

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNEE 1992

THESE N°

707

**SURVIE DE SALMONELLA ENTERITIDIS  
DANS DES PREPARATIONS CULINAIRES  
A BASE D'OVOPRODUITS**

**THESE**

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

*présentée et soutenue publiquement le 4 Mars 1992*

par

**Jean-Philippe ROUQUIÉ**

né le 13 Avril 1967 à Gourdon (Lot)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur HABRIOUX ..... PRESIDENT  
Monsieur le Professeur NICOLAS ..... JUGE  
Mademoiselle FERAL, *Médecin Inspecteur de la Santé* ..... JUGE  
Madame DESSENDIER, *Docteur en Pharmacie* ..... JUGE

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)  
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de Conférences (2ème Assesseur)

### PERSONNEL ENSEIGNANT

#### \* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOU Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

### SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

*A mes parents,*

*à qui je dédie ce travail,  
qu'il soit pour eux le témoignage de mon amour.*

*A Marie,*

*A ma soeur,*

*A ma famille et à mes amis.*

*A notre Président de Thèse,*

*Monsieur le Professeur HABRIOUX,*

*C'est un agréable devoir pour nous de vous exprimer toute notre reconnaissance. Nous vous remercions de la gentillesse et de la disponibilité dont vous avez fait preuve pour la réalisation de ce travail.*

*Que ces quelques mots soient pour vous le témoignage de notre amitié.*

*A Monsieur le Professeur NICOLAS,*

*Nous vous remercions de  
l'accueil que vous nous avez réservé dans votre  
laboratoire, et de l'aide que vous nous avez apportée.*

*Nous vous sommes très  
reconnaissant d' avoir accepté de juger notre travail.*

*A Mademoiselle de Docteur FÉRIAL,*

*Nous vous sommes très reconnaissant pour  
l'aide et les conseils que vous nous avez apportés.*

*Nous vous remercions d'avoir accepté de  
participer à ce jury.*

*A Madame DESSENDIER,*

*Pour les conseils et l'aide que vous nous  
apportez au cours de notre stage officinal.*

*Nous vous remercions d'avoir accepté de  
participer à ce jury.*



*A Madame SICRE,*

*Vous nous avez accueilli au sein de votre  
officine, pour terminer notre formation de pharmacien.*

*Que ces quelques mots soient pour vous le  
témoignage de notre reconnaissance.*

A Monsieur MAURATILLE,

Pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé dans le laboratoire départemental de la Haute-Vienne.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire départemental, et plus particulièrement Madame CHAMPAGNOL, pour la patience et l'aide active qu'elle a bien voulu nous apporter.

Nous remercions Monsieur HUBERT (Direction Générale de la Santé), pour les conseils et l'aide qu'il nous a donnés.

Nous remercions Monsieur le Professeur THAPON (INRA de Rennes) pour les précieux conseils qu'il nous a donnés.

Nous remercions les secrétaires de la DDASS de la Haute-Vienne pour la gentillesse dont elles ont fait preuve à notre égard.

PLAN

# PLAN

## INTRODUCTION

## PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LES SALMONELLES

I/. HISTOIRE :

II/. CARACTERES DES SALMONELLES :

III/. ROLE PATHOGENE :

IV/. CLINIQUE :

V/. PHYSIOPATHOLOGIE :

A/. Le processus entéro-invasif :

B/. L'endotoxine lipopolysaccharidique :

VI/. DIAGNOSTIC :

A/. Diagnostic direct :

1/. Le prélèvement :

2/. La coproculture :

3/. L'hémoculture :

B/. Diagnostic indirect :

VII/. TRAITEMENT :

**DEUXIEME PARTIE :  
BILAN EPIDEMIOLOGIQUE**

**EN ANGLETERRE**

**I/. INTRODUCTION :**

**II/. METHODOLOGIE :**

**III/. EVOLUTION DES FOYERS DE TIAC A SALMONELLES**

**IV/. PROGRESSION DU SEROTYPE ENTERITIDIS**

A/. Salmonella typhimurium :

B/. Salmonella enteritidis :

**V/. CARACTERISTIQUES DES TIAC A SALMONELLA ENTERITIDIS :**

A/. Enquête sur les poulets :

B/. Enquête sur les oeufs :

**VI/. PRINCIPAUX ALIMENTS MIS EN CAUSE :**

**EN FRANCE**

**I/. METHODOLOGIE :**

A/. Les données DDASS, DSV :

1/. La déclaration :

2/. L'intervention :

3/. La surveillance nationale :

B/. Les données du C.N.R. :

**II/. LES T.I.A.C. A SALMONELLA ENTERITIDIS :**

A/. T.I.A.C. tous germes confondus :

B/. T.I.A.C. à Salmonelles :

C/. T.I.A.C. à Salmonella enteritidis :

1/. Données du C.N.R. :

2/. Données de la DDASS et DSV :

D/. Types de restaurations :

E/. Types d'aliments :

F/. Conclusion :

<b>EN HAUTE-VIENNE</b>
------------------------

**I/. BILAN DES TIAC EN HAUTE-VIENNE :**

A/. 1984 :

B/. Les premières TIAC à S. enteritidis en 1987 :

C/. TIAC à S. enteritidis en 89-90 :

D/. Enquête de 1989 :

E/. Données du C.N.R. des Salmonella :

**II/. ETUDE D'UN CAS PARTICULIER :**

A/. Première toxi-infection :

1/. Enquête médicale :

2/. Enquête alimentaire :

3/. Remarques :

B/. Récidive :

1/. Enquête médicale :

2/. Enquête alimentaire :

3/. Investigations du laboratoire :

**III/. CONCLUSION :**

## TROISIEME PARTIE : EXPERIMENTATIONS SUR LES OEUFS

### I/. INTRODUCTION :

### II/. RAPPELS SUR LA RECHERCHE DES SALMONELLES :

A/. Prise d'essais :

B/. Pré-enrichissement non sélectif :

C/. Enrichissement sélectif :

1/. Bouillon de Rappaport-Vassiliadis :

2/. Milieu au sélénite :

D/. Isolement et identification :

1/. Gélose Hektoen :

2/. Gélose D.C.L. :

E/. Confirmation :

1/. L'uréase rapide :

2/. Recherche de l'oxydase :

3/. Ensemencement d'une galerie API 10 E :

a/. ONPG :

b/. ADH :

c/. LDC :

d/. ODC :

e/. CIT :

f/. H<sub>2</sub>S :

g/. URE :

h/. TDA :

i/. IND :

j/. VP :

4/. Test du rouge de méthyle :

5/. Réaction de Voges-Proskauer :

6/. Test LDC, ODC, ADH :

7/. Milieu de Kligler :

8/. Ensemencement d'une galerie API 20 E :

- a/. GEL :
- b/. Utilisation de différents glucides :
- d/. Résultats :

F/. Typage :

1/. Structure antigénique des Salmonelles :

- a/. Antigènes somatiques "O" :
- b/. Antigènes d'enveloppe "Vi" :
- c/. Antigènes flagellaires "H" :

2/. Typage des souches de Salmonelles :

- a/. Etude de l'agglutination "O" :
- b/. Etude de l'agglutination "H" :
- c/. Etude de l'agglutination "Vi" :

G/. Lysotypage :

**III/. ETUDE DE LA SURVIE DE SALMONELLA ENTERITIDIS DANS LES OEUF ET OVOPRODUITS**

A/. Méthodologie :

- 1/. Préparation de la suspension de S. enteritidis
- 2/. Contamination du produit :
- 3/. Dénombrement des Salmonella enteritidis :

B/. Expérimentation sur les mayonnaises :

- 1/. Méthode :
- 2/. Résultats :

C/. Expérimentation sur les omelettes :

- 1/. Méthode :
- 2/. Résultats :



D/. Expérimentation sur le blanc et le jaune séparés :

1/. Méthode :

2/. Résultats :

E/. Mise en évidence du pouvoir bactériostatique du lysozyme de blanc d'oeuf :

1/. Composition du blanc d'oeuf :

2/. Le lysozyme de blanc d'oeuf :

*a/. Nature et structure :*

*b/. Activité du lysozyme :*

*c/. Activité du lysozyme sur les bactéries à gram négatif :*

3/. Etude de l'action du lysozyme :

*a/. Méthodologie :*

*b/. Résultats :*

IV/. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS :

A/. Notion de dose infectante :

B/. Multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les oeufs :

C/. Influence de la température :

1/. Température de stockage :

2/. Températures de cuisson :

D/. Influence du pH :

QUATRIEME PARTIE :  
DISCUSSION

I/. INTRODUCTION :

## II/. LA CONTAMINATION DES OEUFS :

A/. Fréquence de la contamination :

B/. Mécanisme de la contamination :

1/. La contamination avant la ponte :

2/. La contamination après la ponte :

C/. Niveau de la contamination :

D/. Moyens de lutte :

1/. Curatifs :

2/. Mesures préventives :

*a/. Sur les volailles :*

*b/. Sur les locaux :*

*c/. Sur les oeufs :*

## III/. CONSERVATION DES OEUFS :

A/. Rappels de législation :

1/. Les différentes catégories d'oeufs :

2/. Caractéristiques des oeufs "A" :

3/. Caractéristiques des oeufs "B" :

4/. Caractéristiques des oeufs "C" :

B/. Les différentes méthodes de conservation :

1/. Oeufs entiers :

*a/. Le trempage :*

*b/. La réfrigération :*

2/. Les oeufs en poudre :

*a/. Par la chaleur :*

*b/. Par le froid :*

3/. Les oeufs cassés congelés :

C/. Contrôles de qualité :

1/. L'aspect extérieur de l'oeuf :

2/. Le mirage :

3/. Le contrôle de poids :

D/. Discussion :

1/. Température de conservation :

2/. Absence de contrôle microbiologique :

IV/. UTILISATION DES OEUFS :

A/. Dans la cuisine familiale :

B/. Par l'industrie alimentaire :

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

Les salmonelles sont des entérobactéries pathogènes responsables de deux types d'affections, les fièvres typhoïdes (ou salmonelloses majeures) d'une part, et les toxi-infections alimentaires (ou salmonelloses mineures) d'autre part.

Grâce à l'efficacité des antibiotiques, et à la précision du diagnostic biologique, les salmonelloses majeures ont perdu leur caractère endémique (1). Le nombre de cas déclarés n'a cessé de diminuer : moins de 1000 cas déclarés par an en France (2). De plus, la plus grande partie des cas recensés en France trouve son origine dans un contage à l'étranger.

A l'inverse, les salmonelloses mineures ont vu leur fréquence augmenter considérablement depuis le début des années 80 (3,4). Les salmonelles sont de nos jours responsables de près de 40 % des foyers de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (5).

Rappelons qu'une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) est définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Avant la fin des années 80, cette pathologie, qualifiée de "mineure", n'intéressait pas beaucoup les professions de santé.

S'il est vrai que le taux d'incidence (8,4 pour 100000 habitants)(6) et le taux de létalité (1 à 6 %)(2) de cette affection sont en moyenne assez faibles. Il n'en demeure pas moins que les toxi-infections peuvent avoir des conséquences dramatiques chez les nouveaux nés, ainsi que chez les personnes âgées.

En terme de dépense de santé, les toxi-infections alimentaires représentent un surcoût très important. En 1987, l'administration américaine a chiffré à 2 milliards de dollars (en frais médicaux, et arrêts de travail), les pertes occasionnées par les 2 millions de cas recensés pendant cette année (7).

En 1987, l'Angleterre a été touchée par une importante épidémie de TIAC à *Salmonella enteritidis*. Très vite les oeufs de poules ont été incriminés. Les oeufs de poules se sont avérés en effet, être contaminés par ce sérotype de salmonelle jusque là peu isolé (8).

Quelques mois plus tard, la France a été elle-même concernée par ce phénomène.

La médiatisation de cette épidémie, a entraîné une prise de conscience, des professions de santé et des pouvoirs publics (9).

Il nous a semblé intéressant d'étudier cette épidémie de TIAC à *Salmonella enteritidis*, afin de comprendre ses origines et ses mécanismes.

Après une première partie consacrée à de brefs rappels sur la bactérie elle-même, nous dresserons dans un deuxième temps, un bilan épidémiologique de la situation en Angleterre, en France, et en Haute-Vienne.

Nous étudierons dans une troisième partie la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les différents composants des oeufs, ainsi que l'influence de certains paramètres physico-chimiques rencontrés en technologie alimentaire sur la prolifération de cette bactérie.

Enfin, dans une quatrième partie, nous remonterons la chaîne alimentaire, en vue de définir les risques de contamination des oeufs d'une part, et de proposer des mesures prophylactiques qui permettraient de diminuer ces risques d'autre part.

# 1ere PARTIE



# Rappels sur les Salmonella

## I/. HISTOIRE

C'est Eberth, qui en 1880 observa pour la première fois le bacille responsable de la fièvre typhoïde, le nom de fièvre typhoïde vient de l'état de "tuphos" observé chez les malades.

Le nom de Salmonella a été donné par Lignières au début du siècle, en l'honneur de Salmon dont la contribution à l'étude de cette bactérie fut d'ailleurs mineure.

La fièvre typhoïde va jouer en pathologie, le rôle de maladie pilote. C'est à propos de la fièvre typhoïde qu'a été découvert le sérodiagnostic, qui sera appliqué ensuite à de nombreuses autres maladies infectieuses.

## II/. CARACTERES DES SALMONELLES

Les Salmonelles appartiennent à la famille des entérobactéries, et possèdent donc à ce titre les caractères suivants : ce sont des bacilles gram -, aérobies-anaérobies facultatives, glucose + par processus fermentatif, oxydase -, nitrate +, catalase + (10).

Sur le plan biochimique, les bactéries du genre Salmonella possèdent certains caractères communs, qui sont détaillés au chapitre : Recherche des Salmonelles, 2e partie.

Salmonella enteritidis est un des très nombreux sérovars de Salmonelles caractérisés aujourd'hui. A chacune de ces espèces correspond une formule antigénique unique (Cf. Recherche des Salmonelles), et on a défini ainsi 2367 sérovars (11,12,13,14)(appelés également sérotypes), qui sont à l'origine de la classification de KAUFFMANN et WHITE (Cf. Typage des Salmonelles).

### III/. ROLE PATHOGENE :

Les Salmonelles sont des parasites du tube digestif de l'homme et/ou des animaux. La contamination du milieu extérieur se fait par les excréments des malades, ou des porteurs sains.

Les salmonelles sont des bactéries pathogènes, responsables de deux grands types de pathologies qui sont liées à un défaut d'hygiène générale, ou à une contamination des aliments (15):

\* Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, également appelées Salmonelloses majeures, dues à des sérotypes strictement humains. Nous n'aborderons pas leur étude dans cet exposé.

\* les salmonelloses mineures, dues à des sérotypes ubiquitaires, qui se traduisent cliniquement, par une gastro-entérite d'origine alimentaire...

Mais quelle que soit la pathologie, la contamination se fait toujours par voie digestive, et, dans les cas qui nous intéressent (T.I.A), la contamination a lieu par ingestion d'aliments souillés.

#### IV/. CLINIQUE :

La toxi-infection alimentaire (gastroentérite fébrile de l'adulte) est une maladie à déclaration obligatoire (M.A.D.O. n° 12). Elle débute 8 à 48 heures après l'ingestion de l'aliment souillé.

Il est à noter que l'apparition des signes cliniques est provoqué par l'ingestion de Salmonelles, contrairement à la toxi-infection Staphylococcique qui est provoquée par une entérotoxine. Des signes cliniques beaucoup plus précoces (2 à 3 heures), ainsi que l'absence de fièvre constituent le diagnostic différentiel (16).

Lors d'une toxi-infection alimentaire à salmonelles, on observe une phase fébrile d'apparition brutale, des vomissements, une diarrhée accompagnée de douleurs abdominales. La guérison est généralement rapide, en 2 à 5 jours.

#### V/. PHYSIOPATHOLOGIE :

Les signes cliniques évoqués plus haut, sont la conséquence de deux mécanismes physiopathologiques concomitants :

- \* un processus entéro-invasif

- \* l'action de l'endotoxine (lipopolysaccharides)

A/. Le processus entéro-invasif :

Bien que l'on ait pensé que ce processus ne concernait que les salmonelloses majeures, il est maintenant bien fondé que les salmonelloses mineures obéissent elles aussi à ce mécanisme (2).

Après leur absorption, les Salmonelles entrent en contact avec l'épithélium du tube digestif, elles détruisent la bordure en brosse des cellules intestinales, et pénètrent dans l'entérocyte par une invagination de la membrane. La barrière intestinale franchie, les Salmonelles vont se multiplier abondamment dans les ganglions mésentériques, et gagner la circulation sanguine en empruntant les voies lymphatiques.

Véhiculées dans le torrent sanguin, elles passent alors par le foie, et se multiplient dans les voies biliaires, elles sont enfin éliminées par la bile dans le grêle et dans le colon.

Cette élimination peut s'étaler dans le temps, et se poursuivre après la disparition des signes cliniques, expliquant la fréquence des porteurs sains chroniques.

Ce processus entéro-invasif permet d'expliquer deux phénomènes :

- *Salmonella enteritidis* est capable chez la poule de passer du tube digestif aux organes reproducteurs (via la circulation sanguine), ce qui permet la contamination des oeufs avant la ponte.

- le décalage qui existe, entre les résultats de l'hémoculture, et ceux de la coproculture. (Cf.VI )

B/. L'endotoxine lipopolysaccharidique :

Cette toxine est libérée lors de la lyse des Salmonelles, transportée par voie sanguine, elle provoque l'ulcération des plaques de Peyer qui se traduit par une diarrhée sanglante, et des perforations intestinales.

Dans le cas des fièvres typhoïdes (salmonelloses majeures) cette même toxine atteint (toujours par voie sanguine) le système nerveux central au niveau des ventricules cérébraux, et provoque un abattement appelé "tuphos", auquel la fièvre doit son nom.

**VI/. DIAGNOSTIC :**

A/. Diagnostic direct :

Le diagnostic de certitude est le diagnostic biologique. Il est d'ailleurs le seul utilisé dans les toxi-infections alimentaires.

1/. Le prélèvement :

Ce diagnostic consiste à isoler la bactérie dans différents prélèvements :

- selles (*coproculture*)
- vomissements
- sang (*hémoculture*)

Alors que dans les fièvres typhoïdes, deux prélèvements sont toujours effectués (sang + selles), pour les toxi-

infections alimentaires, seule la coproculture est pratiquée en routine.

## 2/. La coproculture :

Elle utilise les caractères culturaux et biochimiques des Salmonelles, elle reprend les mêmes techniques que la recherche des Salmonelles dans les aliments, et s'accompagne d'un antibiogramme (Fig. n° 1).

## 3/. L'hémoculture :

Elle est beaucoup plus rarement utilisée dans le diagnostic des toxi-infections alimentaires, que dans le diagnostic des fièvres typhoïdes (Fig. n°2)

*Remarque : Pour les Salmonelloses "majeures", l'hémoculture est positive en début d'infection, alors que la coproculture reste négative, après une dizaine de jours, l'hémoculture se négative et la coproculture devient positive (16).*

## B/. Le diagnostic indirect :

Il n'est pas utilisé dans les toxi-infections alimentaires. Le sérodiagnostic de FELIX-WIDAL qui correspond à la recherche et à l'étude de l'évolution des anticorps (agglutinines anti-O et anti-H), est utilisé dans le diagnostic des Salmonelloses "majeures", il est parfois d'interprétation difficile.

