrasté entre la technique en vigueur d'une part (13.8 %) et le nouveau protocole d'autre part (25.3 %) (tableau 2). Cette observation préliminaire est corroborée par l'analyse statistique des données (tableau 3). En effet, ces dernières fournissent un écart réduit  $|\Sigma|$  égal à 2,67 induisant une différence significative entre les deux méthodes au seuil de 1 %.

Ces chiffres soulignent également une relation entre les deux techniques puisque pour un même échantillon les chances de succès par la nouvelle méthode (B) quand (A) réussie équivaut à 83.3% (10/12). Ils apportent enfin une information précieuse en matière de méthodologie à savoir le pourcentage de faux négatifs qui mesure la fiabilité d'une technique microbiologique. Les valeurs de 16% (12/75 - faux négatifs/total des négatifs - rapport recommandé par l'A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists) pour la méthode classique et 3.1% (2/65) pour la méthode rapide laissent peu de doute sur l'intérêt de substituer cette dernière au protocole préconisé aujourd'hui.

Dans le cadre du suivi bactériologique des zones conchylicoles, les atouts analytiques à prendre en considération demeurent l'obtention rapide du résultat ainsi que l'allègement de la méthode, facteurs qui ne doivent cependant pas interférer de manière significative avec l'objectif premier, l'efficacité.

Sur ce point, le tableau 5 laisse apparaître que l'on peut faire abstraction de la culture à 37°C sur Rappaport (R 10) qui se révèle d'une piètre efficacité (4/12). Cette valeur confirme les observations recueillies depuis 1988 au laboratoire où 95% des souches de salmonelles ont été isolées à 42°C. Ces constatations concordent parfaitement avec Vassiliadis (1983) qui enregistre une meilleure performance du milieu à 43°C qu'à 37°C et préconise une formule spécifique à cette seconde température (R 25). Peterz (1989) quant à lui a enregistré des variations importantes dans la réponse du bouillon de Rappaport-Vassiliadis en fonction de la température d'incubation de même que de la concentration en chlorure de magnésium ( $MgCl_2, 6H_2O$ ). Ainsi à une concentration donnée en  $MgCl_2$  le nombre des salmonelles incubés 24 h décroît d'une puissance de 10 quand on augmente la température d'1°C. De même, à une température donnée le nombre de salmonelles chute d'1/2 log quand la concentration en  $MgCl_2$  s'accroît de 1g/l (annexe 8). A ce sujet on remarquera que selon l'origine des fabrications (BIOKAR, DIFCO, MERCK, OXOID) la concentration de ce composé varie dans des proportions considérables (17 à 40 g/l).

La technique rapide quant à elle (tableau 6) fait ressortir une homogénéité des résultats dans l'isolement du pathogène, indé-

pendamment de la température d'étuvage du milieu sélectif (20/22 à 42°C - 21/22 à 37°C). Au vu de ces données, on peut raisonnablement envisager une culture sélective unique à 41,5°C, température qui présenterait l'avantage non négligeable par rapport à 37°C de limiter le développement de la flore secondaire indésirable et corrélativement d'accélérer l'apparition de la couleur spécifique des colonies. En effet, nous avons parfois observé à cette dernière température l'apparition tardive de la couleur caractéristique des colonies de salmonelles (>24 h) en présence d'une flore secondaire abondante.

Cette supériorité supposé du bouillon sélectif salmo-syst (composition identique au tetrathionate de Muller-Kauffmann-MK) comparé au milieu de Rappaport-Vassiliadis va à l'encontre des résultats obtenus par certains auteurs (Vassiliadis 1983, Rhodes 1986, Beckers 1987). A l'opposé Patil (1986) souligne que l'efficacité des milieux d'enrichissement varie selon la nature de la flore annexe. Il remarque une inhibition plus forte des Proteus, Pseudomonas et Citrobacter par le R10 alors que le MK se révélerait plus performant contre E.coli et Enterobacter. Il note aussi une toxicité accentuée du R10 vis à vis des salmonelles stressées ou présentes en faible quantité. Van schothorst (1987) apporte également quelques limites à ce dernier milieu en évoquant qu'une proportion trop élevée de bactéries secondaires compromet fortement la mise en évidence des salmonelles.

