

COMPARAISON DE MILIEUX DE CULTURE POUR LA RECHERCHE BACTERIOLOGIQUE DE *SALMONELLA* DANS LA FILIERE AVICOLE

Humbert Florence¹, Morvan H.², Lalande Françoise¹ et Colin P.¹

¹CNEVA - Beaucemaine - B.P.53 - 22440 Ploufragan

²LDA 22 - 3, Rue du Sabot B.P.54 - 22440 Ploufragan

Résumé

A la suite de la parution de la directive CEE 92/117 (Zoonose), il est apparu important de réaliser une étude sur l'efficacité et la sensibilité comparées de plusieurs associations entre les milieux d'enrichissement et ceux d'isolement utilisés lors de la recherche de *Salmonella* dans les prélèvements décrits par cette directive (élevages, couvoirs). 314 prélèvements ont été analysés après un même pré-enrichissement en comparant 6 milieux d'enrichissement et 3 milieux d'isolement ; 40 échantillons (12,7 %) se sont révélés positifs par l'une ou l'autre des associations de milieux employées. Les résultats comparés statistiquement par la méthode du χ^2 montrent nettement l'avantage de l'utilisation du milieu au Tétrathionate de Müller Kauffmann pour l'enrichissement, alors que les différences concernant les trois milieux d'isolement testés sont parfois significatives, mais moins importantes.

Abstract

341 naturally contaminated samples from poultry environment were pre-enriched in Buffered Peptone Water and different associations enrichment-isolation media were compared for their efficacy to detect *Salmonella*. Six enrichment media (three formulations of Tetrathionate broth, two of Rappaport-Vassiliadis and one of Selenite-Cystine) and three isolation media (Rambach agar, SM-ID (*Salmonella* Identification) and XLT4 (Xylose Lysine Tergitol 4)) were combined so that each sample gave 18 results. 40 samples (12,7%) gave one or more positive result using these 18 associations.

Statistical analysis of the results demonstrated the advantage of Tetrathionate broths over Rappaport-Vassiliadis to detect *Salmonella* in such samples. Concerning isolation media, results were not so clear and connected to the enrichment media used.

Introduction

Depuis le début de l'augmentation régulière des toxi-infections alimentaires collectives à *Salmonella* Enteritidis (Lombard I. *et al.*, 1993), nos connaissances sur l'épidémiologie des salmonelles dans les parquets de volailles et les couvoirs se sont étoffées. Ainsi, il est apparu que la condition essentielle (mais non suffisante) pour obtenir un parquet de pondeuses, qu'elles soient reproductrices ou fournissant des oeufs de consommation, exemptes de salmonelles, est la mise en place d'animaux de 1 jour n'ayant jamais eu aucun contact avec des salmonelles (couvoir ou parents) dans un bâtiment parfaitement propre et dératé.

Il faut donc d'abord maîtriser le problème *Salmonella* dans les étapes de sélection et de multiplication, de la filière chair et de la filière ponte. Ainsi, plusieurs textes réglementent la recherche des salmonelles dans la filière avicole et plus particulièrement dans ces élevages de sélection ou de multiplication (Directive CEE 92/117 "zoonose", circulaire DGAL SDSPA N.91/8126). Cependant, aucun de ces deux textes ne précise les techniques bactériologiques à mettre en oeuvre lors de l'analyse des échantillons prélevés. Le but de cette recherche est de préciser ce dernier point.

Matériel et Méthodes

Prélèvements et pré-enrichissement :

314 échantillons (186 chiffonnettes (provenant d'élevages ou de couvoirs), 85 fientes, 21 fonds de boîtes ou meconium, 14 eaux de boisson, 5 aliments pour volaille et 3 prélèvements de poussières) ont été soumis à une phase de pré-enrichissement à 37°C pendant 18 à 22 h en eau peptonée tamponnée (AES 140302).

Tous les échantillons ont été dilués dans l'eau peptonée tamponnée en respectant un facteur de dilution entre 1/5 et 1/10.

Milieux comparés – enrichissement et isolement :

Après cette phase de pré-enrichissement, le milieu a été homogénéisé par agitation, puis on a successivement prélevé :

- 2 ml pour ensemercer 20 ml de tétrathionate de Müller Kauffmann ISO formulation (Difco 1853) : TT1
- 2 ml pour 20 ml de tétrathionate de Müller Kauffmann (AES 140702) : TT2
- 2 ml pour 20 ml de tétrathionate de Müller-Kauffmann (Merck 10863) : TT3
- 0,2 ml pour 20 ml de Rappaport-Vassiliadis (Oxoïd CM 866) : RV1
- 0,2 ml pour 20 ml de Rappaport-Vassiliadis (Merck 7700) : RV2
- 2 ml pour 20 ml de sélénite-cystine (AES 141252) : SC

Les milieux au tétrathionate et de Rappaport-Vassiliadis ont été incubés 24 heures $\pm$ 2 heures à 41°C $\pm$ 1°C ; le milieu au sélénite-cystine étant incubé pendant cette même période à 37°C $\pm$ 1°C.