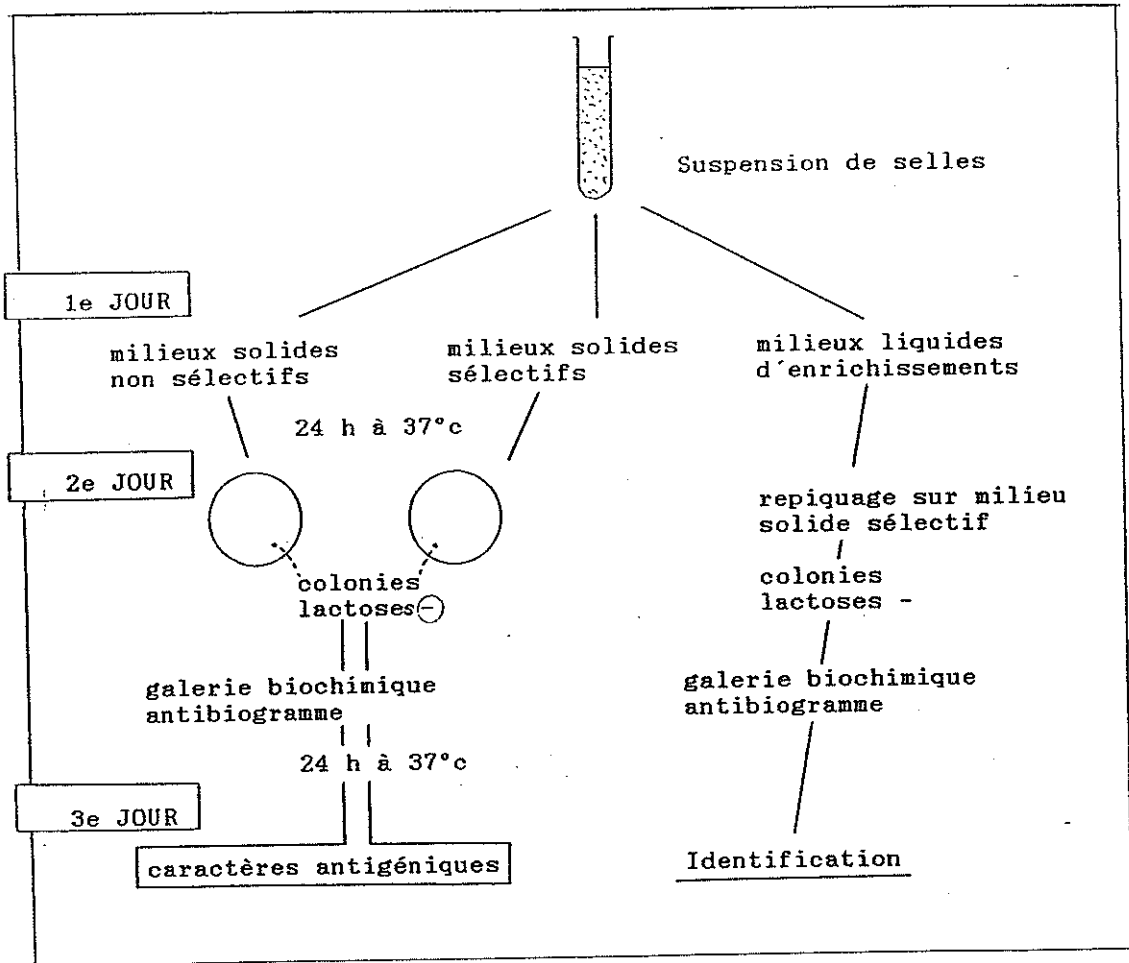


Figure n 1 : La coproculture

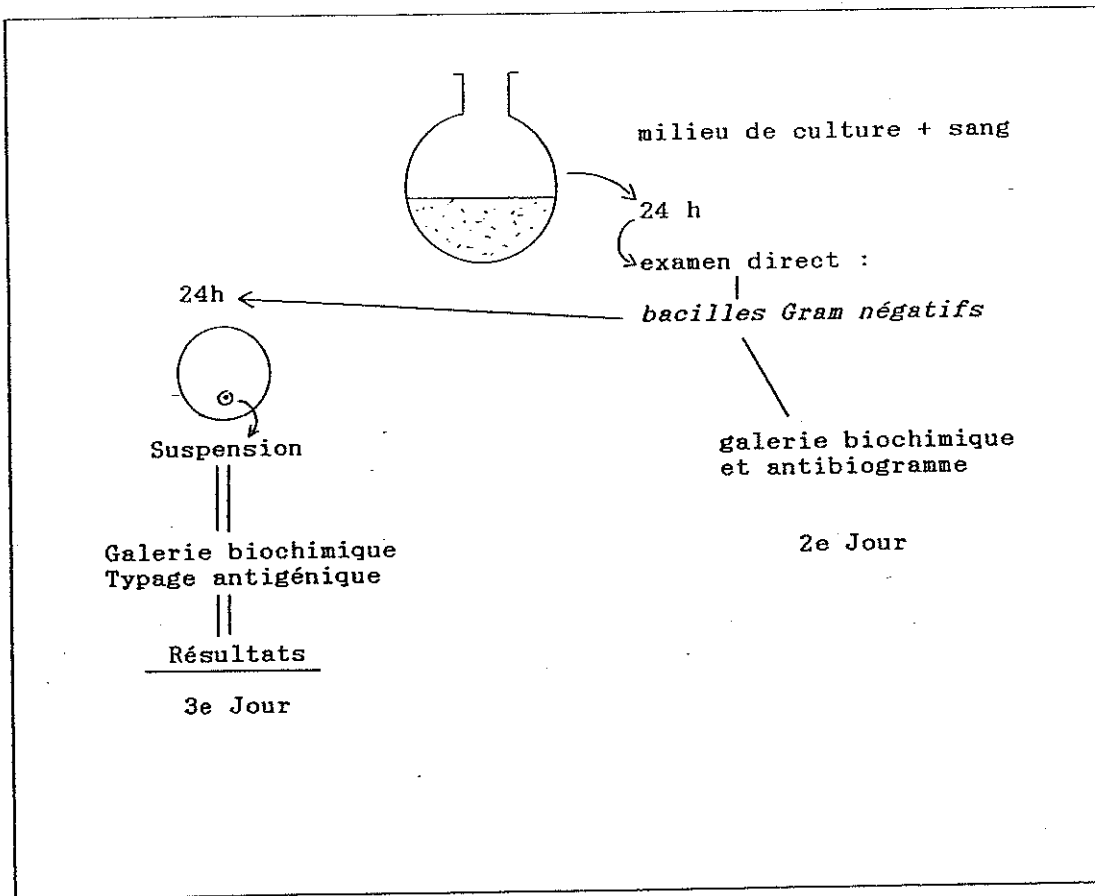


Figure n 2 : L'hémoculture



## VII/. TRAITEMENT :

Le traitement de la toxi-infection alimentaire à Salmonelles, est très discuté. Certains (17) pensent que l'antibiothérapie est inutile, voire néfaste car elle prolonge le portage. D'autres (18) préconisent l'utilisation d'antibiotiques à bonne diffusion tissulaire.

Il semble que la gastro-entérite à Salmonelles dans sa forme simple, ne justifie que la prescription d'antiseptiques intestinaux, par contre, dans les formes graves, la suspicion de bactériémie (*frissons, fièvre...*) nécessite une antibiothérapie d'une durée de 7 jours.

L'antibiothérapie lorsqu'elle est nécessaire est guidée par l'antibiogramme. L'ampicilline (et dérivés) ou le triméthoprim-sulfaméthoxazole (BACTRIM<sup>o</sup>) sont les antibiotiques actuellement les plus utilisés.

Les toxi-infections alimentaires à Salmonella restent des maladies bénignes pour l'adulte en bonne santé. Il en est tout autrement chez les personnes âgées et chez les nouveaux nés. En raison d'un système immunitaire diminué et d'une grande sensibilité à la déshydratation, la toxi-infection alimentaire à Salmonella, peut avoir des conséquences dramatiques.

Chez le nourrisson, l'antibiothérapie ne sera employée que lorsque l'état clinique le justifie, car les antibiotiques sont actifs sur la flore intestinale, et risquent de sélectionner des bactéries résistantes, rendant les antibiotiques inefficaces lors d'une utilisation ultérieure.

## 2eme PARTIE

*Bilan épidémiologique*

---

## *Bilan épidémiologique*

# En Angleterre

### I/. INTRODUCTION :

Avant de décrire et d'analyser la situation en France, il nous a paru intéressant d'élargir notre champ d'investigation, et de nous pencher sur les problèmes que l'Angleterre a rencontrés depuis le début des années 80.

En effet, à l'image de ce qui se passe actuellement pour la maladie de la vache folle, l'épidémie de TIAC à Salmonelle semble avoir commencé plus précocément outre manche, ainsi à travers les statistiques du Royaume Uni nous pourrions bénéficier d'un recul d'environ neuf années (de janvier 1981 à décembre 1989).

A travers cette succincte étude du phénomène anglais, peut être pourrions nous mieux comprendre notre situation nationale et régionale.

### II/. METHODOLOGIE :

Nous utiliserons les données épidémiologiques que nous avons trouvées dans les publications du PHLS (Public Health Laboratory Service), et principalement dans le PHLS Microbiology Digest de janvier 1989 (19), dans lequel il est fait un point très précis de la situation en Grande Bretagne de janvier 1981 à octobre 1988.

Nous avons ajouté à ces informations les chiffres concernant la fin de l'année 1988 et l'année 1989 publiés outre manche dans la deuxième édition de PHLIS-SVS de janvier 1990 (20).

Ces publications nous ont donné le même type de renseignements que les chiffres du Centre National de Référence des Salmonelles (C.N.R., Prof. Le Minor) publiés dans les Bulletins Epidémiologiques Hebdomadaires (B.E.H.) en France, à savoir le nombre de souche de salmonelles typées par année, ainsi que leur répartition en différents sérotypes. Nous pourrions donc comparer les résultats anglais avec les données françaises.

Nous allons dans un premier temps faire le point sur l'évolution du nombre de souches de Salmonelles isolées (tous sérotypes confondus) de 1981 à 1989. Puis dans un deuxième temps, nous étudierons plus particulièrement la progression du sérotype enteritidis, enfin nous tenterons de définir le "profil" des intoxications, en essayant de faire ressortir des groupes d'aliments à risques (oeufs, ovo-produits...).

Il est à rappeler que la taxonomie des Salmonelles est différente en Angleterre et en France, en effet le sérotype appelé Salmonella enteritidis phage type 4 au Royaume uni, correspond à Salmonella enteritidis lysotype 33 en France.

### III/. EVOLUTION DES FOYERS DE TIAC A SALMONELLES (TOUS SEROTYPE CONFONDUS) :

Chaque année la D.E.P. (Division of Enteric Pathogen) reçoit des PHLIS des souches de Salmonelles humaines pour identification et typage de toutes les régions d'Angleterre,

les services vétérinaires reçoivent quant à eux les salmonelles provenant d'animaux ou d'aliments mis en cause dans un foyer de TIAC.

En additionnant ces différents chiffres, on obtient le nombre total de souches de Salmonelles (tous sérotypes confondus) isolées, nous avons ordonné ces résultats par année de 1981 à 1989 dans la figure n°3.

Nous sommes frappés par la progression du nombre de souches de salmonelles typées, en effet en moins de dix années, le nombre total a presque été multiplié par trois (+192,63 %) avec en moyenne 24,07 % d'augmentation annuelle. Ce qui explique pourquoi les pouvoirs publics anglais se préoccupent tant des TIAC à Salmonelles, lesquelles représentent le principal agent infectieux responsable de TIAC.

En approfondissant l'analyse de cette courbe, il convient de différencier plusieurs périodes :

\* De 1981 à 1983 : le taux de croissance est inférieur à la moyenne (moyenne = 24,07 %)

\* De 1983 à 1985 : le taux de croissance devient "négatif".

\* De 1985 à 1989 : le taux de croissance est très supérieur à la moyenne.

On peut s'interroger sur la situation de l'année 1985, qui correspond au point d'inflexion, et se demander pourquoi le nombre total de salmonelles avait diminué.

Les réponses à ces questions apparaissent à l'examen d'un deuxième type de courbe, faisant intervenir la notion de répartition en différents sérotypes.

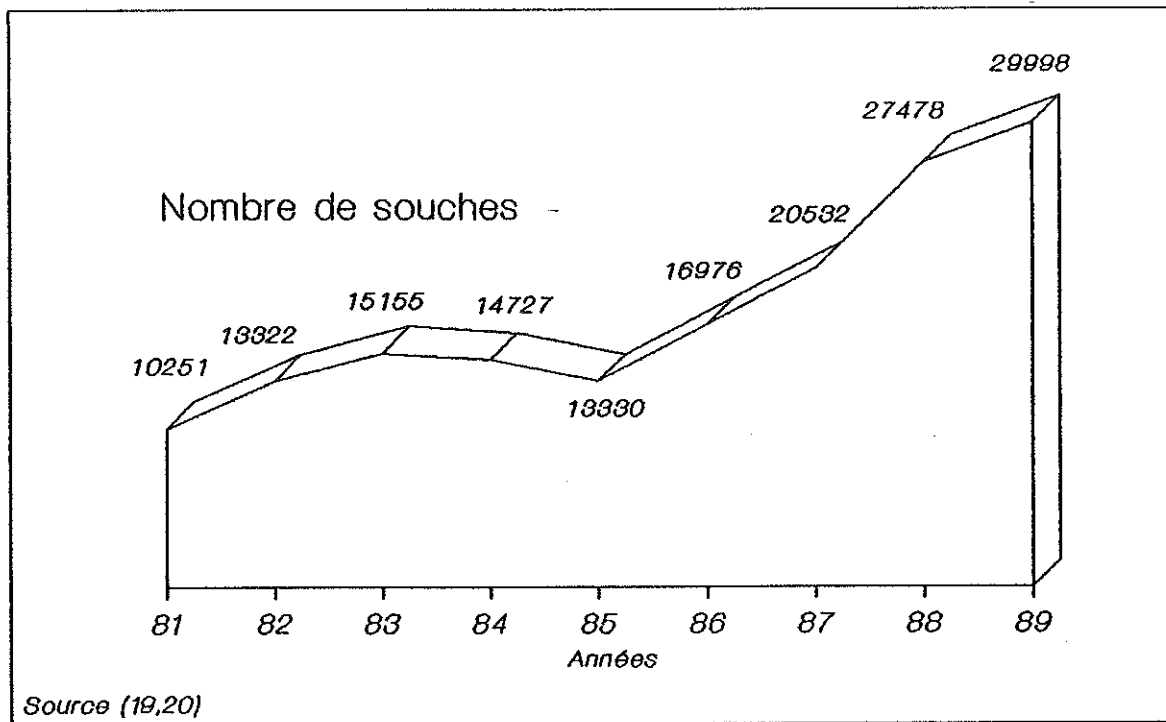


Fig.3 : Nombre de souches de Salmonelles isolées (tous sérotypes confondus)

#### IV/. PROGRESSION DU SÉROTYPE ENTERITIDIS :

Dans le PHLS Microbiology Digest de janvier 1989, nous avons également trouvé la répartition des Salmonelles identifiées en différents sérotypes. En fait les Salmonelles isolées ont été classées en quatre classes :

\* *Salmonella typhimurium*

\* *Salmonella enteritidis* :

- phage type 4 (Lysotype 33)

- autres types

\* *Autres sérotypes*

Comme nous avons procédé pour le nombre total de salmonelles, nous avons présenté ces résultats sous la forme d'un histogramme (Fig.4), pour accroître la facilité de lecture nous avons volontairement regroupé *Salmonella enteritidis* phage type 4 et autres lysotypes sous la dénomination commune de *Salmonella enteritidis*.

Ce graphique montrant la répartition des différents sérotypes présente l'avantage sur le graphique précédent de nous expliquer le point d'inflexion que nous avons rencontré plus haut

En effet l'évolution est totalement différente d'un sérotype à l'autre, il est très intéressant de comparer l'évolution du sérotype *enteritidis* par rapport au sérotype *typhimurium* (les autres sérotypes restant globalement au même niveau).

#### A/. *Salmonella typhimurium* :

C'est le sérotype qui prédomine jusqu'en 1987, c'est la raison pour laquelle ce sérotype sera souvent pris en

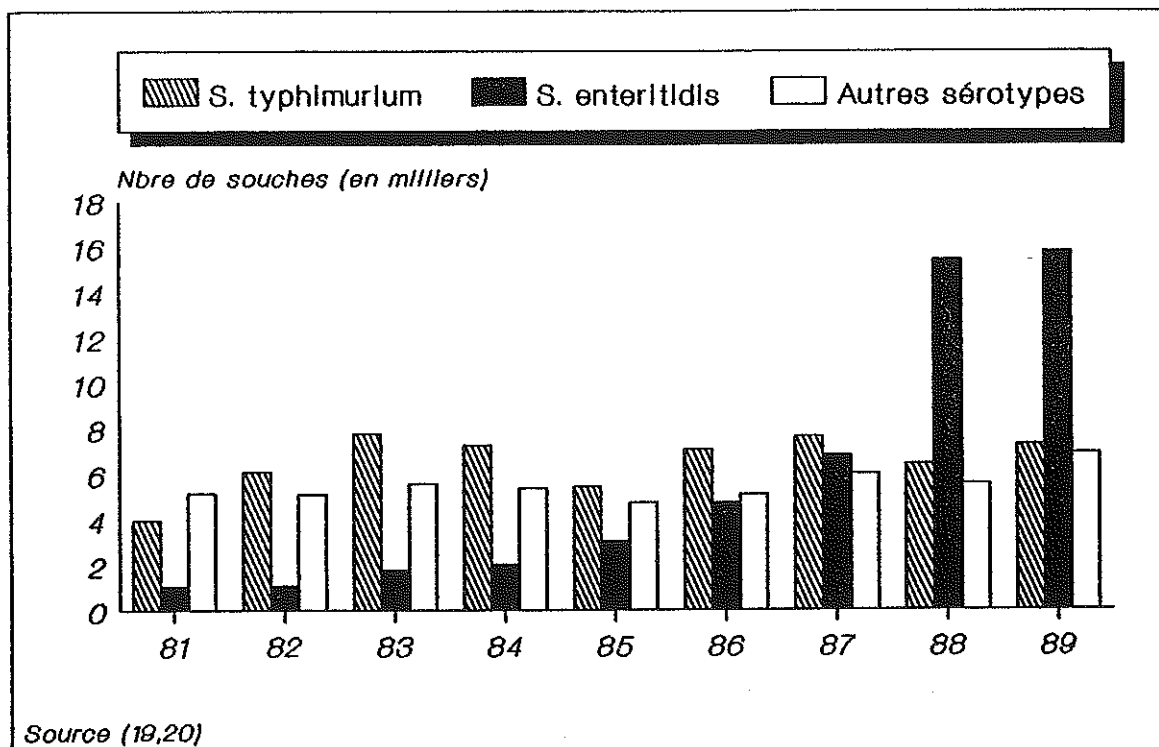


Fig.4 : Progression de *S. enteritidis* en Angleterre de 1981 à 1989



comparaison avec le sérotype *enteritidis*. La diminution du nombre de souches de *S. typhimurium* isolées des années 1984-1985 est responsable du point d'inflexion de la première courbe, pour les années suivantes, ce sérotype reste relativement stable par rapport aux variations du sérotype *enteritidis*.

B/. Salmonella enteritidis :

Le nombre de souches de *Salmonella enteritidis* est en constante augmentation durant les dix dernières années. Depuis 1988, *Salmonella enteritidis* est devenue le sérotype le plus fréquemment isolé, plus de la moitié des salmonelles isolées appartiennent au sérotype *enteritidis* (52,6 % exactement).

Lorsque nous observons la figure n°5, nous nous apercevons que la progression du sérotype *enteritidis*, est pratiquement la même pour la période 1981-1987 que pour la période 1988-1989, seule la période 1987-1988 montre une très forte augmentation.

Cette brutale augmentation peut paraître curieuse, et il est bon de se demander si ce phénomène est simplement dû à une réelle augmentation du sérotype *enteritidis* dans les salmonelles typées.