On émettra également l'hypothèse que la conjonction de différents paramètres (concentration en MgCl<sub>2</sub> du R10, phase de pré-enrichissement trop longue de la technique classique, importance de l'inoculum) puisse être à l'origine de l'efficacité limitée de la méthode traditionnelle.

L'obtention rapide du diagnostic par le nouveau protocole réside pour l'essentiel dans l'emploi d'une gélose, le milieu de Rambach qui produit une distinction tinctoriale des colonies de salmonelles spp. L'absence de faux positifs (tableau 4) fait apparaître son réel intérêt par rapport aux géloses traditionnelles à savoir la possibilité de s'affranchir de la phase d'identification biochimique et ainsi estimer la présence de salmonelles sur un site 45 à 53 h après le début de l'analyse. En ce qui concerne les faux négatifs, l'auteur estime le taux des souches ne répondant pas favorablement au caractère propylène glycol à 1 ou 2%. Ce pourcentage ne concerne nullement des sérotypes spécifiques mais résulte de la présence de souches atypiques ayant perdu certains caractères.

Salmonella Typhi et Salmonella Arizonae qui se singularisent du point de vue biochimique par rapport aux sérotypes spp ne prennent pas cette coloration rouge vif caractéristique (tableau 7). Néanmoins, on notera qu'aucun milieu ne donne satisfaction sur ce plan et qu'en l'occurrence les souches humaines ont essentiellement pour origine des cas importés. L'imperfection toute relative de cette gélose ne saurait être toutefois un obstacle à son utilisation au regard des multiples avantages qu'elle procure.

TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES TINCTORIALES DE QUELQUES COLONIES SUR RAMBACH

<b>SALMONELLA SPP.</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie rouge vif</li><li>- Bord translucide régulier</li><li>- Diamètre 2 à 2.5 mm</li></ul>
<b>SALMONELLA TYPHI</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie orange pâle</li><li>- Halo translucide</li><li>- Diamètre 1 à 1.5 mm</li></ul>
<b>SALMONELLA ARIZONAE</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie violette à centre bordeau</li><li>- Diamètre 1.5 à 2 mm</li><li>- Gélose bleutée autour de la colonie</li></ul>
<b>E. COLI</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie de couleur bleu-vert</li><li>- Diamètre 2 à 2.5 mm</li><li>- Gélose se teintant en bleu-vert autour de la colonie</li></ul>
<b>PROTEUS MIRABILIS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie jaunâtre</li><li>- Halo translucide</li><li>- Diamètre environ 2 mm</li></ul>
<b>PROVIDENCIA STUARTII</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie saumon</li><li>- Diamètre 1.5 à 2 mm</li></ul>
<b>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Colonie violette luxuriante</li><li>- Diamètre 2.5 à 3 mm</li></ul>

**AEROMONAS HYDROPHILA**

- Colonie de couleur vert foncé
- Diamètre 2.5 à 3 mm
- Halo translucide autour de la colonie

**CITROBACTER FREUNDII**

- Colonie de couleur bordeau à centre gris foncé
- Diamètre 2 à 3 mm
- Halo bleuté autour de la colonie

## V - CONCLUSION

Cette étude souligne les limites de la méthode classique pour la recherche des salmonelles dans les coquillages (50 % des souches isolées par cette technique contre 92% par la technique rapide), vraisemblablement inhérentes à la spécificité de l'aliment testé, à l'insuffisance du bouillon sélectif voire au protocole analytique lui-même (durée du pré-enrichissement trop long).