Après cette phase d'enrichissement une oese de chacun de ces 6 milieux a été isolée successivement sur chacun des 3 milieux d'isolement sélectif pour la recherche de *Salmonella* :

- le milieu de Rambach (Merck 7500/002)
- le milieu SMID ou *Salmonella*-Identification (Mérieux 43291)
- le milieu XLT₄ ou Xylose-Lysine Tergitol 4 (AES 123420)

Le milieu de Rambach a été préparé dans notre laboratoire en suivant les instructions du fournisseur, alors que les milieux SMID et XLT₄ ont été achetés prêts à l'emploi (boîtes pré-coulées). Les trois milieux d'isolement ont été incubés à 37°C et ont été examinés après 24 et 48 heures d'incubation.

Notation des résultats :

Chaque échantillon analysé a ainsi donné 18 boîtes dont le résultat a été noté de A à E selon le code suivant :

- A : isolement d'une culture pure de *Salmonella*.
- B : mélange de cultures bactériennes dans lequel *Salmonella* apparaît majoritairement.
- C : mélange de cultures bactériennes dans lequel *Salmonella* apparaît minoritairement, mais où le nombre de colonies typiques est supérieur à 3.
- D : mélange de cultures bactériennes où le nombre de colonies typiques est compris entre 1 et 3.
- E : Absence de colonie caractéristique de *Salmonella*.

Analyse des résultats :

Pour chacun de 40 échantillons reconnu positif par l'une ou l'autre des associations de milieux employées, 18 résultats sont obtenus correspondant aux 18 associations enrichissement-isolement différentes testées dans cette étude. Certains de ces résultats peuvent être négatifs (notés E) dans la mesure où toutes les associations n'ont pas toujours été capable de mettre en évidence la présence de salmonelles au sein d'un même échantillon. Les résultats ont été comparés par la méthode du χ^2 , en utilisant le logiciel SYSTAT sous WINDOWS.

Résultats

40 échantillons sur les 314 analysés (12,7 %) se sont révélés positifs par l'une ou l'autre des associations (milieu d'enrichissement / milieu d'isolement) employées (tableau 1). Les comparaisons entre les milieux d'enrichissement et les milieux d'isolement utilisent respectivement les tableaux 2 et 3.

Pour les milieux d'enrichissement (tableau 2) les comparaisons à l'aide du χ^2 entre :

- le tétrathionate (TT1) et le tétrathionate (TT2)
- le tétrathionate (TT2) et le tétrathionate (TT3)
- le tétrathionate (TT1) et le tétrathionate (TT3)
- le Rappaport-Vassiliadis (RV1) et le Rappaport-Vassiliadis (RV2)

ne donnent aucun résultat significatif. Les formules des trois tétrathionates de Müller-Kauffmann testés dans cette étude peuvent donc être considérés comme équivalentes. De même les deux milieux de Rappaport-Vassiliadis ne donnent pas de résultats significativement différents.

TABLEAU 1 : Résultats obtenus pour les 40 échantillons positifs en fonction de la technique d'analyse utilisée (association enrichissement-isolément)

Note	TT1			TT2			TT3			RV1			RV2			SC		
	Rb	SMID	XLT4	Rb	SMID	XLT4	Rb	SMID	XLT4	Rb	SMID	XLT4	Rb	SMID	XLT4	Rb	SMID	XLT4
A	9	9	15	12	14	18	6	9	15	1	1	5	2	2	7	1	1	4
B	20	18	16	21	18	15	23	18	14	7	5	13	10	10	11	3	3	4
C	7	6	5	4	4	3	8	2	4	10	7	11	12	6	10	8	5	6
D	3	3	1	2	2	2	1	4	1	10	11	3	4	12	7	7	13	12
E	1	4	3	1	2	2	2	7	6	12	16	8	12	10	5	21	18	14

Par contre les comparaisons (tableau 2) :

- de tous les TT avec le SC ($\chi^2 = 167,87$ ddl = 4)
- de tous les RV avec le SC ($\chi^2 = 22,527$ ddl = 4)
- de tous les TT avec tous les RV ($\chi^2 = 123,64$ ddl = 4)

indiquent des différences significatives au seuil de 1⁰/oo dans les trois cas. Ces différences sont suffisamment importantes pour assurer que les milieux d'enrichissement au tétrathionate sont supérieurs aux milieux d'enrichissement de Rappaport-Vassiliadis, qui sont eux-mêmes supérieurs aux milieux d'enrichissement type sélénite-cystine.

TABLEAU 2 : Comparaison des milieux d'enrichissement quel que soit le milieu d'isolement associé.