Lorsque l'on connaît l'émoi qu'il y a eu en Angleterre au sujet des T.I.A.C. dues aux oeufs de poule, on est en droit de penser que les retombées médiatiques ont probablement accru le nombre des déclarations et amplifié cette progression. En effet, nous verrons un peu plus loin, que la quantité d'oeufs consommés par an est de trente millions d'unités, que le nombre d'oeufs contaminés est infime, les anglais n'ayant pas doublé leur consommation d'oeufs durant l'année 1988, même si la progression de *S. enteritidis* pas contestable, on est tenté de croire que les foyers de TIAC ont mieux été signalés en 1988.

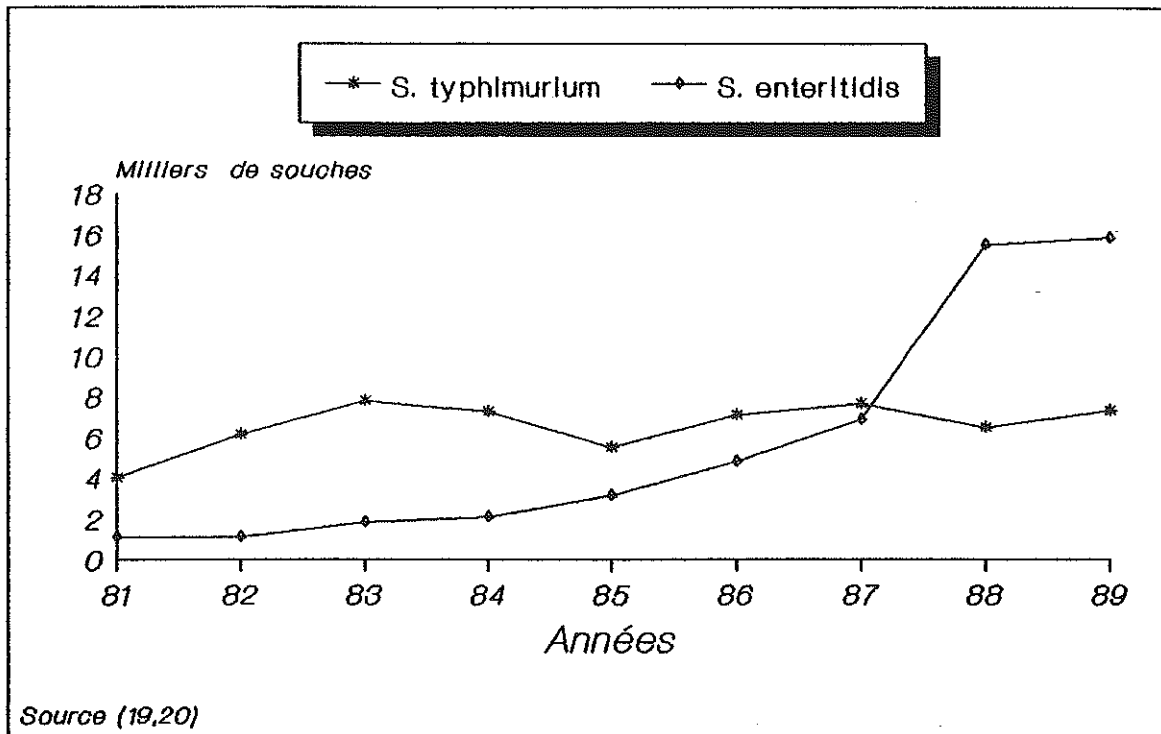


Fig.5 : *S. enteritidis*  
en Angleterre de 1981 à 1989

## V/. CARACTERISTIQUE DES T.I.A.C. A SALMONELLA ENTERITIDIS :

Depuis trois années *Salmonella enteritidis* est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré dans les toxi-infections alimentaires, les résultats des investigations entreprises par le PHLS montrent que dans la plupart des cas TIAC à *S. enteritidis*, le germe provient de volailles contaminées, ou d'oeufs intacts(21).

Ces résultats ont été approfondis par deux enquêtes (19), sur les poulets, et sur les oeufs.

### A/. Enquête sur les poulets :

Nous citerons ici, les résultats de l'étude faite par le PHLS Food Hygiene Laboratory sur la présence de Salmonelle dans les poulets crus congelés :

\* en 1980 : 79 % des poulets examinés se sont avérés contaminés

\* en 1987 : 64 % de positifs

Le taux de contamination a donc légèrement baissé de 1980 à 1987, mais le compte rendu de cette enquête indique également que la proportion du sérotype *enteritidis* est passée de 0 à 16 %.

### B/. Enquête sur les oeufs :

Dans une première étude le PHLS s'est intéressé aux oeufs de la grande distribution (issus d'élevages industriels), sur un échantillon de 600 oeufs, aucun n'a été trouvé contaminé, le résultat de cette étude ne doit pas remettre en cause le fait que les oeufs et ovo-produits sont les aliments les plus fréquemment responsables de TIAC à

*Salmonella enteritidis*. Seule la méthodologie est critiquable, en effet, les 600 oeufs testés ne représentent que 1/50000 de la consommation annuelle en oeufs du Royaume uni, la taille de l'échantillon est beaucoup trop faible, la probabilité de trouver un oeuf contaminé est infime.

Lors d'une seconde étude, le PHLS a examiné 2000 oeufs provenant cette fois de sources douteuses, suspectées ou étant associées à un foyer de TIAC à salmonelles.

Sur 2000 oeufs examinés, 7 se sont révélés contaminés par *Salmonella enteritidis* phage type 4 (0,35 %). De plus, parmi 10 oeufs testés issus d'un élevage familial, 5 se sont révélés contaminés. Il va de soit que les résultats de cette étude ne peuvent pas être extrapolés à la production nationale d'oeufs, en raison de l'origine très particulière de ces oeufs.

#### VI/. PRINCIPAUX ALIMENTS MIS EN CAUSE :

A la figure n° 6, nous avons présenté sous la forme d'un histogramme, la répartition des différents sérotypes en fonction des aliments mis en cause dans l'intoxication. Lors de la déclaration de maladie, le questionnaire n'a sans doute pas permis d'affiner les réponses, et nous devons nous contenter de quatre catégories : oeufs, volailles, porcs, et autres.

Ce graphique nous permet de vérifier que *Salmonella enteritidis* reste le germe le plus fréquemment rencontré dans les oeufs et les volailles. Les données exploitées sont celles de l'année 1989 publiées dans le PHLS-SVS de janvier 1990.

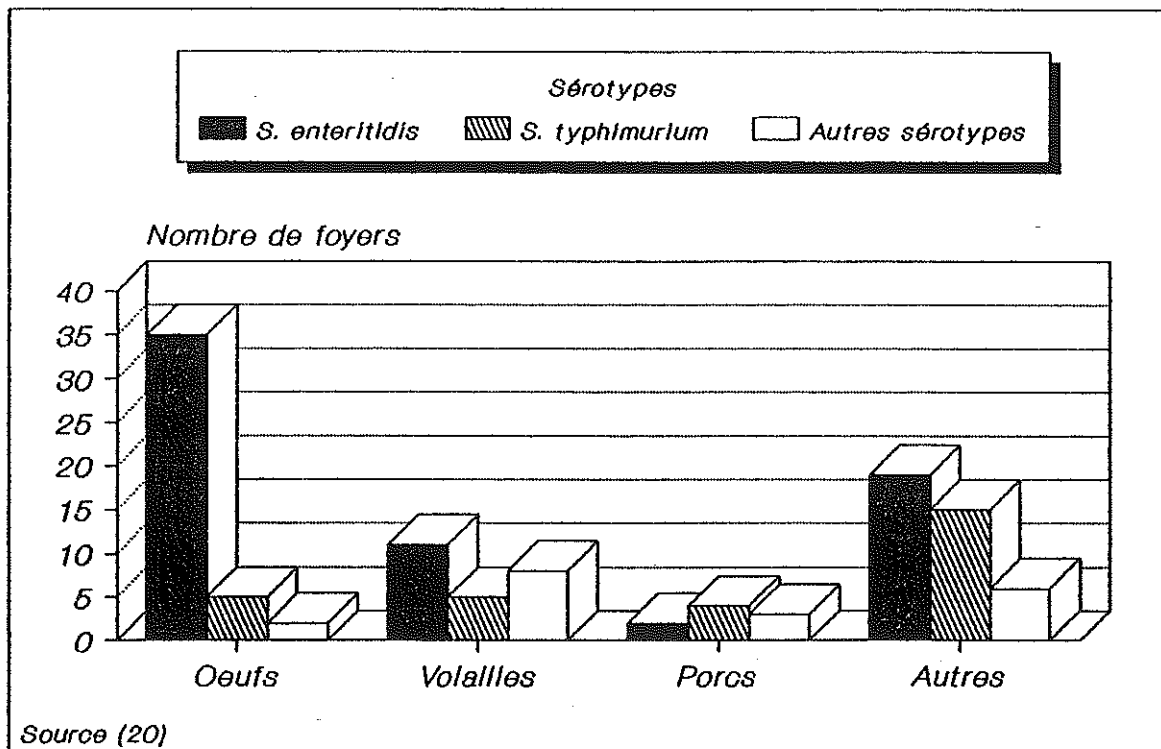


Fig. 6 : Aliments mis en cause dans les TIAC à Salmonelles

# *Bilan épidémiologique*

## En France

### I/. METHODOLOGIE :

Les données utilisées lors de notre étude ont deux origines, les déclarations de TIAC aux DDASS et DDSV d'une part, et les données du centre national de référence des Salmonella d'autre part.

#### A/. Les données des DDASS et DSV :

##### 1/. La déclaration :

Les TIAC sont des maladies à déclaration obligatoire (M.A.D.O.). La déclaration peut être faite par des médecins (médecins de ville, médecins hospitaliers, médecins du travail ou scolaires...), mais aussi par le laboratoire d'analyse, le responsable d'établissement, et bien sûr par les malades et leur famille.

La déclaration des M.A.D.O. est réglementée par les articles L.11 et L.12 du code de la santé publique. La liste des maladies à déclaration obligatoire est fixée par le décret n° 86-770 du 10 juin 1986.

Cette déclaration se fait grâce à un questionnaire simple (fig.7) et anonyme qui est adressé au médecin de la DDASS, la déclaration entraîne l'intervention des services

FICHE B à TRANSMETTRE à : MALADIE A DECLARATION OBLIGATOIRE (Décret 10/6/1986)

D.D.A.S.S. de la HAUTE-VIENNE  
 Docteur Marie-Laure FÉRIAL  
 44, Cours Gay Lussac  
 87031 - LIMOGES CEDEX  
 Tél. : 55-77-55-65

TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE

**CRITERES DE DECLARATION :**  
 Apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

**IMPORTANT :** Dans le cas d'un produit commercialisé ou d'un foyer survenu en restauration collective, la D.D.A.S.S. doit être alertée dans les plus brefs délais afin de prendre les mesures nécessaires.

---

**\* CARACTERISTIQUES DU/DES MALADES :**

INITIALES	AGE	SEXE	CODE POSTAL (domicile)	DATE et HEURE du DEBUT des SIGNES CLINIQUES	SIGNES CLINIQUES N : nausées    V : Vomissements D : diarrhée    F : fièvre A : douleurs abdominales
(ex. : G.L.)	31	F	17000	10/06/86 à 12 h	V, D, F., A)

Complications (préciser) : .....

---

**\* ANALYSES MICROBIOLOGIQUES :**  
 Chez les malades : .....  
 Dans les aliments : .....

---

**\* ORIGINE DE L'INTOXICATION :**

- Date et heure du repas : ..... à ..... heures

- Lieu du repas :  
 - repas familial   
 - restaurant   
 - collectivité  --> | - scolaire.....   
 | - restaurant d'entreprise.....   
 | - autre (préciser).....

- Aliment(s) suspecté(s) : .....

- Origine : .....

---

**\* COMMENTAIRES (circonstances, ...) :**  
 .....  
 .....

---

**MEDECIN DECLARANT :**

Nom : ..... Date de la déclaration : .....

Adresse : ..... Signature : .....

Téléphone : .....

Fig. 7 : Questionnaire médecin

concernés et constitue la matière première à une étude épidémiologique.

*Les figures 8 et 9 représentent les fiches de secrétariat et d'enquête alimentaire utilisées par la DDASS de la Haute-Vienne.*

2/. Intervention des services concernés :

Lors de l'investigation des toxi-infections alimentaires collectives, trois services interviennent ensemble dans l'enquête épidémiologique coordonnée par la DDASS :

\* les DDASS (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales) et les médecins inspecteurs de la santé auxquels s'adressent les déclarations.

\* les DSV (Direction des Services Vétérinaires), responsables de la surveillance des produits alimentaires d'origine animale,

\* les DCCRF (Direction de la Consommation, de la Concurrence, et de la Répression des Fraudes), responsables de la surveillance des produits alimentaires d'origine non animale.

Ces trois services bénéficient de l'aide de leur laboratoire agréé.

Généralement l'intervention comporte quatre phases :

\* étude épidémiologique à partir d'un échantillon de malades et de non-malades



<b>FICHE à RETOURNER à :</b> D.D.A.S.S. Haute-Vienne Docteur FÉRIAL 44, Cours Gay Lussac 87031 - LIMOGES CEDEX Tél. : 55-77-55-65	<b>TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE</b>  <b>FICHE A</b> FICHE de SECRETARIAT DECLARATION DE TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE
Nom de l'informateur.....	
En qualité de.....	
Adresse..... Tél. :.....	
<b>Intoxication alimentaire :</b>	
Individuelle.....	<input type="checkbox"/>
Familiale.....	<input type="checkbox"/>
Collective.....	<input type="checkbox"/>
<b>Date de l'intoxication (première(s) manifestation(s)) :</b>	
Nombre de cas connus.....	
Nombre de personnes servies.....	
Nom de l'établissement ou du lieu concerné.....	
Adresse.....	
Téléphone.....	
<b>Manifestations cliniques :</b>	
Vomissements..... <input type="checkbox"/>	Fièvre..... <input type="checkbox"/>
Diarrhée..... <input type="checkbox"/>	Selles sanglantes..... <input type="checkbox"/>
Crampes abdominales..... <input type="checkbox"/>	Nausées..... <input type="checkbox"/>
Céphalées..... <input type="checkbox"/>	Autres..... <input type="checkbox"/>
Y a-t-il une origine présumée à l'intoxication.....	
<b>Personnes ou organismes déjà contactés :</b>	
DDSV..... <input type="checkbox"/>	Centre Hospitalier..... <input type="checkbox"/>
DDCCRF..... <input type="checkbox"/>	Médecin traitant..... <input type="checkbox"/>
DDASS..... <input type="checkbox"/>	son adresse.....
Laboratoires..... <input type="checkbox"/>	Autres..... <input type="checkbox"/>
<b>I M P O R T A N T</b>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><p>- DEMANDER QUE SOIENT CONSERVES AU FROID LES RELIEFS DU REPAS INCRIMINE.</p><p>- DEMANDER QUE SOIENT CONSERVES AU FROID CE QUI RESTE DES PRODUITS DE BASE AYANT SERVI A LA PREPARATION DU REPAS.</p><p>- DEMANDER QUE SOIENT GARDES AU FROID DES ECHANTILLONS DE SELLES ET VOMISSEMENTS DES MALADES.</p></div>	

Fig. 8 : Fiche de secrétariat

FICHE à RETOURNER à :  
 D.D.A.S.S. Haute-Vienne  
 Docteur FÉRIAL  
 44, Cours Gay Lussac  
 87031 - LIMOGES CEDEX  
 Tél. : 55-77-55-65

TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE

FICHE C

QUESTIONNAIRE-TYPE à UTILISER  
 POUR CHAQUE PERSONNE INTERROGÉE

Identification :

Initiales du Nom : ..... Prénom : .....  
 Adresse.....  
 Age : ..... ans Sexe : .....  
 Malade :  OUI  NON

Signes cliniques (si malade) :

Apparition des signes, le..... à ..... heure(s)  
 Fièvre.....  Douleurs abdominales.....   
 Nausées.....  Diarrhée.....   
 Vomissements.....  Diarrhée sanglante.....   
 Durée moyenne de la symptomatologie.....  
 Traitement.....  
 Hospitalisation :  OUI  NON Adresse..... Date.....  
 Evolution.....  
 Analyses microbiologiques.....  
 .....  
 .....

Enquête alimentaire

Repas du..... à ..h..	Repas du..... à ..h..	Repas du..... à ..h..
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>	..... <input type="checkbox"/>
Eau du robinet..... <input type="checkbox"/>		
Eau de source ou de puits..... <input type="checkbox"/>		
Eau embouteillée..... <input type="checkbox"/>		

ENQUÊTEUR : A....., le.....  
 Nom : Signature :  
 Adresse :

Fig. 9 : Fiche d'enquête alimentaire

\* analyse microbiologique des aliments suspectés par l'étude épidémiologique

\* étude des conditions de préparation des aliments

\* mesures de prévention à quelque niveau que ce soit de la chaîne alimentaire.

Outre son aspect descriptif, cette intervention permet donc de rechercher la ou les causes de la TIAC (germes, aliments responsables...), et de proposer des solutions préventives. L'efficacité de cette intervention dépend surtout de sa rapidité de mise en oeuvre. Elle peut être demandée téléphoniquement par le médecin dès la suspicion d'un foyer de TIAC.

### 3/. Surveillance nationale :

Grace aux renseignements collectés et traités par les DDASS, la DGS (Direction générale de la Santé) dresse annuellement un bilan de la situation en France qui fait l'objet d'un article publié dans le BEH (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire). Les courbes présentées plus loin ont été réalisées grâce à des données collectées dans de nombreux articles publiés dans le BEH, les références en sont les suivantes : (6, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Pour des raisons de commodité, elles ne seront pas reprises dans le texte, avant chaque graphique.

B/. Les données du CNR (Centre National de Référence) des Salmonella et des Shigella :

Les CNR sont des laboratoires qui ont pour mission :

- \* d'identifier les micro-organismes qui leur sont soumis par les laboratoires d'analyses médicales.
- \* de conserver des souches prototypes
- \* de détenir les antisérums de référence
- \* de participer à la surveillance épidémiologique de la ou des pathologies dues aux micro-organismes dont ils assurent le diagnostic.

Le CNR des Salmonella et des Shigella est un laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris, ce CNR est sous la direction du professeur Le Minor et du docteur Grimont.

Chaque année, dans son rapport d'activité (35,36,37,38,39), le Centre national de référence des Salmonella et des Shigella donne le nombre des souches étudiées, la répartition en différents sérotypes, ainsi que des données épidémiologiques recueillies par le centre (répartition en fonction de l'âge du malade...).

**II/. LES TIAC A SALMONELLA ENTERITIDIS EN FRANCE :**

Notre période d'étude est de 6 années, de 1985 à 1990 inclus, il ne nous a pas paru intéressant de remonter plus loin notre étude puisque comme il est montré plus bas le sérotype enteritidis n'est en réelle progression que depuis 1986.

A/. Les TIAC tous germes confondus :

L'évolution du nombre de foyers de TIAC recensés par les DDASS et DSV est indiqué à la figure n°10. Le nombre de foyers de TIAC recensés a été en constante augmentation de 1985 à 1989, ce nombre semble se stabiliser pour l'année 1990, mais seuls les chiffres de 1991 (non encore disponibles) permettront de confirmer cette tendance.