Malgré l'inconvénient que constitue un repiquage après 6 à 8 heures d'incubation, la substitution de la nouvelle technique à la méthode actuelle présente de multiples avantages de par sa rapidité (résultat possible dès 45 h de culture), sa simplicité et surtout sa fiabilité.

La gélose RAMBACH s'est révélée un outil fort intéressant que l'on suggèrera également en remplacement du milieu au vert brillant rouge de phénol de la technique usuelle. Elle assure un diagnostic immédiat de la présence de salmonelles (absence de faux positifs) ainsi qu'un gain de temps lié à une diminution du nombre de galeries d'identification à mettre en oeuvre.

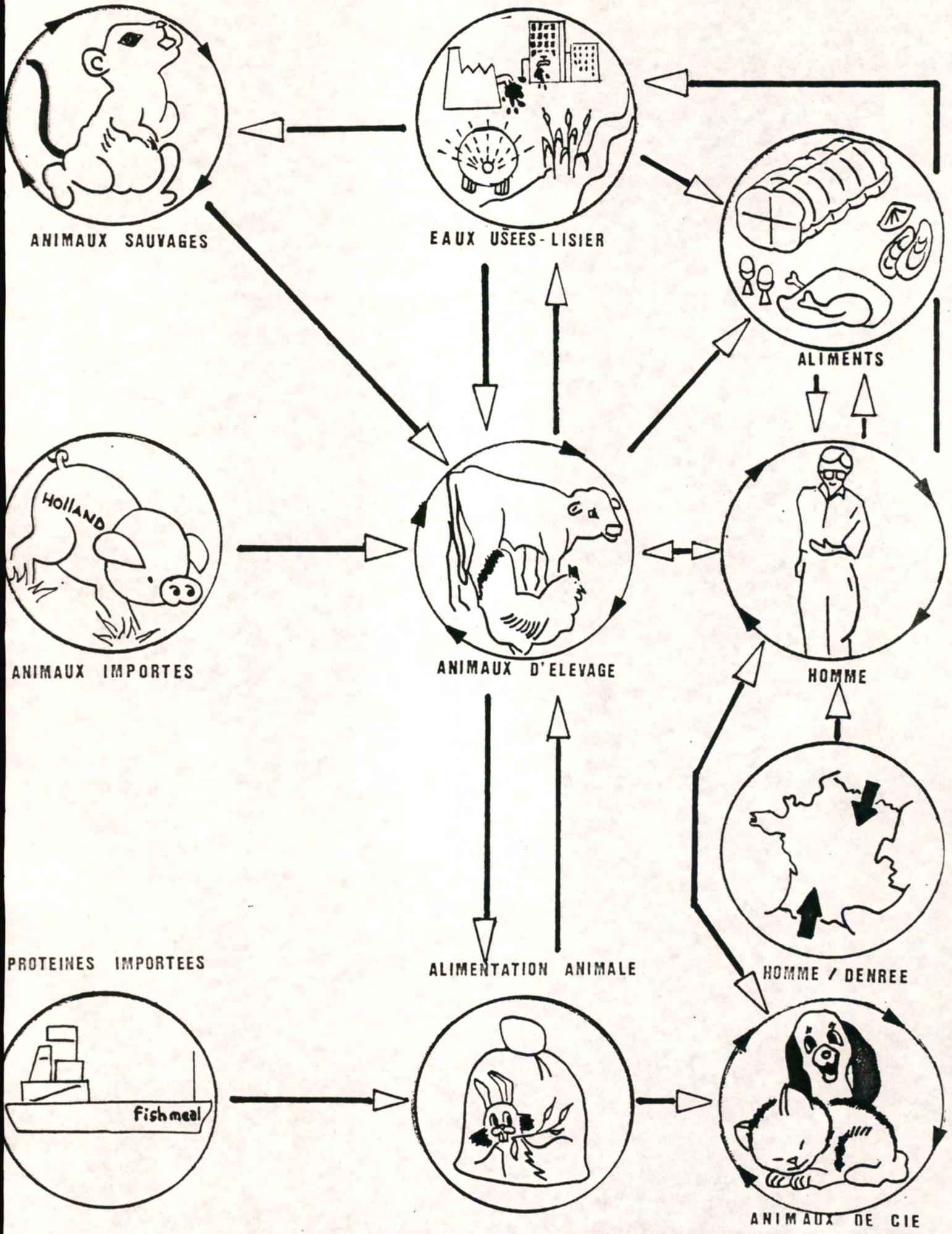
Dans l'attente d'autres techniques compétitives, cette méthodologie devrait permettre d'apporter une réponse aux préoccupations essentielles des laboratoires chargés du suivi sanitaire des zones conchylicoles. Celle - ci ne saurait toutefois rester figée et quelques essais pourraient être menés afin de cerner les causes de cette efficacité et d'évaluer les améliorations potentielles.