Note	TT1	TT2	TT3	RV1	RV2	SC	tous TT	tous RV
A	33	44	30	7	11	6	107	18
B	54	54	55	25	31	10	163	56
C	18	11	14	28	28	19	43	56
D	7	6	6	24	23	32	19	47
E	8	5	15	36	27	53	28	63
TOTAL	120	120	120	120	120	120	360	240

En ce qui concerne les milieux d'isolement (tableau 3), les comparaisons à l'aide du χ^2 montre une seule différence très significative : le XLT₄ apparaît statistiquement supérieur au SMID, tous milieux d'enrichissement confondus ($p = 0,001$).

Si les comparaisons entre ces milieux d'isolement (tableau 3) sont renouvelées en tenant compte de l'enrichissement préalable, on observe qu'il n'existe pas de différence significative entre :

- le Rambach et le SMID si on utilise du Tétrathionate
- le SMID et le XLT₄, si on utilise du Tétrathionate
- les trois milieux d'isolement si on utilise du Sélénite-cystine
- le Rambach et le SMID si on utilise du Rappaport.

Mais, il semble préférable d'utiliser du XLT₄, plutôt que du Rambach ou du SMID, si on enrichit avec du Rappaport-Vassiliadis ($p = 0,05$ ou $0,005$ respectivement).

Les résultats de ces comparaisons ne valent que pour les types d'échantillons analysés dans cette étude, et ne peuvent en aucun cas être généralisés.

TABLEAU 3 : Comparaison des milieux d'isolement en fonction du (des) milieu(x) d'enrichissement associé(s).

Note	tous milieux +Rb	tous milieux +SMID	tous milieux +XLT4	tous TT +Rb	tous TT +SMID	tous TT +XLT4	tous RV +Rb	tous RV +SMID	tous RV +XLT4
A	31	36	64	27	32	48	3	3	12
B	84	72	73	64	54	45	17	15	24
C	49	30	39	19	12	12	22	13	21
D	27	45	26	6	9	4	14	23	10
E	49	57	38	4	13	11	24	26	13
TOTAL	240	240	240	120	120	120	80	80	80

Discussion

Dans le domaine de l'hygiène alimentaire les prélèvements soumis à une recherche de salmonelles doivent être analysés conformément à la norme ISO 6579 (Décembre 93). Initialement, cette norme obligeait à l'utilisation du téthrationate et du sélénite, mais elle préconise maintenant l'association Rappaport-Vassiliadis et sélénite qui a été jugée plus efficace, notamment en présence de flores envahissantes (Van Schothorst *et al.*, 1987).

Les compositions des milieux au téthrationate de Müller-Kauffmann commercialisés sont excessivement variables. On constate des variations pour presque tous les composants (carbonate de calcium, thiosulfate de sodium, iode, iodure de potassium et vert brillant). Trois de ces compositions ont été testées et bien qu'aucune ne corresponde à l'ancienne norme AFNOR V08-013 (Juin 82), elles sont toutes relativement efficaces.

On note également des différences dans la composition des milieux de Rappaport-Vassiliadis commercialisés (pH, concentration en chlorure de magnésium et type de peptone utilisée : Majjala R. *et al.*, 1992 ; Peterz *et al.*, 1989). Les deux formulations commerciales (correspondant pourtant à la norme ISO 6579) ont donné pour le type de prélèvements analysés dans cette étude des résultats décevants.

Par contre, toutes les formulations de sélénite-cystine commercialisées en France présentent la même composition. Une seule a été testée et elle montre le manque de sélectivité de ce type de milieu.

L'enrichissement des salmonelles est un phénomène complexe, et l'on considère qu'il est nécessaire d'atteindre 10^4 à 10^5 salmonelles/ml dans le pré-enrichissement pour être capable de les détecter en utilisant le Rappaport-Vassiliadis ou le téthrationate (Chen H. *et al.*, 1993).

Enfin, on doit souligner l'excellente performance du milieu d'isolement XLT4 (Miller R.G. *et al.*, 1991 ; Tate G.R. *et al.*, 1992) qui a d'ailleurs été spécialement mis au point pour la recherche de *Salmonella* dans les élevages de volailles.

Références

- Chen H., Fraser A.D.E., Yamazaki H., 1993. I. J. F. M., 18, 151-159.
 Lombard I., Lepoutre A., Charley C., Le Querrec F., 1992. B. E. H., 49/93, 227-229.
 Majjala R., Johansson T., Hirn J., 1992. I. J. F. M., 17, 1-8.
 Peterz M., Wiberg C., Norberg P., 1989, J. Appl. Bact., 66, 523-528.
 Russel G., Tate C.R., Mallinson E.T., Scherrer J.A., 1991. Poultry Science, 70, 2429-2432.
 Tate C.R., Miller R.G., Mallinson E.T., 1992, J. Food Protec., 55 (12), 964-967.
 Van Schothorst M., Renaud A. Van Beek C., 1987, Food Microbiol., 4, 11-18.