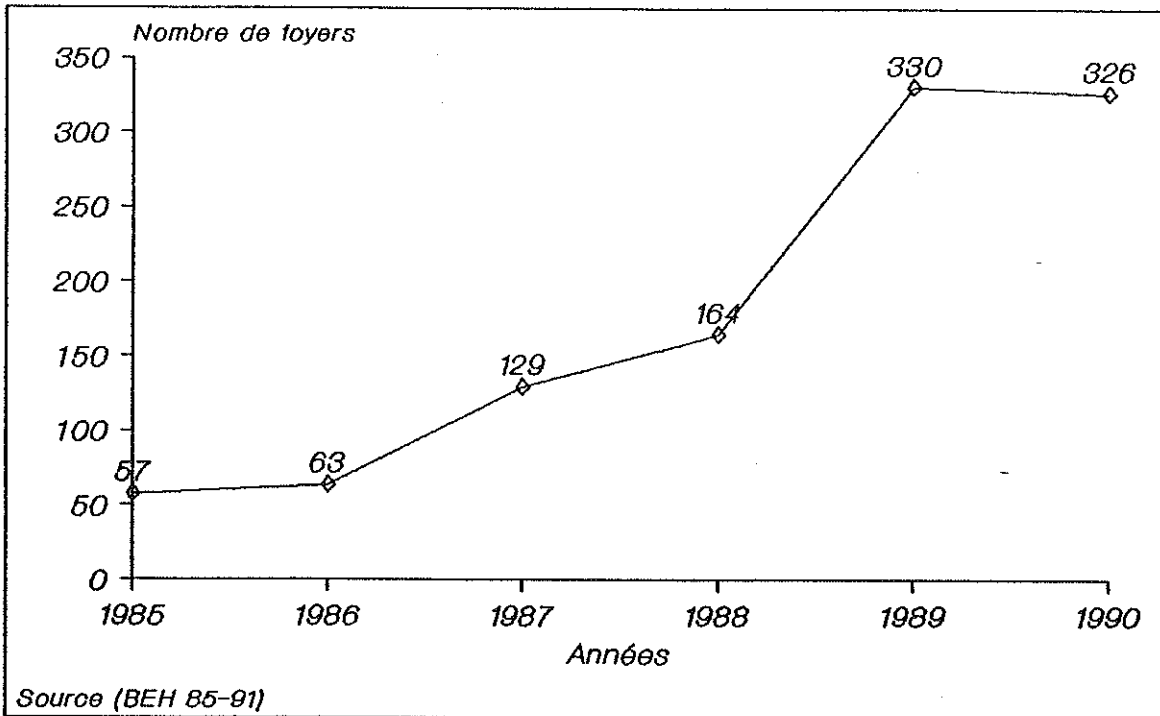
En 6 ans le nombre de foyers de TIAC a été multiplié par 6, cette importante augmentation peut être expliquée par le développement de la restauration collective (5 à 6 milliards de repas servis annuellement en France) et par la diffusion de plus en plus large de produits alimentaires industriels qui sont susceptibles de provoquer des TIAC touchant un plus grand nombre de personnes et d'étendre la répartition géographique des foyers.

Mais l'augmentation du nombre de foyers doit être pondérée par l'évolution du nombre de déclarations lui aussi en progression. Jusqu'en 1986 les foyers de TIAC ont été très sous-déclarés (3700 cas répartis en 63 foyers pour 1986)(25).

Cette sous-déclaration provenait de la lourdeur du système des maladies à déclaration obligatoire, dont les modalités ont été depuis simplifiées (Cf méthodologie).

Les problèmes liés à la mise en évidence du lien de causalité entre l'absorption de l'aliment et la survenue de la pathologie sont également responsables du faible nombre de déclarations enregistrées à cette époque.

Depuis 1988, la DGS au niveau national et les DDASS au niveau local ont sensibilisé, par l'intermédiaire de brochures (40,41), les médecins, les responsables d'établissements au véritable problème de santé publique que sont les TIAC.



*Fig. 10 : Evolution des T.I.A.C.  
Total des foyers recensés par la DDASS  
et la DSV (tous germes confondus)*

L'impact médiatique donné par la presse en 1989 aux TIAC, a permis à la population toute entière de se sensibiliser à cette pathologie qui, en raison de son très faible taux de létalité, n'intéressait auparavant personne.

B/. Les TIAC à Salmonelles :

Les résultats reproduits à la figure n°11, correspondent au nombre de foyers de TIAC à Salmonelles recensés par les DDASS et DSV, les investigations du CNR des *Salmonella* n'ont pas été retenues, puisque ces investigations ne portent que sur les salmonelles et donc faussent leur proportion parmi la totalité des germes responsables de TIAC.

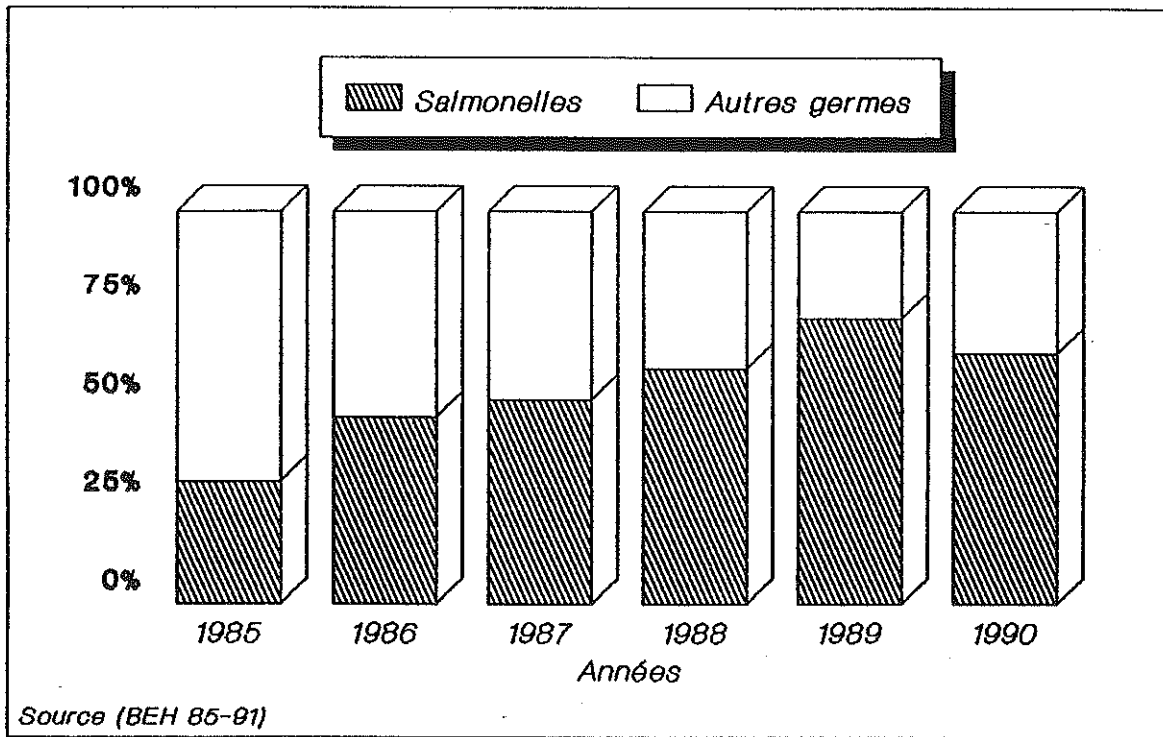
Depuis 1988 les Salmorrelles (tous sérotypes confondus) sont les germes les plus fréquemment mis en cause lors de foyers de TIAC. Cette proportion a augmenté régulièrement jusqu'en 1989 et semble se stabiliser pour l'année 1990.

C/. Les TIAC à *Salmonella enteritidis* :

1/. Données du CNR des *Salmonella* :

Depuis le début des années 80, *Salmonella typhimurium* reste le sérotype le plus souvent isolé par le CNR, avec une proportion qui reste stable de l'ordre de 30 % des souches, c'est la raison pour laquelle nous prenons le sérotype typhimurium comme référence sur la figure n°12.

Le sérotype *Salmonella enteritidis* est en constante augmentation depuis 1987, en 1984 *Salmonella enteritidis* représentait moins de 10 % des souches isolées (37), en 1990 ce sérotype avoisine les 30 % (36).



*Fig. 11 : T.I.A.C. à Salmonelles  
Tous sérotypes confondus par rapport au  
nombre total de foyers*



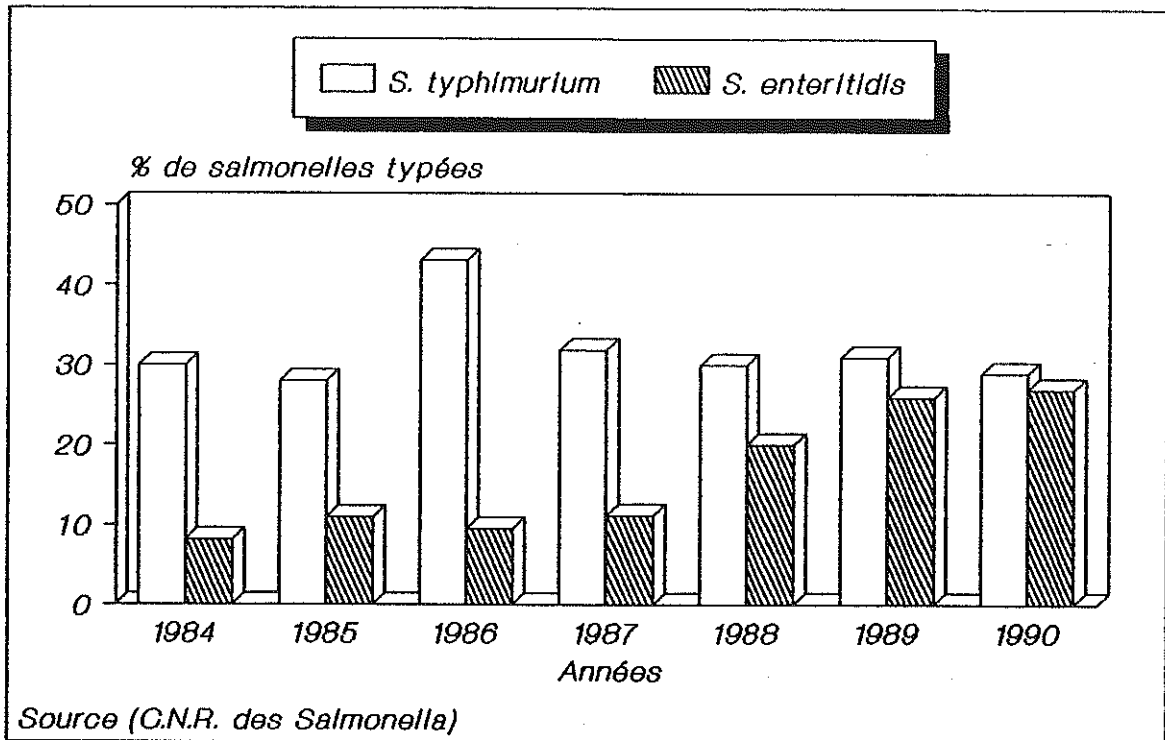


Fig. 12 : *Salmonella enteritidis*  
Progression par rapport à *S. typhimurium*

1988 semble être l'année où les foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis* ont commencé à se multiplier, et 1990 correspond à une stabilisation du phénomène.

La figure n°13 reproduit sur le même graphique, les variations du taux d'incidence d'isolement de *Salmonella enteritidis* pour 100 000 habitants, pour la France et l'Angleterre. Ce graphique permet de vérifier que les deux phénomènes sont :

- d'importance très différente, la situation est en effet beaucoup plus alarmante outre-manche puisque l'écart entre les deux courbes est très important et qu'il ne cesse de s'agrandir, même si comme en France la situation tend à se stabiliser pour l'année 1990.

- de chronologie identique et il est intéressant de remarquer que les points d'inflexions (1989 et 1990) sont les mêmes.

Cette synchronisation peut poser la question de l'existence d'un facteur déclenchant commun, en France et en Angleterre.

L'existence d'un tel stimulus permettrait de comprendre pourquoi le sérotype *entéritidis* est devenu en 3 années, un des sérotypes les plus fréquemment isolés.

## 2/. Les données DDASS et DSV :

La progression du sérotype *entéritidis* par rapport aux autres sérotypes de Salmonelles, est encore plus marquée sur la figure n°14, qui reproduit les données fournies par la DDASS et la DSV. De 1988 à 1989, le nombre de foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis*, a été multiplié par 4. En 1989, le sérotype *enteritidis* est devenu le sérotype le plus

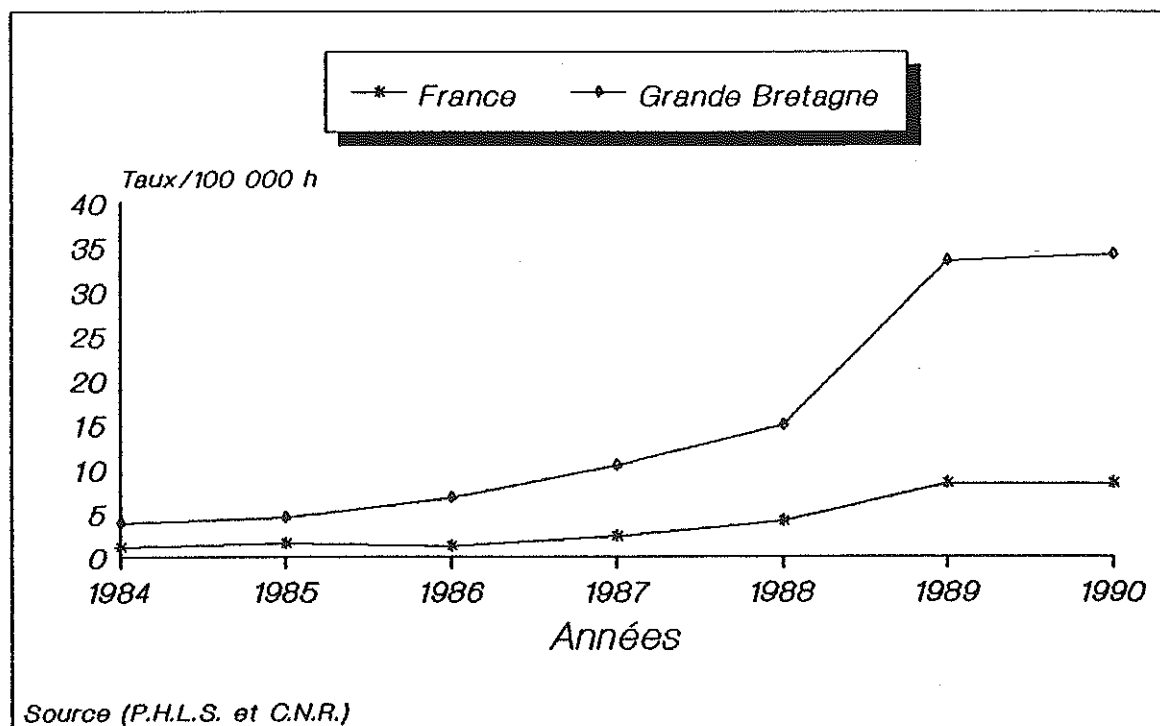


Fig. 13 : Taux d'incidence de *S. enteritidis* en France et en Angleterre de 1984 à 1990.

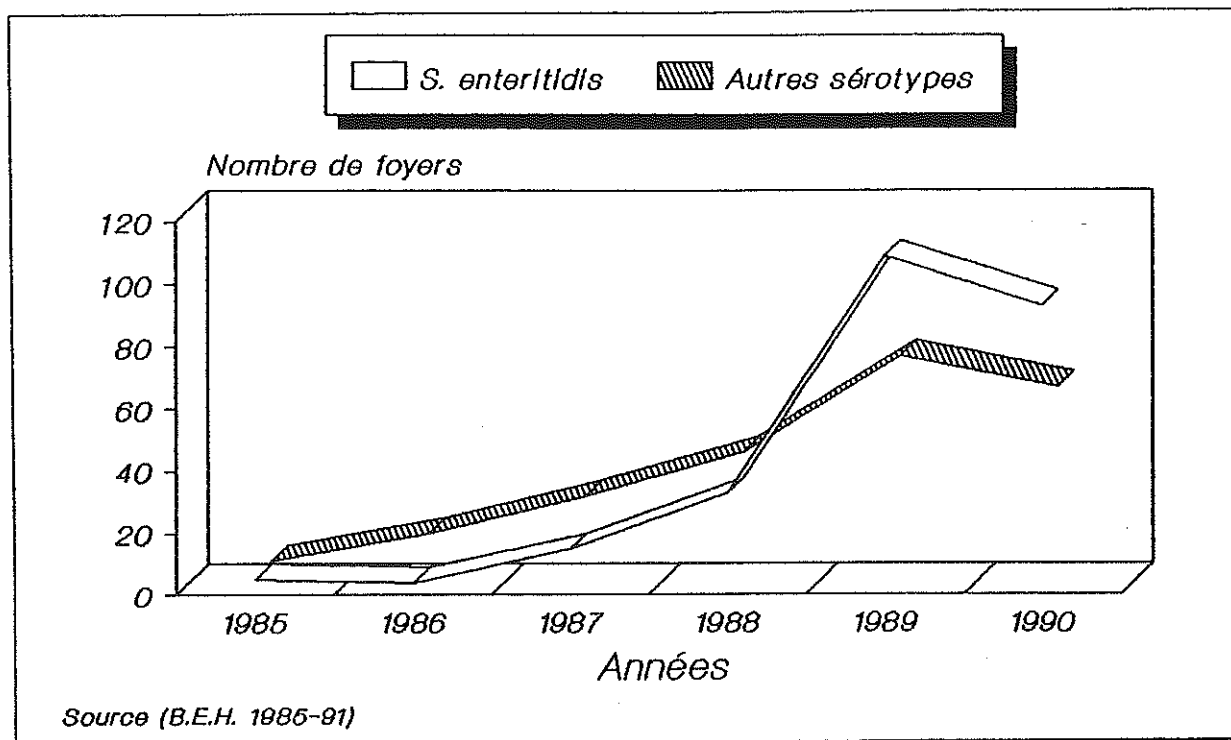


Fig. 14 : *Salmonella enteritidis* selon les déclarations DDASS et DSV

fréquemment mis en cause lors de foyers de TIAC à Salmonelles.

De plus, il ne peut être question dans ce cas de pondérer ce phénomène, par l'accroissement du nombre des déclarations de TIAC, comme cela était possible devant la subite augmentation du nombre de foyers de TIAC.

Il s'agit en effet de fréquences relatives, c'est la proportion de *Salmonella enteritidis* qui a augmenté, cette tendance est d'ailleurs confirmée par les chiffres de 1990, où *Salmonella enteritidis* reste le sérotype le plus fréquemment mis en cause dans les TIAC à Salmonelles, ceci malgré une diminution du nombre absolu de foyers de TIAC déclarés.

#### D/. Type de restaurations :

La figure n°15 donne la répartition des foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis*, en fonction de différents types de restauration. Les données exploitées sont celles de la DDASS et de la DSV pour les 4 dernières années (1987-1990).

Le principal lieu de contamination est le milieu familial. Avec 52,5 % des foyers, la cuisine familiale est donc la cuisine la plus fréquemment contaminée par *Salmonella enteritidis* (31,32,33,34). La restauration collective (entreprise, hopitaux, scolaire) totalise moins de 20 % des foyers alors que ce type de restauration sert 5 à 6 milliards de repas par an (ce qui explique une taille de foyers très élevée).

Ces résultats mettent définitivement un terme à l'idée que "les bons petits repas familiaux" sont moins dangereux que ceux de la restauration collective. Ce phénomène est pourtant facilement expliquable :

Les repas préparés dans le milieu familial n'obéissent pas à des règles d'hygiène très strictes et ne font l'objet d'aucun contrôle. La ménagère, aussi talentueuse soit-elle, n'a ni l'information, ni les moyens techniques (désinfection, mise à basse température...), permettant de minimiser les risques de contamination.

De plus, la préparation des repas familiaux, fait très souvent appel à des matières premières d'origine familiale, (les oeufs du poulailler ...), qui par leur mode de production et l'absence de contrôles sont beaucoup plus souvent contaminés que les mêmes produits d'origine industrielle (Cf. étude régionale).