VI - BIBLIOGRAPHIE

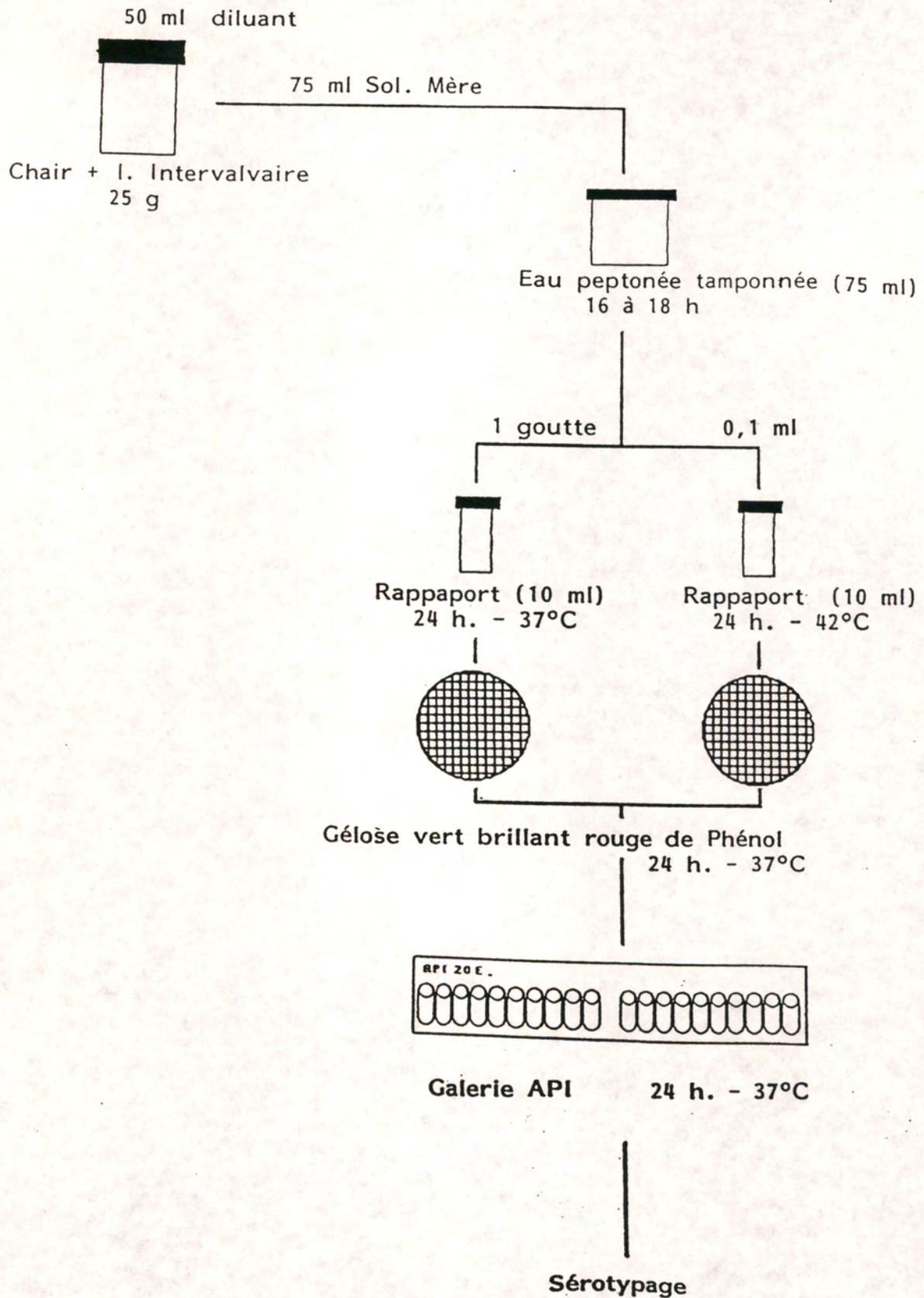
- 1 - BECKERS H.J. ROBERTS P. PIETZSCH O. VAN SCHOTHORST M.  
VASSILIADIS P. et KAMPELMACHER P. - 1987  
Replacement of Muller Kauffmann'tetrathionate brilliant green  
bile broth by Rappaport Vassiliadis magnesium chloride  
malachite green broth in the standard method for the detection  
of salmonellae.  
Int. J. Food Microbiol.,4,59 - 64
- 2 - HARVEY R.W.S. et PRICE T.H. - 1979  
Principles of salmonella isolation : a review  
J. Appl.Bacteriol.,46,27 - 56
- 3 - KALAPOTHAKI V. TRICHOPOULOS D. PAPADAKIS J. MAVROMMATI CH. et  
VASSILIADIS P. - 1986  
A comparison of the efficiency of two forms of Rappaport  
Vassiliadis enrichment medium  
Int. J. Food Microbiol.,3,89 - 97
- 4 - MORINIGO M.A. BORREGO J.J. et ROMERO P. - 1986  
Comparative study of different methods for detection and  
enumeration of salmonella spp.in natural waters.  
J. Appl.Bacteriol.,61,169 - 176
- 5 - PATIL M.D. et PARHAD N.M. - 1986  
Growth of salmonellas in different enrichment media.  
J. Appl.Bacteriol.,61,19 - 24
- 6 - PETERZ M. WIBERG C. et NORBERG P. - 1989  
The effect of incubation t° and magnesium chloride  
concentration on growth of salmonella in home-made and in  
commercially available deshydrated Rappaport-Vassiliadis  
broths.  
J. Appl. Bacteriol.,66,523 - 528
- 7 - RAMBACH A. - 1990  
New plate medium for facilitated differenciation of salmonella  
spp. from proteus and other enteric bacteria.  
Appl.Environ.Microbiol.,56,1, 301 - 303
- 8 - RHODES P. et QUESNEL L.B. - 1986  
Comparison of Muller-Kauffmann tetrathionate broth with  
Rappaport-Vassiliadis medium for the isolation of salmonellas  
from sewage sludge.  
J. Appl. Bacteriol.,60,161 - 167
- 9 - SCHWARTZ D. - 1963  
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes  
Flammarion - Médecine-science
- 10- VAN SCHOTHORST M. et RENAUD A.M. - 1983  
Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's  
medium(R10)  
J. Appl. Bacteriol.,54,209 - 215

- 11 - VAN SCHOTHORST M. RENAUD A.M. et VAN BEEK C - 1987  
Salmonella isolation using RVS broth and MLCB agar.  
Food Microbiol., 4, 11 - 18
- 12 - VASSILIADIS P. PATERAKI E. PAPAICONOMOV N. PAPADAKIS J. et  
TRICHOPOULOS D. - 1976  
Nouveau procédé d'enrichissement des salmonelles  
Ann.Microbiol.Inst.Pasteur., 127b, 195 - 200
- 13 - VASSILIADIS P. KALAPOTHAKI V. TRICHOPOULOS D. - 1981  
Improved isolation of salmonellae from naturally contaminated  
meat products by using Rappaport-Vassiliadis enrichment broth.  
Appl.Environ.Microbiol., 42, 4, 615 - 618
- 14 - VASSILIADIS P. 1983  
The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the  
isolation of salmonellas : an overview.  
J. Appl.Bacteriol., 54, 69 - 76