Les 13,5 % des foyers regroupés sous la rubrique "Divers", représentent le cas de collectivités ou familles qui se sont contaminés avec la même source (pâtisserie, traiteur...).

Depuis le début de cette étude, seuls les nombres de foyers sont pris en compte, pour l'analyse des différents lieux de contamination, il convient de s'intéresser au nombre de malades par foyer, et par là-même de faire intervenir la notion de taille des foyers.

La taille des foyers est en effet très différente selon le type de restauration, en 1990 51 % des foyers en restauration collective comptent entre 10 et 49 malades, alors que 87 % des foyers en restauration familiale comptent moins de 10 malades (33). C'est ainsi que pour les 3 dernières années, la restauration en milieu scolaire a été responsable de seulement 20 foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis*, mais qui ont rendu malades plus de 1300 personnes, alors que la restauration familiale totalise 126 foyers avec seulement 781 malades.

La restauration familiale est donc beaucoup plus souvent contaminée que la restauration collective, mais la taille des foyers étant très différente, le nombre de

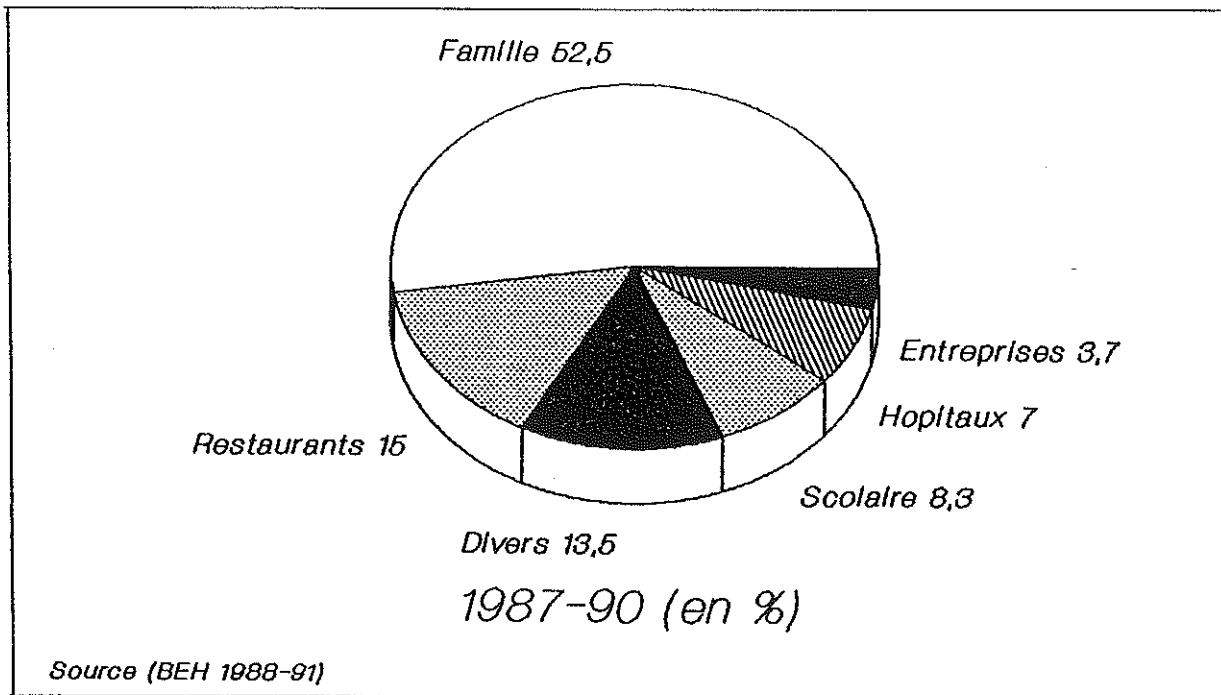


Fig. 15 : Lieux de contamination  
(foyers à *S. enteritidis*)

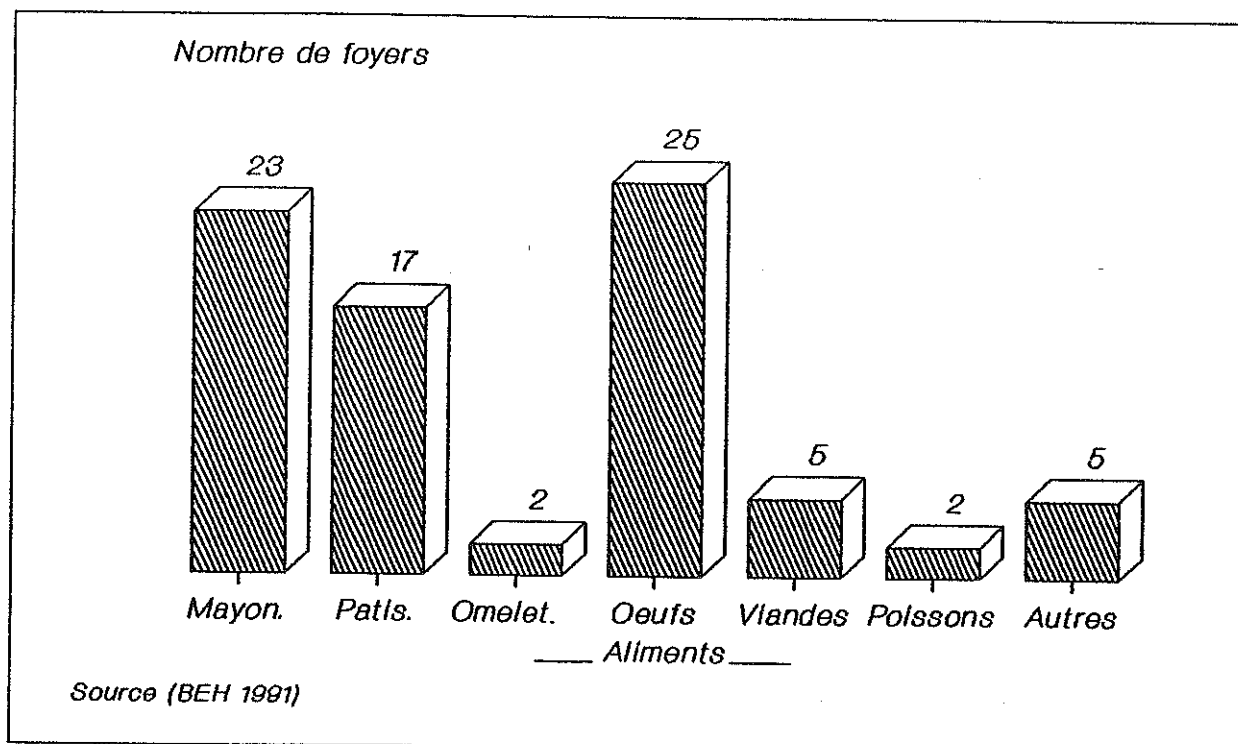


Fig. 16 : Aliments suspectés  
lors de foyers de TIAC à *S. enteritidis*  
(lorsque l'aliment a été déterminé)



malades est bien inférieur à celui rencontré dans la restauration collective.

E/. Types d'aliments :

La figure n°16 représente les principaux aliments suspectés lors de foyers de TIAC *Salmonella enteritidis* pour l'année 1990 (33).

Sur 79 foyers, 67 (soit 85 %) sont provoqués par des ovoproduits.

Les oeufs sont les aliments les plus souvent mis en cause, avec 25 foyers (environ 30 %). Arrivent ensuite, les mayonnaises, les pâtisseries, les volailles...

Les investigations des DDASS et DSV ont permis de découvrir que tous les ovoproduits responsables de ces foyers de TIAC étaient des produits de fabrication artisanale, aucun produit d'origine industrielle n'a été incriminé en 1990 (42).

F/. Conclusions :

*Salmonella enteritidis* est le germe le plus souvent mis en cause dans les foyers de TIAC. Les infections à *Salmonella enteritidis* sont très souvent associées à la consommation d'ovoproduits. Les foyers sont beaucoup plus fréquents en restauration familiale qu'en restauration collective. Malgré une stabilisation de ce phénomène au cours de l'année 1990, la situation reste préoccupante.

## *Bilan épidémiologique*

# En Haute-Vienne

### I/. BILAN DES TIAC EN HAUTE-VIENNE :

Le Limousin fait partie des régions de France les plus touchées par les TIAC à *Salmonella enteritidis* (33,43). En Haute-Vienne, ce sérotype représente de nos jours plus de 30 % des souches isolées chez l'homme (source CNR). Bien que les premières TIAC à *Salmonella enteritidis* ne datent que de 1987, il nous a semblé intéressant de remonter un peu plus loin dans le temps, en prenant comme limite inférieure l'année 1984.

#### A/. 1984 :

Les cas de TIAC déclarés en Haute-Vienne sont assez rares avant 1984. Il s'agit le plus souvent de cas isolés, dont la cause demeure la plupart du temps mal connue. Il est important de rappeler qu'au début des années 80, les TIAC ne constituent pas la préoccupation majeure en matière de Santé Publique; si bien que les médecins ne sont pas encore sensibilisés. Ils ne déclarent que très peu les foyers de TIAC.

En juin 1984, une toxi-infection alimentaire ayant la même origine concerne la Haute-Vienne et l'Angleterre. Ce foyer est engendré par la présence de *Salmonella goldcoast* dans des patés en terrine fabriqués industriellement à Limoges. Ces patés sont distribués en France, et exportés vers le Royaume uni. Le retentissement national et international de cette affaire nécessite une enquête épidémiologique approfondie (44).

Cette enquête menée conjointement par tous les services départementaux (DDASS, DSV, DCCREF, médecin du travail et laboratoire départemental de la Haute-Vienne) permet de remonter en amont la chaîne alimentaire, du produit fini aux matières premières. Cette TIAC d'impact national et international a conduit à la mise en place d'une politique de sensibilisation et de surveillance épidémiologique vis à vis des TIAC par le ministère de la santé, en coordination avec deux autres ministères (Agriculture, et Consommation).

Depuis 1984, la surveillance de cette maladie à déclaration obligatoire n'a cessé de s'accroître et des informations de plus en plus précises ont été collectées. Ce sont ces informations que nous avons utilisées dans ce travail.

#### B/. Les premières TIAC à S.E. en 1987 :

En octobre 1987, le Centre National de Référence des *Salmonella* signale par un télex à la DDASS, une augmentation importante du nombre des infections à *Salmonella enteritidis*. Le CNR demande au médecin inspecteur des investigations plus poussées, les oeufs et ovoproduits semblant être très fréquemment mis en cause.

Une enquête auprès des laboratoires d'analyses médicales (publics et privés) est entreprise. Dans un courrier, le médecin inspecteur demande à ces laboratoires de bien vouloir lui signaler tous les cas de coprocultures positives à *Salmonella enteritidis* à l'aide d'un questionnaire qui leur est adressé.

Fin novembre 1987, 19 souches de *Salmonella enteritidis* ont été isolées en Haute-Vienne. Malheureusement, ces toxi-infections n'ont pas fait l'objet de déclaration par le médecin traitant. Les informations concernant les aliments mis en cause sont pratiquement inexistantes, ce qui rend impossible des investigations plus poussées.

C/. TIAC à *S. enteritidis* en 89-90 :

Depuis 1988, les médecins sont beaucoup plus sensibilisés aux TIAC. Les déclarations sont donc plus nombreuses. En outre, grâce aux fiches de déclaration (Fig. 7,8,9), un nombre important d'informations peuvent être recueillies portant sur :

- le type de restauration
- le nombre de cas
- les aliments suspectés
- les germes responsables

Le tableau n° I, reproduit les différents foyers de TIAC survenus au cours des années 1989 et 1990.

En 1989, *Salmonella enteritidis* est responsable de plus de 28 % des foyers de TIAC. Ce pourcentage s'accroît encore

Tab. 1 : Foyers de TIAC en Haute-Vienne (1989-90)

Date	Lieux	Mal.	Alim.	Germe
Mars 89	Colonie de vacances	9	Lait vache	Staph.
Mai 89	Pâtisserie	32	Oeufs	SE
Aout 89	Familiale	9	Pièce montée	Salmo.?
Sept. 89	Familiale	8	St Honoré	SE
Sept. 89	Ecole	14	Eau boisson	Germe ?
Oct. 89	Crèche	5	Eau de boisson	S. typ. B
Déc. 89	Ecole	15	Fromage	Staph.
<i>Total pour 1989 : 92 cas</i>				
Janv. 90	Maison Familiale	21	Pâte à choux	Staph. aur
Mars 90	Familiale	3	Oeuf	SE
Mai 90	Familiale	8	Oeuf	SE
Aout 90	Familiale	6	Oeuf	SE
Sept. 90	Restaurant	4	Moules	Dinoflagel.
Sept. 90	Familiale	8	Mayonnaise	SE
Oct. 90	Crèche (Limoges)	5	Jambon	Mésophiles
Nov. 90	Collège (Chalus)	6	Moules	Coliformes
Déc. 90	Lycée (St Junien)	11	Croquettes	Coliformes
<i>Total pour 1990 : 72 cas</i>				

en 1990. Le type de restauration fréquemment touché est la restauration familiale.

Il est à noter que dans les foyers de TIAC dont *Salmonella enteritidis* est responsable, les oeufs sont très souvent mis en cause, soit directement, soit par l'intermédiaire de préparations culinaires à base d'oeuf. De plus, dans l'enquête alimentaire menée par le médecin inspecteur pour chaque foyer, on retrouve la notion d'oeufs fermiers issus du poulailler familial.

D/. Enquête de 1989 :

**\* Méthodologie :**

En 1989, le médecin inspecteur entreprend une enquête visant à préciser l'origine de ces toxi-infections à *Salmonella enteritidis*.

Cette enquête porte sur une période de 4 mois (fin avril à début septembre 1989). Elle concerne toutes les personnes ayant eu une coproculture positive à *Salmonella enteritidis* pendant ce laps de temps. La liste de ces coprocultures est demandée aux laboratoires d'analyses médicales. Grâce aux laboratoires, et à l'aide des médecins traitants, il est possible de dresser une liste de personnes concernées. Ces personnes sont contactées personnellement par courrier, et il leur est demandé de remplir un questionnaire.

Ce dernier a principalement pour but, d'essayer de mettre en évidence la consommation d'aliments à risque (oeufs, ovoproduits).

**\* Résultats :**

64 coprocultures positives à *Salmonella enteritidis* ont été signalées par les laboratoires pendant les 4 mois.

Sur les 64 personnes interrogées, 40 (soit 62,5 %) ont répondu au questionnaire.

La répartition est la suivante :

<i>Oeufs fermiers</i> .....	9 personnes (7 foyers)
<i>Oeufs du commerce</i> .....	19 personnes (5 foyers)
<i>Origine inconnue</i> .....	12 personnes

La seule analyse du nombre de personnes atteintes est trompeuse, car il faut tenir compte de la différence de taille de foyer. Les foyers dus à la consommation d'oeufs du commerce sont des foyers de grande taille, ce qui s'explique facilement par la large distribution de ce type d'oeufs. A l'inverse les oeufs issus du poulailler familial, ne sont la plupart du temps destinés qu'à la seule consommation familiale. En cas de contamination, le nombre de malades est en conséquence toujours restreint.

Lorsque l'on s'intéresse au nombre de foyers, plus de 58 % d'entre eux sont provoqués par des oeufs fermiers. Les oeufs du commerce semblent donc être beaucoup moins dangereux que ceux venant de production familiale.

E/. Données du CNR :

Chaque année, le Centre national de référence des *Salmonella*, indique dans son rapport d'activité, le nombre

de souches de salmonelles typées, ainsi que leur répartition en différents sérovars.

Nous avons pu grâce aux données du CNR spécifiques au département de la Haute-Vienne, étudier sur 4 années (1987, 1988, 1989 et 1990) l'évolution de la situation.

La figure n° 17 représente l'évolution du nombre de souches de Salmonelles (tous sérotypes confondus) typées par le CNR en Haute-Vienne. Il est intéressant de noter que l'allure de cette courbe ressemble assez à celle qui correspond à l'ensemble du territoire (Cf.Fig.11) : augmentation de 1987 à 1989, puis légère baisse en 1990.

La figure n° 18 montre l'évolution du sérotype *enteritidis* par rapport aux autres sérotypes. Par rapport aux données nationales, la progression enregistrée de 1987 à 1989 semble être la même, par contre la diminution en 1990 est bien plus importante en Haute-Vienne que pour le reste du pays. Cette apparente stabilisation de l'extension de l'épidémie, constatée en 1990, ne pourra être confirmée que par les données concernant 1991, qui ne sont pas encore disponibles.

Il semble néanmoins, que les efforts de sensibilisation produits par la direction générale de la santé et par la DDASS, commencent à porter leurs fruits en Haute-Vienne.

## II/. ETUDE D'UN CAS PARTICULIER :

Le but de cette étude est de montrer le déroulement des opérations sur le terrain : la déclaration, l'enquête, les mesures et les décisions prises.

Nous avons choisi le cas d'une TIAC à *Salmonella enteritidis* survenue au cours de l'année 1990. Ce cas se