**ANNEXE 1 : CYCLE DE TRANSMISSION DES SALMONELLES**



**ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE RECHERCHE ET  
D'IDENTIFICATION DES SALMONELLES  
(METHODE CLASSIQUE)**



ANNEXE 3 : MILIEU SELECTIF  
RAPPAPORT-VASSILIADIS

COMPOSITION

- PEPTONE DE CASEINE.....	4.0 g
- PEPTONE DE FARINE DE SOJA.....	1.0 g
- CHLORURE DE MAGNESIUM.....	36.0 g
- CHLORURE DE SODIUM.....	8.0 g
- DI-POTASSIUM HYDROGENOPHOSPHATE.....	0.4 g
- DIHYDROPHOSPHATE DE SODIUM.....	0.6 g
- VERT DE MALACHITE.....	0.036 g
- H2O.....	1000 ml

MODE D'ACTION

Par rapport au bouillon d'enrichissement des salmonelles selon RAPPAPORT, la concentration en vert de malachite a été réduite dans ce milieu. Une meilleure croissance des salmonelles a ainsi été obtenue. Le même but a été poursuivi par l'addition de peptone de farine de soja. La diminution de la valeur du pH à 5.5 améliore la sélectivité.

ANNEXE 4 : **AGAR LACTOSE SACCHAROSE  
VERT BRILLANT ROUGE DE PHENOL**

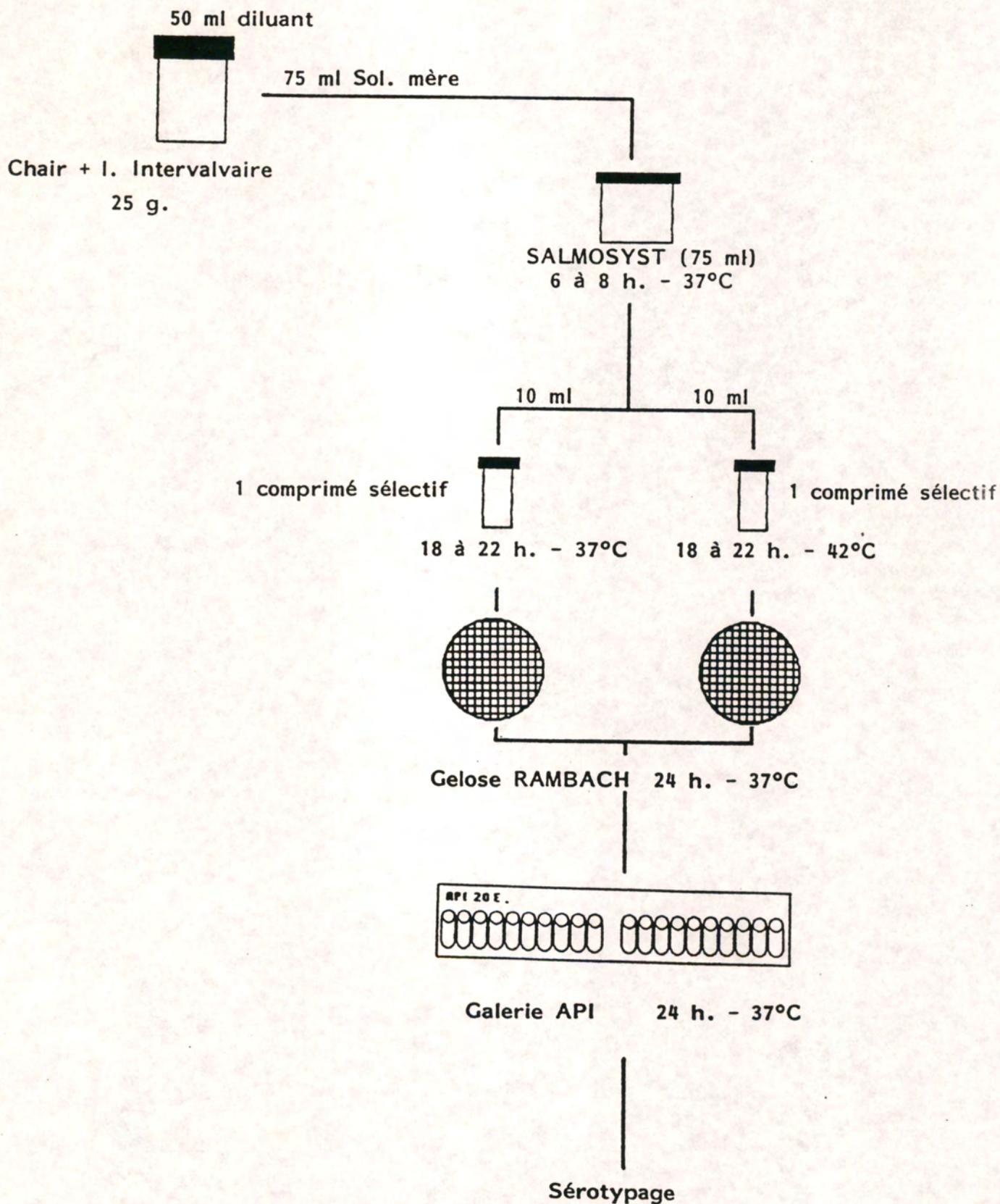
COMPOSITION

- PEPTONE DE CASEINE.....	5.0 g
- PEPTONE DE VIANDE.....	5.0 g
- EXTRAIT DE LEVURE.....	3.0 g
- LACTOSE.....	10.0 g
- SACCHAROSE.....	10.0 g
- CHLORURE DE SODIUM.....	5.0 g
- ROUGE DE PHENOL.....	0.08 g
- VERT BRILLANT.....	0.0125 g
- AGAR AGAR.....	13.0 g
- H2O.....	1000 ml

MODE D'ACTION

Une bonne croissance des salmonelles est assurée par une base riche; le vert brillant contribue à l'inhibition de la flore secondaire indésirable. Les salmonelles ne peuvent fermenter ni le lactose ni le saccharose. Ces sucres présents dans le milieu permettent l'identification des microorganismes faiblement lactose positifs ou négatifs et saccharose positifs (Colonies roses : salmonelles et autres - Colonies jaunes : E.Coli, Proteus Vulgaris, Klebsiella, etc...).

**ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE RECHERCHE ET  
D'IDENTIFICATION DES SALMONELLES  
(METHODE RAPIDE)**



**ANNEXE 6 : BOUILLON SALMOSEYST****COMPOSITION BOUILLON DE BASE**

- PEPTONE DE CASEINE.....	5.0 g
- PEPTONE DE VIANDE.....	5.0 g
- CHLORURE DE SODIUM.....	5.0 g
- CARBONATE DE CALCIUM.....	10.0 g
- H2O.....	1000 ml

**COMPOSITION DU COMPRIME SELECTIF**

- TETRATHIONATE DE POTASSIUM.....	0.2 g
- BILE DE BOEUF.....	0.08 g
- VERT BRILLANT.....	0.007g
- CARBONATE DE CALCIUM.....	0.1 g

**MODE D'ACTION**

Un enrichissement non sélectif dans le bouillon de base assure une croissance optimale des microorganismes contenus dans l'échantillon. Après l'addition du composé sélectif, la flore secondaire est inhibée par le tétrathionate, le vert brillant et la bile de boeuf alors que les salmonelles continuent à se développer. Les sous-produits acides de la dégradation des composés sont neutralisés par le carbonate de calcium.