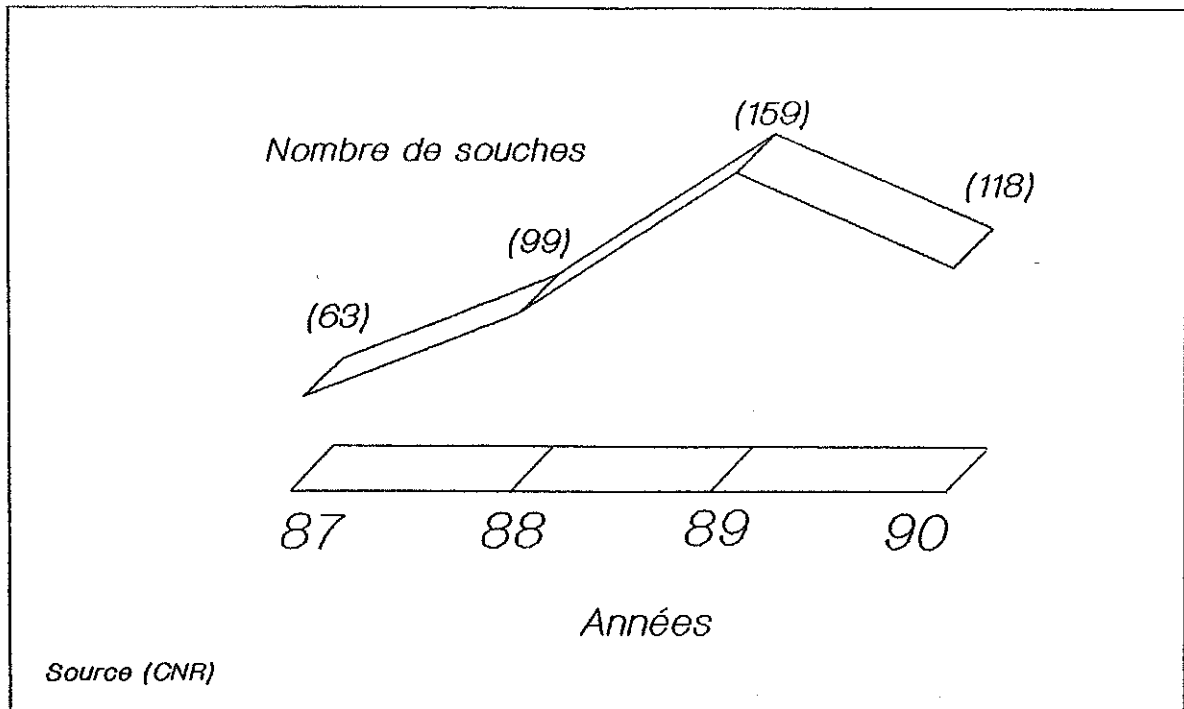
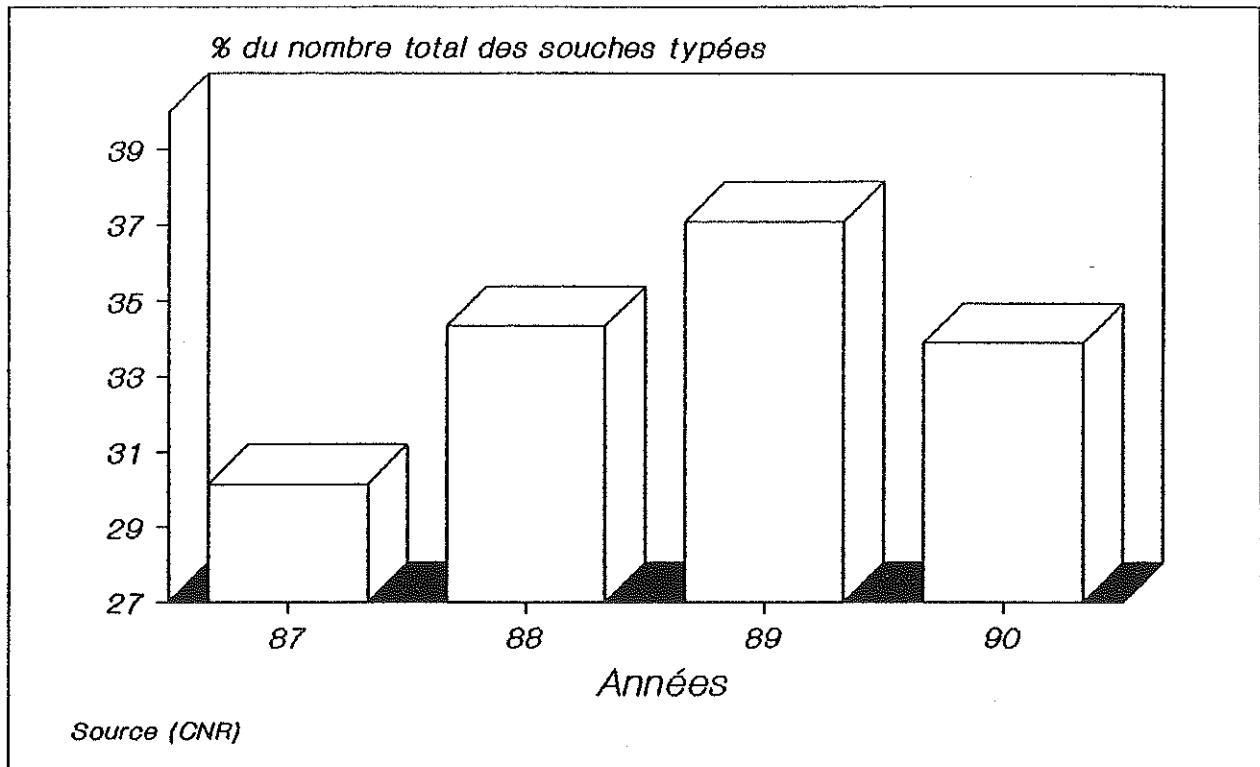


Fig. 17 : Evolution du nombre de souches de Salmonelles provenant de la Haute-Vienne.



*Fig. 18 : Evolution du Sérotype enteritidis en Haute-Vienne*

distingue des autres, car il se compose d'un premier foyer suivi d'une récurrence deux mois plus tard, due à la même source de contamination. Il est à noter que ce double foyer de TIAC a fait l'objet d'investigations menées, par la DDASS de la Haute-vienne et le laboratoire départemental de la Haute-Vienne. Les résultats ont été publiés (43).

#### A/. Première Toxi-infection :

Le foyer est déclaré à la DDASS, le Samedi 17 mars 1990 par la mairie du village, elle-même alertée par le médecin traitant qui, devant la symptomatologie, avait d'abord pensé à un problème de potabilité de l'eau de boisson. Il s'agit d'un foyer familial en milieu rural.

Trois personnes sont atteintes : deux adultes (les parents) et un enfant (3 ans et demie), ils sont hospitalisés au CHRU de Limoges.

le médecin inspecteur de la santé se rend auprès des malades le samedi après midi pour effectuer une enquête médicale, ainsi qu'une enquête alimentaire :

#### 1/. Enquête médicale :

L'apparition des symptômes remonte au mardi 13 mars (vers 2 heures du matin). Le tableau clinique est celui d'une gastro-entérite sévère, avec nausées, vomissements, diarrhées, et douleurs abdominales.

Les coprocultures pratiquées sur les malades reviennent positives, avec présence de *Salmonella enteritidis*. Les patients sont soumis à un traitement antibiotique (BACTRIM° pour les deux adultes, CLAMOXYL° pour l'enfant).

2/. Enquête alimentaire :

En questionnant les malades, le médecin inspecteur essaye de reconstituer les menus des différents repas pris dans les 72 heures qui ont précédé l'apparition des signes cliniques. Parmi tous les aliments composant les repas précédents, seuls deux ont été absorbés à la fois par les trois patients : il s'agit d'oeufs durs, et de poulet (issus de la production familiale).

Le médecin prend alors contact avec le reste de la famille pour essayer de mettre en évidence la présence de *Salmonella enteritidis* en amont, dans les restes d'aliments. Le rendez-vous est fixé au lundi 19 mars. Les prélèvements suivants sont effectués :

- \* morceau de poulet (du lundi 12)
- \* 4 oeufs du 12-13 mars
- \* 1 bocal de petit pois (conserve maison )
- \* 1 boîte de coeurs d'artichaut (vide)
- \* ainsi que d'autres prélèvements faits chez les beau-parents (ferme voisine).

Ces prélèvements sont confiés au laboratoire départemental de la Haute-Vienne pour un examen bactériologique (recherche de Salmonelles).

Les résultats sont rendus par le laboratoire le vendredi 23 : Ils sont tous négatifs. L'absence de germe s'explique par la difficulté qu'il y a eu à retrouver des restes du repas contaminant 6 jours après le début de la pathologie.

3/. Remarque :

Il s'agit bien d'un foyer de TIAC à *Salmonella enteritidis*. Le germe a été retrouvé dans les selles des personnes contaminées, mais n'a pas pu être mis en évidence dans les aliments, bien qu'une forte présomption pèse sur les oeufs de la ferme.

N'ayant pu établir la preuve formelle que les oeufs de la production familiale sont contaminés par *Salmonella enteritidis*, le médecin inspecteur rappelle simplement aux intéressés, dans un courrier (le 30 mars), les principales règles d'hygiène alimentaire, ainsi que les précautions à prendre quant à la consommation des oeufs de la ferme.

B/. Récidive :

Elle est déclarée aussitôt le mardi 8 mai par le médecin traitant, et concerne la même famille. Les troubles apparaissent après un repas d'ensilage. Sur les douze convives, huit sont malades, et parmi eux, la grand-mère dont l'état a nécessité une hospitalisation.

1/. Enquête médicale :

L'enquête médicale rapporte les mêmes symptômes (nausées, vomissements, douleurs abdominales, et diarrhées). Les 7 coprocultures pratiquées reviennent positives avec présence de *Salmonella enteritidis*. Les personnes atteintes sont soumises à un traitement antibiotique. L'évolution est rapide et favorable.

## 2/. Enquête Alimentaire :

L'enquête alimentaire permet de suspecter rapidement un gâteau à la crème. En effet, d'une part les invités non-malades correspondent à ceux qui n'ont pas mangé de ce gâteau, d'autre part, la grand-mère (sévèrement atteinte), n'a pas pris part à ce repas, mais un morceau de ce gâteau lui a été servi.

Le Mercredi 9 mai, une visite est effectuée sur place, par le médecin inspecteur et les techniciens du laboratoire départemental. Des restes du repas suspect sont prélevés pour analyse microbiologique. Les poules de l'élevage sont également examinées. Elles sont baguées et il est procédé à des ecouvillonnages de cloaques, (les résultats sont reproduits sur le tableau II et III).

## 3/. Investigations du laboratoire :

Après cette étude in-vivo, il est décidé d'un commun accord avec la famille, de transporter les volailles à l'animalerie du laboratoire dans la semaine du 21 mai.

Malheureusement, le stress engendré par l'animalerie ne permettra pas de recueillir des oeufs. Les poules seront finalement abattues trois semaines plus tard, et un important travail sera entrepris sur les carcasses.

Sur 38 poules amenées au laboratoire, 13 sont porteuses de *Salmonella enteritidis* au niveau de leur grappe ovarienne (Cf. tableau IV).

Les investigations faites par le laboratoire départemental sur ce foyer de TIAC, ont permis de faire ressortir plusieurs notions :

Tab. II : Recherche de *S. enteritidis* (Aliments)

<i>Rôti de veau</i> .....	<i>positive</i>
<i>Gateau aux fraises</i> .....	<i>positive</i>
<i>Oeufs de ferme</i> .....	<i>6 lots sur 7 positifs</i>

Tab. III : Recherche de *S. enteritidis* (Poules)

<i>Fientes</i> .....	<i>4 lots sur 6 sont positifs</i>
<i>Ecouv. cloacaux</i> .....	<i>3 sur 38 sont positifs</i>

Tab. IV : Analyses sur les carcasses de volailles

<b>Analyse sur les carcasses de volailles</b>		
Nombre de volailles	Autopsie	Recherche de SE
17 (dont 5 coqs)	<i>Absence de lésions</i>	-
4 poules	<i>Foies normaux</i> <i>GO au repos</i> <i>Oviducte N</i>	+
5 poules	<i>Foies cirrhotiques</i> <i>Zones de nécroses</i> <i>GO et oviducte N</i>	+
5 poules	<i>Foies normaux</i> <i>Follicules déformés</i> <i>Oviductes congestionnés</i>	-
4 poules	<i>Foies nécrosés</i> <i>GO hémorragiques</i> <i>Oviductes congestionnés</i>	+

\* les petits élevages fermiers quand ils sont contaminés par *Salmonella enteritidis*, le sont très fortement.

\* les poules sont porteurs sains

\* l'écouvillonnage des cloaques est une méthode de détection insuffisante

\* les fientes sont très contaminées et permettent la dissémination du germe dans le milieu extérieur.

*Remarques :*

Lors du premier foyer de TIAC, il n'avait pas été possible de remonter la chaîne en amont, et la contamination des oeufs de la ferme n'avait pas pu être prouvée.

Avec la récurrence, l'intervention rapide des services concernés (DDASS, et laboratoire départemental), a permis de retrouver *Salmonella enteritidis* dans les oeufs et les volailles, et ainsi de mettre en cause l'élevage familial.

Cette étude permet de préciser combien la rapidité d'intervention des services concernés est importante pour la réussite d'une enquête. Comme l'ont déjà remarqué certains auteurs (45), l'élimination de *Salmonella enteritidis* par la poule paraît intermittente et de courte durée.

Dans un courrier du 27 juillet, le directeur du laboratoire départemental informe la famille de l'évolution de cette affaire. Un rendez-vous est fixé afin de donner des conseils d'hygiène et de prophylaxie pour éviter une nouvelle contamination : désinfection des poulaillers, vide sanitaire à installer.

**III/. CONCLUSION :**

L'élevage des volailles en Limousin est la plupart du temps un élevage familial, au sol et en liberté. Ce mode



d'élevage favorise la dissémination de *Salmonella enteritidis*. Ces pratiques permettent d'expliquer pourquoi notre département a été fortement frappé par l'épidémie de TIAC à *Salmonella enteritidis*.

Depuis 1987, la DDASS s'est efforcée d'étudier chaque foyer de TIAC avec précision et rapidité, afin de pouvoir chaque fois que cela est possible déterminer les causes de la contamination. Mais son rôle ne se limite pas à une étude purement descriptive.

Lorsque le mécanisme de contamination est connu, la DDASS intervient en terme de prévention, en rappelant les règles élémentaires d'hygiène alimentaire. Il s'agit le plus souvent de conseiller et non de sanctionner.

La DDASS lors de foyers de TIAC familiales se garde le soin d'intervenir seule, d'autant qu'il n'existe pas de produits alimentaires commerciaux mis en cause. Mais la DDASS intervient généralement avec l'aide des services vétérinaires (DSV), et/ou des services des fraudes (DCCRF) devant toute TIAC qui met en cause un aliment du réseau agro-alimentaire.

# 3eme PARTIE

# Expérimentations sur les ovoproduits

## I/. INTRODUCTION :

Comme nous l'avons vu dans la deuxième partie consacrée à une approche épidémiologique, l'oeuf est la denrée alimentaire la plus souvent mise en cause lors de foyers de T.I.A.C. à *Salmonella enteritidis*. Pour qu'une denrée alimentaire puisse provoquer une toxi-infection alimentaire, elle doit, d'une part être contaminée par un germe, et d'autre part, permettre le développement de ce germe.

La contamination de l'oeuf peut se faire avant, ou après la ponte. Avant la ponte, le germe peut envahir le jaune dans l'ovaire de la poule, la transmission trans-ovarienne a été établie pour *Salmonella enteritidis* (2). Cette contamination est permise par le cycle entéro-invasif des salmonelles, qui sont capables de quitter le tube digestif et de gagner les ovaires par voie sanguine.

Ce passage du tube digestif à l'appareil reproducteur pose le problème de la contamination des poules pondeuses par leur nourriture. Colin et ses collaborateurs (46) ont montré que l'apparition d'un germe dans un élevage indemne, coïncidait avec la présence du même germe dans les matières premières servant à fabriquer les aliments destinés aux volailles.

Après la ponte, la contamination peut venir des matières fécales cloaquales d'une part, et d'autre part de l'environnement avec lequel l'oeuf va entrer en contact : le nid de ponté, le tapis de ramassage... La différence d'environnement qui existe entre l'élevage familial, et un élevage industriel permet peut être d'expliquer pourquoi, lors de la plupart des foyers de T.I.A.C. à *Salmonella enteritidis*, les oeufs mis en cause sont issus d'une production familiale.

Mais si les risques de contamination après la ponte existent, il n'en demeure pas moins que l'oeuf intact possède différents moyens pour s'opposer à cette contamination et avant de se multiplier dans le jaune d'oeuf, le germe contaminateur devra traverser : la cuticule, la coquille, les membranes coquillières, le blanc d'oeuf.

Dans cette troisième partie, nous allons donc nous intéresser au devenir de *Salmonella enteritidis* une fois la bactérie installée dans les différentes parties de l'oeuf (blanc et jaune) et étudier l'influence de différentes technologies alimentaires (chaleur, froid, abaissement de pH) sur la survie de cette bactérie.

Les principaux aliments mis en cause lors de foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis*, sont des produits à base d'oeufs, nous avons donc procédé à des expérimentations sur

- \* les mayonnaises avec ou sans vinaigre
  
- \* les omelettes (blancs et jaunes mélangés)
  
- \* les blancs et les jaunes séparés

## II/. RAPPELS SUR LA RECHERCHE DES SALMONELLES :

Avant d'indiquer le protocole de notre étude, il nous a semblé important de rappeler le principe de la méthode de recherche des Salmonelles dans les aliments. La méthode dont le mode opératoire est reproduit à la figure n° 19, est celle utilisée au laboratoire de bactériologie alimentaire du laboratoire départemental de la Haute-Vienne, (définie par l'arrêté du 21 dec. 1979). Cette méthode ne diffère de la méthode classique d'analyse des Salmonelles (Norme AFNOR NF V 08-013 de juin 1982) que par le choix de certains milieux (exemple : bouillon R.V. au lieu du bouillon au tétrathionate).

### A/. La prise d'essai :

Il est prélevé 25 grammes de l'aliment à analyser, ces 25 grammes sont broyées et homogénéisées dans 225 ml d'eau peptonnée tamponnée, de façon à obtenir une dilution au 1/10 (47).

### B/. Pré-enrichissement non sélectif :

La dilution obtenue est incubée à 37°C, pendant 6 heures dans le cas des ovoproduits, 18 heures pour les autres aliments.

Ce pré-enrichissement est destiné à revivifier les salmonelles ayant subi un stress, et à permettre leur développement ultérieur dans les milieux d'enrichissement.

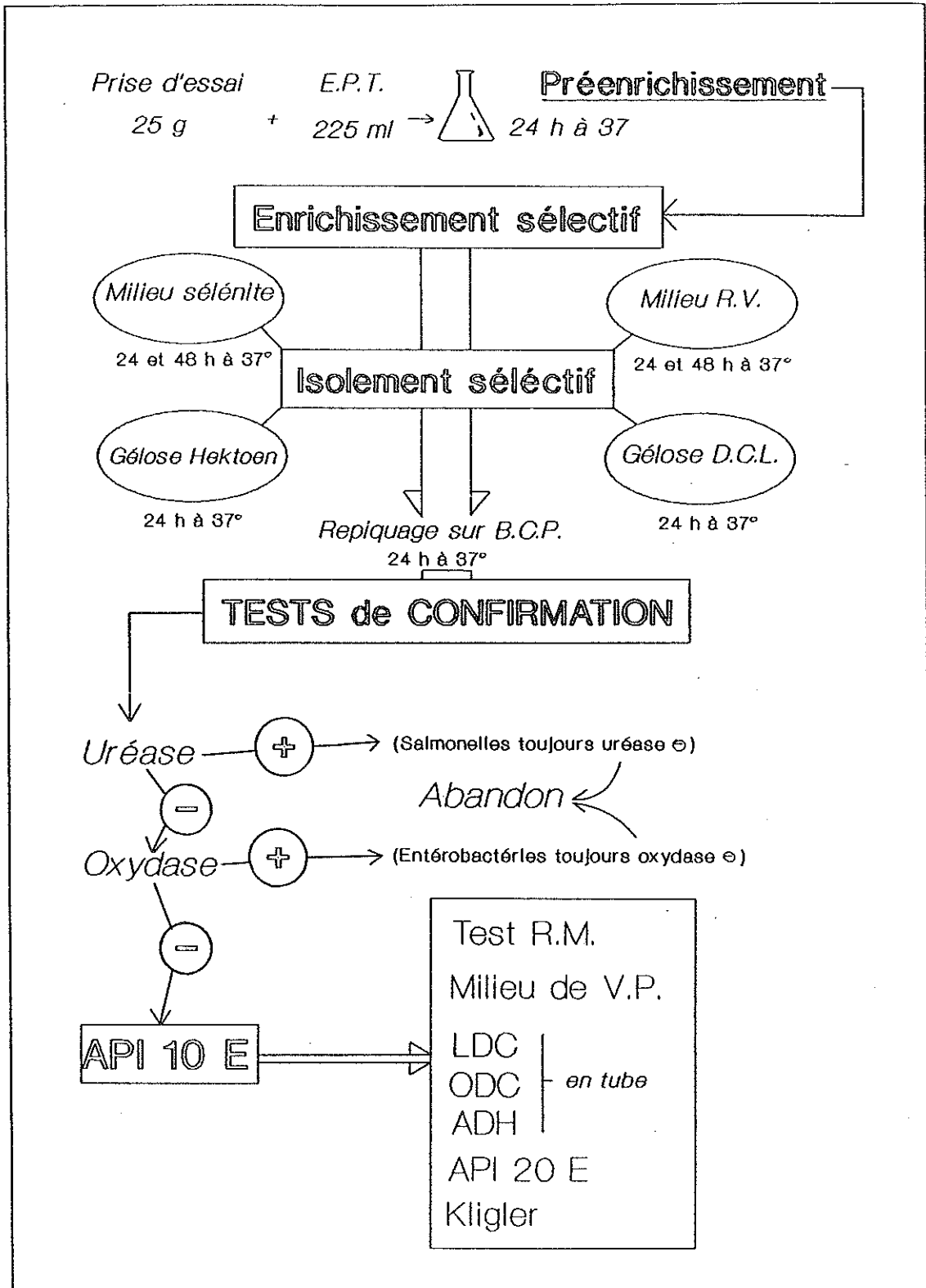


Fig. 19 : Recherche des Salmonelles

C/. Enrichissement sélectif :

Lorsque la prise d'essai contient des Salmonelles, celles-ci ne sont souvent présentes, qu'en petit nombre, et accompagnées d'un grand nombre d'autres germes, dont la croissance est beaucoup plus facile et rapide que celle des salmonelles.

Les milieux d'enrichissement sélectifs ont donc pour but l'inhibition des bactéries à Gram + et l'inhibition la plus complète pour les coliformes et entérobactéries autres que Salmonelles. Il est toujours ensemencé deux milieux d'enrichissement sélectifs différents, qui sont examinés après une incubation de 24 et 48 heure à 37°c.

1/. Bouillon de RAPPAPORT-VASSILIADIS :

**Formule :** (en g/l d'eau distillée)

<i>Tryptone</i> .....	5
<i>Chlorure de sodium</i> .....	8
<i>Phosphate dipotassique</i> .....	0,8
<i>Chlorure de magnésium</i> .....	40
<i>Vert malachite</i> .....	0,036

**Remarque :** La forte concentration en chlorure de magnésium permet de freiner la croissance des autres germes, le vert malachite inhibe la croissance des *Shigella*.

2/. Le milieu au sélénite :

**Formule :** (en g/l d'eau distillée)

<i>Pastone</i> .....	5
<i>Lactose</i> .....	4
<i>Phosphate disodique</i> .....	10
<i>Sélénite acide de sodium</i> .....	4

D/. Isolement et identification :

A partir des colonies obtenues, après 24 et 48 heures d'incubation, sur les milieux d'enrichissement sélectifs, deux milieux sélectifs solides sont ensemencés (soit en tout 4 milieux), et incubés 24 heures à 37°c.

1/. La gélose HEKTOEN :

**Formule :** (en g/l d'eau distillée)

<i>Protéose peptone</i> .....	12
<i>Extrait de levure</i> .....	3
<i>Chlorure de sodium</i> .....	5
<i>Thiosulfate de sodium</i> .....	5
<i>Sels biliaires</i> .....	9
<i>Citrate de fer ammoniacal</i> .....	1,5
<i>Salicine</i> .....	2
<i>Lactose</i> .....	12
<i>Saccharose</i> .....	12
<i>Fuchsine acide</i> .....	0,1
<i>Bleu de bromothymol</i> .....	0,065
<i>Agar</i> .....	13



**Remarque :** Ce milieu inhibe totalement la croissance des bactéries à Gram positif et partiellement celle de *E. coli*. Ce milieu permet en outre de mettre en évidence la fermentation du lactose, du saccharose, et de la salicine, ainsi que la production d'H<sub>2</sub>S.

2/. La gélose D.C.L. : DESOXYCHOLATE CITRATE  
LACTOSE

Formulé par Leifson, et modifié par Hynes, ce milieu sélectif solide évite l'envahissement par les *Proteus*.

**Formule :** (en g/l d'eau distillée)

<i>Peptone bactériologique</i> .....	5
<i>Extrait de viande</i> .....	5
<i>Citrate de sodium</i> .....	8,5
<i>Thiosulfate de sodium</i> .....	5,4
<i>Citrate ferrique</i> .....	1
<i>Désoxycholate de sodium</i> .....	5
<i>Lactose</i> .....	10
<i>Rouge neutre</i> .....	0,02
<i>Agar</i> .....	12

E/. Confirmation :

A l'issue de l'isolement sur milieux solides, les colonies suspectes sont repiquées sur gélose B.C.P. (BromoCrésol Pourpre), et incubées 24 heures à 37°. C'est sur les

colonies obtenues sur les géloses B.C.P. que vont être pratiqués les tests biochimiques de confirmation :

1/. L'uréase rapide :

Les bactéries qui possèdent une uréase, sont capables, lorsqu'on les place dans un milieu contenant de l'urée, de transformer cette urée en carbonate d'ammonium, ce qui provoque une alcalinisation du milieu et le virage d'un indicateur (rouge de phénol).

L'uréase est un caractère biochimique qui permet de délaissier les colonies qui ne sont pas des colonies de Salmonelles, en effet les Salmonelles sont à 100 % uréase -. Les colonies uréase + seront définitivement écartées de la suite de l'analyse, ce qui permet de réduire le coût de celle-ci.

Le test de l'uréase se pratique ainsi :

On place dans un tube à hémolyse 4 gouttes d'urée indole et la colonie suspectée d'être une Salmonelle. Il est indispensable de faire un témoin positif, à l'aide d'une colonie de *Proteus* (toujours uréase +). Les tubes sont placés à 37°, la lecture se fait 30 mn après le virage du témoin *Proteus*.

2/. Recherche de l'oxydase :

Ce test permet de vérifier que les colonies suspectées d'être des Salmonelles (uréase -), sont bien des colonies d'Entérobactéries. Les Entérobactéries sont en effet toujours oxydase -.

Le principe de la recherche de l'oxydase repose sur la présence d'une cytochrome oxydase (dernière enzyme intervenant dans la phosphorylation oxydative) qui se

manifeste par action sur un substrat incolore : la diméthyl-para-phénylène diamine oxydée en semiquinone de couleur bleue.

La recherche de l'oxydase se pratique ainsi :

La colonie à tester est déposée sur un disque de papier réactif (préalablement mouillé); si le germe est oxydase + le papier vire au violet.

### 3/. Ensemencement d'une galerie API 10 E :

Seules les colonies toujours suspectées d'être des Salmonelles seront ensemencées, c'est à dire celles qui sont uréase - et oxydase -.

La galerie API 10 Enterobacteriaceae, est une galerie de 10 tubes, qui permet de rechercher 10 caractères biochimiques :

#### a/. ONPG : OrthoNitroPhénylGalactopyranoside

Ce test permet de rechercher la présence d'une bêta galactosidase bactérienne, le principe est le suivant :

#### *galactosidase*

Toluène + ONPG -----> galactose +  
Orthonitrophénol  
(couleur jaune)

#### b/. ADH : Arginine DesHydrogénase

Le substrat utilisé est une solution d'arginine monohydrochlorhydrate, l'action de l'arginine déshydrogénase sur le substrat entraîne une augmentation du pH du milieu,

et le virage de l'indicateur (bromocrésol pourpre) au rouge orangé. Le tube est recouvert d'une couche d'huile de paraffine stérile, qui place la bactérie en anaérobiose.

c/. LDC : Lysine DéCarboxylase

Le principe est le même que celui de la recherche de l'arginine déshydrogénase, le substrat est ici une solution de lysine monochlorhydrate. Le tube est également recouvert d'une couche d'huile de paraffine. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge orangé.

d/. ODC : Ornitine DéCarboxylase

Même principe, avec une solution d'ornitine dihydrochlorhydrate.

e/. CIT : CITrate

Ce test permet de savoir si la bactérie utilise l'ion citrique comme seule source de carbone, le milieu contient du citrate de sodium. Si le germe pousse, il y a libération d'ammoniaque, alcalinisation du milieu, et virage de l'indicateur (bleu de bromothymol) au bleu/vert. La cupule doit être également remplie.

f/. H<sub>2</sub>S :

Ce test met en évidence la production d'H<sub>2</sub>S, le milieu contient du thiosulfate de sodium, et du sulfate ferreux. L'H<sub>2</sub>S produit par la bactérie, réduit le sulfate de fer en sulfure de fer, qui se traduit par un dépôt noir. Le milieu est placé en anaérobiose.

g/. URE : Urée

Ce test est une vérification de l'uréase faite au préalable, le principe en est le même. Le milieu est placé en anaérobiose.

h/. TDA : Tryptophane désaminase

Le recherche d'une tryptophane désaminase utilise un milieu contenant du L tryptophane, le tryptophane est transformé en indol-pyruvique. La mise en évidence de l'indol-pyruvique se fait par révélation à l'aide d'une solution de perchlorure de fer (à 3,4 %). Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur marron foncé

i/. IND : Production d'indole

Dans ce test le L Tryptophane est désaminé, puis hydrolysé jusqu'au stade indol. La mise en évidence de l'indol se fait par le réactif de KOVACS. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge (en 2 mn).

*Composition du réactif de KOVACS :*

<i>paradiméthylaminobenzaldéhyde</i> .....	<i>5 g</i>
<i>alcool isoamylique</i> .....	<i>75 ml</i>
<i>HCl (37 %)</i> .....	<i>25 ml</i>

j/. VP : Réaction de Voges-Proskauer :

Le substrat utilisé est du pyruvate de sodium, transformé en acétoïne. La mise en évidence de l'acétoïne se fait par adjonction de deux réactifs (Hydroxyde de potassium + alpha naphthol), et l'apparition d'une coloration rose

franche (en 10 mn) indique une réaction positive. La cupule doit être également remplie.

RESULTATS :

Les résultats de la galerie API 10 E sont les suivants

Pour *Salmonella spp* :

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
-	V	+	+	V	+	-	-	-	-
3	69	96	95	75	85	0	0	0	0

*% de positifs*

La suite de l'analyse ne concernera que les colonies ayant obtenues les résultats correspondant à *Salmonella spp*.

4/. Test du rouge de méthyle :

Ce test permet d'étudier le type de fermentation (devenir du pyruvate) de la bactérie. Il se fait sur le milieu de Clark et Lubs après trois jours de culture, et consiste en une mesure de pH, le rouge de méthyle vire au rouge pour un pH inférieur à 5 dans le cas d'une fermentation acide mixte, et reste incolore dans le cas d'une fermentation butylène-glycolique. Ce milieu sera incubé à deux températures différentes : 22 et 37°.

5/. Réaction de Voges-Proskauer :

Cette réaction est identique à celle de la galerie API 10 E, elle est refaite en tube, et incubée à deux températures différentes : 22 et 37°.

6/. Test : LDC, ODC, ADH

Ces tests sont identiques à ceux de la galerie API 10 E, ils sont refaits en tubes et incubés à 37°.

7/. Milieu de KLIGLER :

Composition du milieu : (en g/l d'eau distillée)

<i>Extrait de viande de boeuf</i> .....	3
<i>Extrait de levure</i> .....	3
<i>Peptone</i> .....	20
<i>NaCl</i> .....	5
<i>Glucose</i> .....	1
<i>Lactose</i> .....	10
<i>Citrate ferrique</i> .....	0,3
<i>Hyposulfite de sodium</i> .....	0,3
<i>Agar</i> .....	12
<i>Rouge de phénol</i> .....	0,05

L'ensemencement de ce milieu, se fait en striessur la pente, et en profondeur en piquant jusqu'au fond du tube. Le glucose est préférentiellement utilisé par la bactérie dans un premier temps (apparition d'une couleur jaune par acidification), si la bactérie utilise le lactose, l'acidité est vite neutralisée du fait de la dégradation des peptones et des acides aminés (en aerobiose = production d'ammoniaque), revirage au rouge; La production d'H<sub>2</sub>S, se manifeste par l'apparition de sulfure de fer noir.

*Lactose + : pente jaune*  
*Lactose - : pente rouge*  
*Glucose + : culot jaune*  
*Glucose - : culot rouge*  
*H<sub>2</sub>S + : dépôt noir*

Les salmonelles sont :

*Lactose - (pente rouge)*  
*Glucose + (culot jaune)*  
*H<sub>2</sub>S + (dépôt noir)*

8/. Ensemencement d'une galerie API 20 E :

La galerie API 20 E reprend les dix caractères biochimiques de la galerie API 10 E, et ajoute dix nouveaux tests :

a/. GEL : Gélatinase

La recherche de la gélatinase repose sur l'attaque par la bactérie de disques de gélatine contenant des grains de charbon de bois. Si la bactérie est gélatinase +, les grains de charbon sont libérés.

b/. Utilisation de différents glucides :

La galerie API 20 E, permet d'étudier l'attaque de 9 glucides :

\* *Glucose*  
\* *Mannose*  
\* *Inositol*



- \* *Sorbitol*
- \* *Rhamnose*
- \* *Saccharose*
- \* *Mélobiose*
- \* *Amilose*
- \* *Arabinose*

La dégradation du glucide mis en présence de la bactérie se traduit par une acidification du milieu, qui se manifeste par le virage d'un indicateur coloré (rouge de méthyle).

c/. Résultats de la galerie API 20 E :

Lorsque le germe recherché est une Salmonelle, les résultats seront les suivants :

----> pour les dix premiers caractères (cf API 10 E)

----> pour les dix nouveaux caractères :

GEL.	GLU.	MAN.	INO.	SOR.	RHA.	SAC.	MEL.	AMI.	ARA.
-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
0	100	100	33	93	93	2	78	1	94

*% de souches de S. positives*

Ce n'est qu'à l'issue de tous ces tests de confirmation que le laboratoire peut conclure à la présence ou à l'absence de Salmonelles.

F/. Typage :

Dans la plupart des cas, le fait d'avoir trouvé une Salmonelle ne suffit pas, et il est nécessaire de sérotyper la souche de salmonelles obtenue. Le sérotypage permet de savoir à quels sérotypes (ou sérovars), appartient la salmonelle étudiée, il existe actuellement plus de 2000 sérotypes, qui possèdent chacun une formule antigénique différente.

1/. Structure antigénique de Salmonelles :

Les Salmonelles sont des Entérobactéries, elles peuvent donc posséder trois types d'antigènes d'intérêt diagnostique.

*a/. Antigènes somatiques "O" :*

Ce sont les antigènes de la paroi, il sont dits majeurs lorsqu'ils sont caractéristiques d'un groupe, par exemple l'antigène O9 pour le groupe D (cf schéma de Kauffmann-White), ils sont mineurs lorsqu'on les retrouve dans des groupes différents. Ces antigènes "O" sont responsables d'agglutinations lentes et fines.

*b/. Antigènes d'enveloppe "Vi" :*

Ces antigènes sont peu répandus chez les Salmonelles, lorsqu'ils sont présents, ils masquent l'agglutination "O". Il est alors nécessaire de chauffer la suspension bactérienne. L'antigène "Vi" n'est connu que sur trois sérotypes : *S. typhi*, *S. paratyphi C*, *S. dublin*.

*c/. Antigènes flagellaires "H" :*

Ils correspondent à la présence de flagelles, et à la mobilité de la Salmonelle, il existe deux éventualités quant à la spécificité de ces antigènes "H". Certains sérotypes de Salmonelles ne peuvent fabriquer des flagelles que d'une seule spécificité, dans ce cas, l'antigène est dit "monophasique". Mais la plupart des sérotypes de Salmonelles possèdent des antigènes "H" diphasiques, capables d'exprimer deux spécificités différentes : i ou 1,2.

Ces antigènes sont responsables d'agglutinations floconneuses, et d'apparition rapide.

*Remarque : Les formules antigéniques de sérotypes de Salmonelles les plus fréquents chez l'homme sont reproduits au tableau V, ce tableau correspond à un court extrait du schéma de KAUFFMANN-WHITE.*

2/. Typage des souches de Salmonelles :

La recherche des antigènes d'une salmonelle se fait par des réactions d'agglutination sur lame. Les bactéries sont émulsionnées dans des gouttes de différents sérums. La méthode est la suivante :

a/. Etude de l'agglutination "O" :

Pour l'entreprendre, il sera nécessaire de disposer de sérums pools anti-O, c'est à dire des sérums réunissant les agglutinines de différents groupes ("sérums mélanges"). La souche de salmonelle est émulsionnée dans une goutte de chacun de ces sérums mélanges, la lame est observée au dessus d'un miroir concave, l'examen de la lame est

## Tableau V :

Extrait du schéma de KAUFFMANN-WHITE

GROUPES	SÉROTYPE	ANTIGÈNES O	Vi	ANTIGÈNES H		
				phase 1	phase 2	
A	<i>S. paratyphi</i> A	1, 2, 12		a	—	
B	<i>S. paratyphi</i> B	1, 4, 5, 12		b	1, 2	
	<i>S. typhi murium</i>	1, 4, 5, 12		i	1, 2	
	<i>S. essen</i>	4, 12		gm	—	
	<i>S. coeln</i>	4, 5, 12		y	1, 2	
C C 1	<i>S. paratyphi</i> C	6, 7	+	c	1, 5	
	<i>S. cholerae suis</i>	6, 7		c	1, 5	
C 2	<i>S. cholerae suis</i> var. <i>kun-</i> <i>zendorf</i>	6, 7		—	1, 5	
	<i>S. bareilly</i>	6, 7		y	1, 5	
	<i>S. newport</i>	6, 8		eh	1, 2	
D	<i>S. bovis morbificans</i>	6, 8		r	1, 5	
	<i>S. typhi</i>	9, 12		+	d	—
	<i>S. enteritidis</i>	1, 9, 12			gm	—
	<i>S. dublin</i>	1, 9, 12			gp	—
<i>S. sendai</i>	1, 9, 12	a	1, 5			
<i>S. pullorum</i>	1, 9, 12	—	—	—		
E E 1	<i>S. meleagridis</i>	3, 10		eh	1w	
E 2	<i>S. anatum</i>	3, 10		eh	1, 6	
	<i>S. newington</i>	3, 15		eh	1, 6	
E 3	<i>S. binza</i>	3, 15		y	1, 5	
	<i>S. minneapolis</i>	(3) (15) 34	eh	1, 6		

Les antigènes marqués ( ) peuvent être absents.

renouvelé dans les 5 minutes si aucune agglutination n'a été décelée. Rappelons que l'agglutination "O" est une agglutination fine et lente. (*la composition des sérums pools anti-O est donnée au tableau VI*)

S'il se produit une agglutination avec un sérum mélange, il faudra dans un deuxième temps, tester la salmonelle avec chacune des agglutinines contenues dans le sérum pool anti-O, ceci grâce à l'utilisation de sérums monovalents.

*Remarque : Lorsque la salmonelle possède l'antigène "Vi", l'agglutination "O" n'apparaît pas, la salmonelle est dite "O" inagglutinable. Il est en effet nécessaire de chauffer la souche 1 heure au bain-marie à 60° c.*

#### b/. Etude de l'agglutination "H" :

Comme la recherche de l'agglutination "O", elle s'effectue en deux temps : recherche d'une agglutination avec des sérums mélanges anti-H (*Cf. Tableau VII*), puis recherche d'une agglutination avec chacun des sérums anti-H monovalents présents dans le sérum mélange qui a provoqué l'agglutination. Il est préférable d'utiliser des colonies de salmonelles issues de géloses assez humides (la mobilité est ainsi favorisée). Rappelons que l'agglutination "H" est une agglutination floconneuse, d'apparition plus rapide que l'agglutination "O".

Comme nous l'avons vu plus haut, chez certaines souches, les antigènes H peuvent être diphasiques (*Cf. Schéma de KAUFFMANN-WHITE*). L'Institut Pasteur Production fabrique des sérums anti-H pour inversion de phase, ils sont rajoutés à une gélose molle, et bloquent une phase, laissant l'autre s'exprimer. Après culture sur cette gélose, l'autre phase de l'antigène H, peut être testée par

Tableau VI :

Sérums anti-O "mélanges"

Sérums O "mélanges"	Contient les agglutinines des groupes	Antigène isomatique O correspondant
OMA	A, B, D, E, L	1, 2, 12 + 4, 5, 12 + 9, 12 + (9), 46 + 3, 10 + 1, 3, 19 + 21
OMB	C, F, G, H,	6, 7 + 6, 8 + 11 + 13, 22 + 13, 23 + 6, 14, 24 + (8), 20
OMC	I, J, K, M, N, O, P	16 + 17 + 18 + 28 + 30 + 35 + 38
OMD	Q, R, S, T, U, V, W	39 + 40 + 41 + 42 + 43 + 44 + 45
OME	X, Y, Z, 51 à 53	47 + 48 + 50 + 51 + 52 + 53
OMF		54 + 55 + 56 + 57 + 58 + 59
OMG		60 + 61 + 62 + 63 + 65 + 66 + 67

Tableau VII :

Sérums anti-H "mélanges"

Sérums H "mélanges"	Antigènes flagellaires correspondants
HMA	a + b + c + d + i + z10 + z29
HMB	e, h + e, n, x + G
HMC	k + y + z + L + Z4 + r
HMD	z35 + z36 + z38 + z39 + z41 + z42 + z44 + z60
HMIII (facteurs H du sous-genre III = <i>S. arizonae</i> )	z52 + z53 + z54 + z55 + z56 + z57 + z61

agglutination avec des sérums monovalents. Ce procédé est appelé inversion de phase.

c/. Etude de l'agglutination "Vi" :

Elle se fait à l'aide du sérum anti-Vi, rappelons que l'antigène Vi, n'est présent que très rarement.