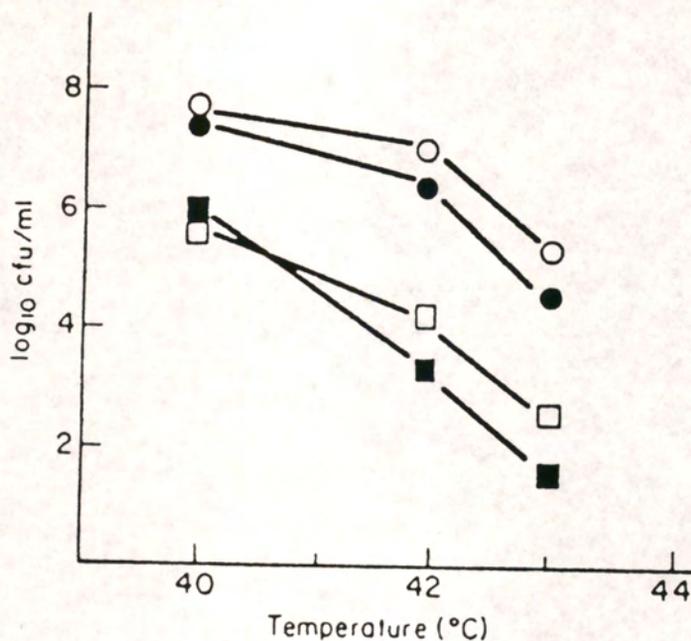
**ANNEXE 7 : GELOSE RAMBACH****COMPOSITION**

- PROPYLENE GLYCOL.....	10	g
- PEPTONE.....	5	g
- EXTRAIT DE LEVURE.....	3	g
- DESOXYCHOLATE DE SODIUM.....	1	g
- ROUGE NEUTRE.....	0.03	g
- 5BROMO 4 CHLORO 3 INDOLYL βGALACTOPYRANOSIDE.....	1.5	g
- AGAR.....	20	g
- H2O.....	1000	ml

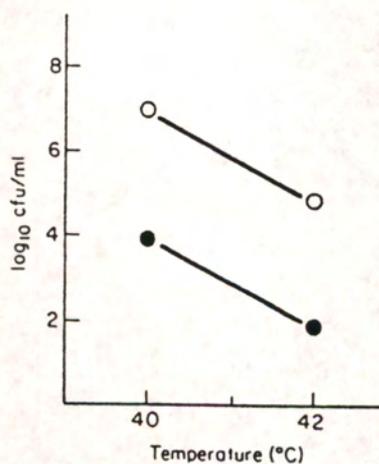
**MODE D'ACTION**

La distinction tinctoriale des salmonelles est basée sur l'utilisation d'un caractère biochimique nouveau, la dégradation du propylène glycol en acide qui provoque un virage au rouge vif des colonies suspectes par précipitation du rouge neutre. Les bactéries utilisant le lactose sont identifiées par la production d'un composé chromogène, indicateur de la présence d'une enzyme la βgalactosidase à partir de l'indolyl βgalactopyranoside. Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore secondaire.

**ANNEXE 8 : INCIDENCE DE LA T° & LA TENEUR  
EN MgCl<sub>2</sub> SUR LA CROISSANCE  
DES SALMONELLES SUR R10-PETERZ**



Mean numbers of salmonellas ( $n = 17$ ) in commercially available and home-made Rappaport-Vassiliadis broths incubated at 40, 42 and 43°C for 24 h. ○, home-made; ●, Merck; □, Oxoid; ■, lab m.



**Fig. 3.** Mean numbers of salmonellas (*Salmonella typhimurium*  $n = 2$  and *Salmonella dublin*  $n = 2$ ) after incubation at 40 and 42°C for 24 h in lab m Rappaport-Vassiliadis broth with two concentrations of  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . ○, 31.1 g/l; ●, 34.6 g/l.