La sérotypie d'une Salmonelle constitue bien souvent le terme de la recherche, elle est à la portée de tous les laboratoires, puisque sa mise en oeuvre est relativement facile, l'Institut Pasteur commercialise en effet tous les sérums nécessaires.

G/. Le lysotypage :

Lors d'enquêtes épidémiologiques, il est parfois utile de pousser plus loin les investigations. En effet, il existe plusieurs *Salmonella enteritidis* de lysotypes différents.

Comme la sérotypie faisait appel à la présence d'antigènes, la lysotypie utilise la présence sur la paroi bactérienne de récepteurs à bactériophages (48). Lorsque ces récepteurs sont présents, les phages se fixent sur la bactérie et lysent celle-ci.

Seuls les laboratoires spécialisés possèdent les lots de bactériophages, et sont capables de lysotyper une bactérie. Les expérimentations rapportées plus bas, ont été faites avec une *Salmonella enteritidis* lysotype 33 (phage type 4 pour les anglo-saxons)

### III/. ETUDE DE LA SURVIE DE SALMONELLA ENTERITIDIS DANS LES OVOPRODUITS :

#### A/. Méthodologie :

Elle sera la même, quel que soit l'aliment étudié (oeufs, omelettes, mayonnaises). Les produits testés seront artificiellement contaminés, puisqu'il est impossible de travailler avec des aliments infectés naturellement.

#### 1/. Préparation de la suspension de S.E.:

Nous utiliserons pour cela une souche de *Salmonella enteritidis* du laboratoire, lysotypée (lysotype 33), cette souche sera reprise 24 heures avant le début de nos expérimentations sur une gélose BCP, de façon à obtenir une assez grande quantité de bactéries. L'intégralité des colonies obtenues sur la gélose BCP, seront mises en suspension dans une quantité de tryptone-sel permettant de préparer une suspension de S.E.. Le titre exact de cette suspension ne sera connu que 24 heures après, par dénombrement sur gélose PCA (Plate Count Agar).

#### 2/. Contamination du produit :

Les ovoproduits qui seront étudiés seront contaminés par cette suspension de S.E., le nombre de Salmonelles inoculées dépendra du type de produit, et de la manipulation.



### 3/. Dénombrement des S.E. :

Tout au long de notre étude, nous aurons besoin de compter les salmonelles :

- pour connaître la concentration exacte de notre suspension de départ

- pour suivre l'évolution du nombre de bactéries mises volontairement dans les produits.

Le dénombrement des S.E. se fera sur la gélose P.C.A. (Plate Count Agar) :

Composition : (en g/l d'eau distillée)

<i>Peptone</i> .....	5
<i>Extrait de levure</i> .....	2,5
<i>Agar</i> .....	15
<i>Glucose</i> .....	1

*Utilisation de la gélose P.C.A. :*

Il est préalablement préparé une série de dilutions décimales du produit à étudier. Une gélose PCA est ensemencée avec 0,1 ml de chacune de ces dilutions. L'ensemble des géloses PCA est incubé 24 heures à 37°, la gélose utilisée pour le dénombrement, sera celle qui comportera entre 30 et 300 colonies.

Le nombre de germes contenus dans la suspension sera égal au nombre de colonies comptées multiplié par la dilution.

*EXEMPLE :*

180 colonies comptées sur la boîteensemencée par 0,1 ml de la dilution à  $10^{-4}$ , correspondent à  $1,8 \cdot 10^7$  bactéries par ml de produit pur.

B/. Expérimentation sur les Mayonnaises :

Comme nous l'avons détaillé dans la deuxième partie, les mayonnaises constituent l'aliment le plus fréquemment mis en cause lors des foyers de T.I.A.C. à *Salmonella enteritidis*, avec une fréquence atteignant les 26,6 % (6). Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'évolution de *Salmonella enteritidis*, dans les mayonnaises. L'étude reportée ci-dessous a été menée au Laboratoire départemental de la Haute-Vienne au début du mois de Février 1991.

1/. Méthode :

Une suspension de *Salmonella enteritidis* est réalisée puis numéree, la solution qui servira à contaminer les mayonnaises contient :

$2 \cdot 10^8$  SE/ml.

La mayonnaise préparée (oeuf + moutarde + huile), est volontairement contaminée par 1 ml de la suspension de *Salmonella enteritidis* pour 100 ml de mayonnaise, la concentration de SE dans la mayonnaise sera donc de  $2 \cdot 10^8$  SE/ml. Il est ainsi préparé quatre flacons de 100 ml de mayonnaise :

- flacon n°1 : sans vinaigre

- flacon n° 2 : 1 ml de vinaigre
- flacon n° 3 : 2 ml de vinaigre
- flacon n° 4 : 5 ml de vinaigre

Ces flacons sont conservés à température ambiante, un prélèvement est fait sur chaque flacon aux temps suivants : T0 (contamination de la mayonnaise), T+1h, T+2h, T+3h, T+4h, T+5h, T+24h.

Les résultats présentés au tableau VIII, correspondent à la moyenne des valeurs obtenues lors de 3 expérimentations identiques. Ces valeurs sont reprises à la figure n°20, sous forme de courbes.

## 2/. Résultats :

Il est facile de remarquer l'efficacité du vinaigre, dès 2 ml (pour 100 ml de mayonnaise), le nombre de bactéries chute très rapidement. *Salmonella enteritidis* semble être très sensible à l'abaissement de pH.

## C/. Expérimentation sur les Omelettes :

Dans la manipulation suivante, nous entendons par omelette le mélange du blanc et du jaune dans les proportions de l'oeuf.

### 1/. Méthode :

Les blancs et les jaunes d'oeufs sont battus au mixer, puis sont répartis dans des flacons en verre, chaque flacon

Tableau VIII :

*Résultats de l'expérimentation sur les mayonnaises*

n° 1 ---> sans vinaigre  
n° 2 ---> avec 1 ml de vinaigre  
n° 3 ---> avec 2 ml de vinaigre  
n° 4 ---> avec 5 ml de vinaigre

Temps	Echantillons :			
	1	2	3	4
To	6,3	6,5	6,3	6,3
T+1h	6,3	6,48	6,14	6,23
T+2h	6,23	6,47	5,78	6,15
T+3h	6,20	6,27	5,61	5,95
T+4h	6,25	6,46	5,39	5,84
T+5h	6	6,36	5,58	5,15
T+24h	6	6,17	4,57	4,44
	S. enteritidis/ml			

*(en logarithmes décimaux)*

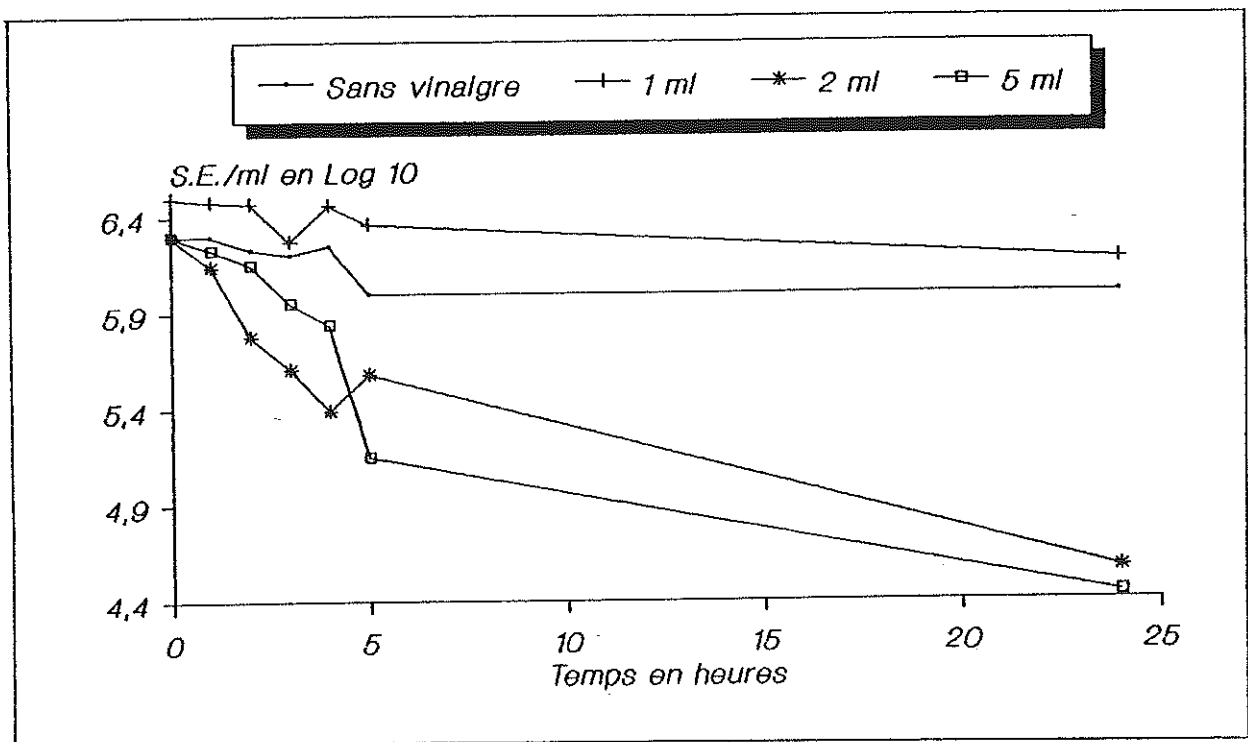


Fig. 20 : Survie de *S. enteritidis* dans les mayonnaises

reçoit 100 ml de mélange. Deux lots de 5 flacons sont préparés, le lot n°1 sera conservé à la température du laboratoire, le lot n°2 à + 4°C.

Les flacons du lot n°1 sont contaminés par 1 ml d'une suspension de *Salmonella enteritidis* à 100 S.E./ml, soit une concentration dans l'omelette de 1 SE/ml. Cette concentration se rapproche de celle observée dans les contaminations naturelles.

Les flacons du lot n°2 sont contaminés par 1 ml d'une suspension de *Salmonella enteritidis* à  $1.10^8$  SE/ml, soit une concentration dans l'omelette de  $1.10^7$  SE/ml. Une première expérience ayant montré la difficulté de compter les SE après quelques jours en chambre froide (nombre de SE en diminution constante), l'inoculum a été augmenté par rapport à celui utilisé pour le lot n°1.

Chaque jour, pendant 7 jours, un échantillon est prélevé par flacon, sur lequel les SE sont comptées.

## 2/. Résultats :

Les résultats sont donnés dans les tableaux IX et X, et sont traduits sous forme de courbes aux figures n°21 et n°22.

A la lecture de la courbe n°21, il est facile de remarquer

- l'absence de phase de latence, qui montre que l'oeuf est un milieu de culture parfaitement adapté à *Salmonella enteritidis*

- une phase exponentielle de croissance pendant les 48 premières heures, où le nombre de *Salmonella enteritidis* contenues par ml est multiplié par  $4,35.10^8$

- une phase de ralentissement de la croissance (J2-J3)

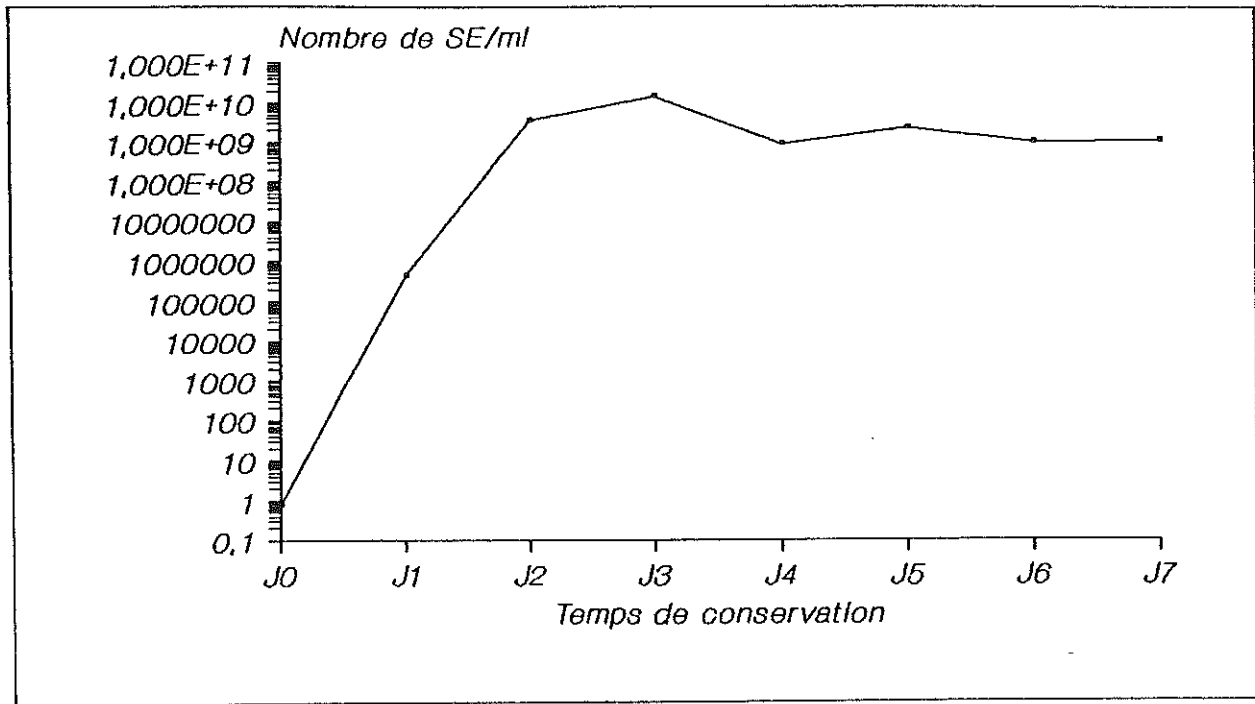


Fig. 21 : Evolution de *S. enteritidis*  
dans les omelettes  
à température ambiante

Tableau IX

Jours	Nombre de SE/ml
J0	0,79
J1	4,20 10 <sup>5</sup>
J2	3,44 10 <sup>8</sup>
J3	1,00 10 <sup>10</sup>
J4	0,86 10 <sup>9</sup>
J5	2,20 10 <sup>9</sup>
J6	1,00 10 <sup>9</sup>
J7	0,98 10 <sup>9</sup>

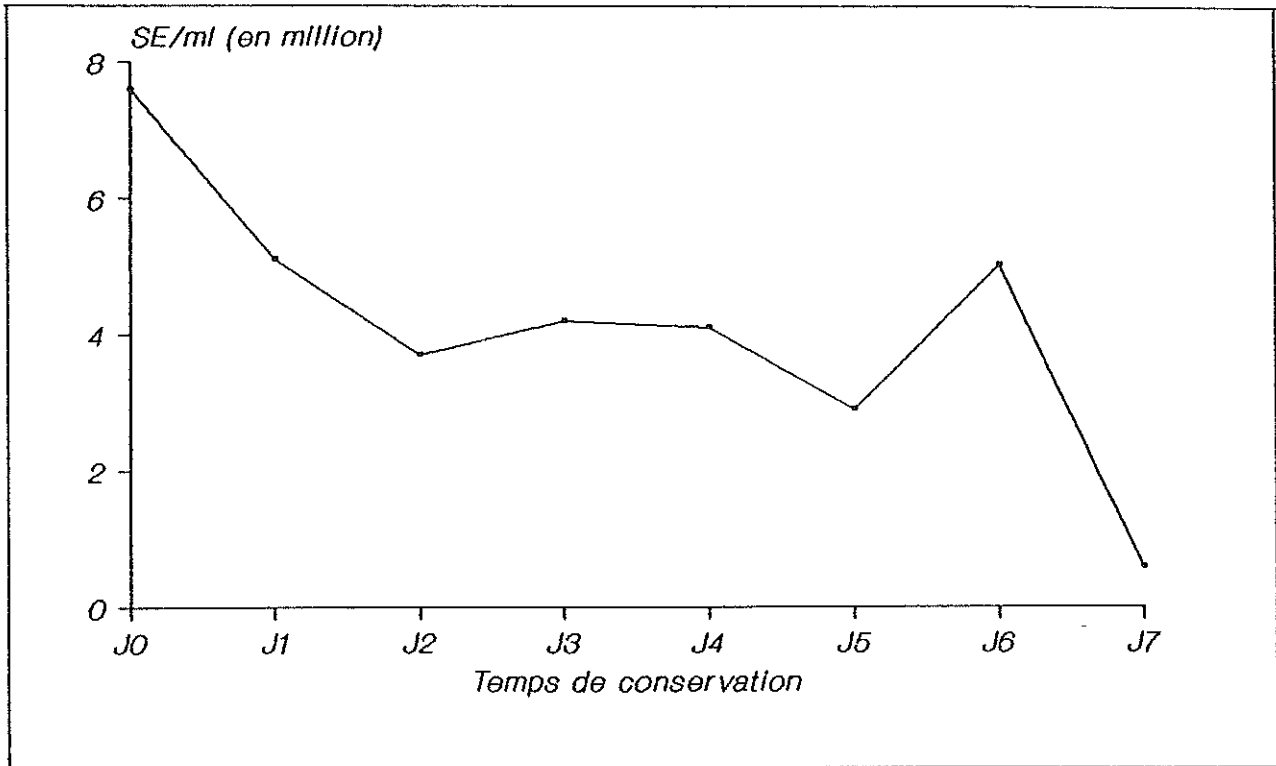


Fig. 22 : Evolution de *S. enteritidis* dans les omelettes conservées à + 4 c

Tableau X

Jours	Nombre de SE/ml
J0	0,76 10 <sup>7</sup>
J1	0,51 10 <sup>7</sup>
J2	0,37 10 <sup>7</sup>
J3	0,42 10 <sup>7</sup>
J4	0,41 10 <sup>7</sup>
J5	0,29 10 <sup>7</sup>
J6	0,50 10 <sup>7</sup>
J7	0,14 10 <sup>7</sup>



- une phase stationnaire liée à l'accumulation de déchets et au surpeuplement (J4-J7).

La courbe n°22, nous montre l'évolution de *Salmonella enteritidis* dans les omelettes conservées à + 4°C, le nombre de germes n'augmente pas et aurait même tendance à diminuer  $J_0 = 0,76.10^7$  --->  $J_7 = 0,14.10^7$ .

D/. Expérimentation sur le blanc et le jaune séparés :

1/. Méthode :

Les jaunes sont séparés des blancs avec précaution. Quatre flacons de 100 ml sont préparés : 2 de blanc et 2 de jaune. La contamination est assurée par une suspension de *Salmonella enteritidis* (préalablement dénombrée). La contamination est de  $10^4$  SE par ml de blancs d'oeufs, et 1700 SE par ml de jaunes d'oeufs.

Ces flacons sont conservés à la température du laboratoire pendant 5 jours, une numération de *Salmonella enteritidis* est pratiquée sur chaque flacon, toutes les 24 heures.

2/. Résultats :

Les résultats sont ordonnés dans le tableau XI, et traduits sous forme de graphiques à la figure n°23.

La courbe de croissance de *Salmonella enteritidis* dans le jaune d'oeuf ressemble à la courbe de croissance de *Salmonella enteritidis* dans les omelettes (blanc et jaune mélangés), avec une phase de croissance exponentielle, puis une phase stationnaire.

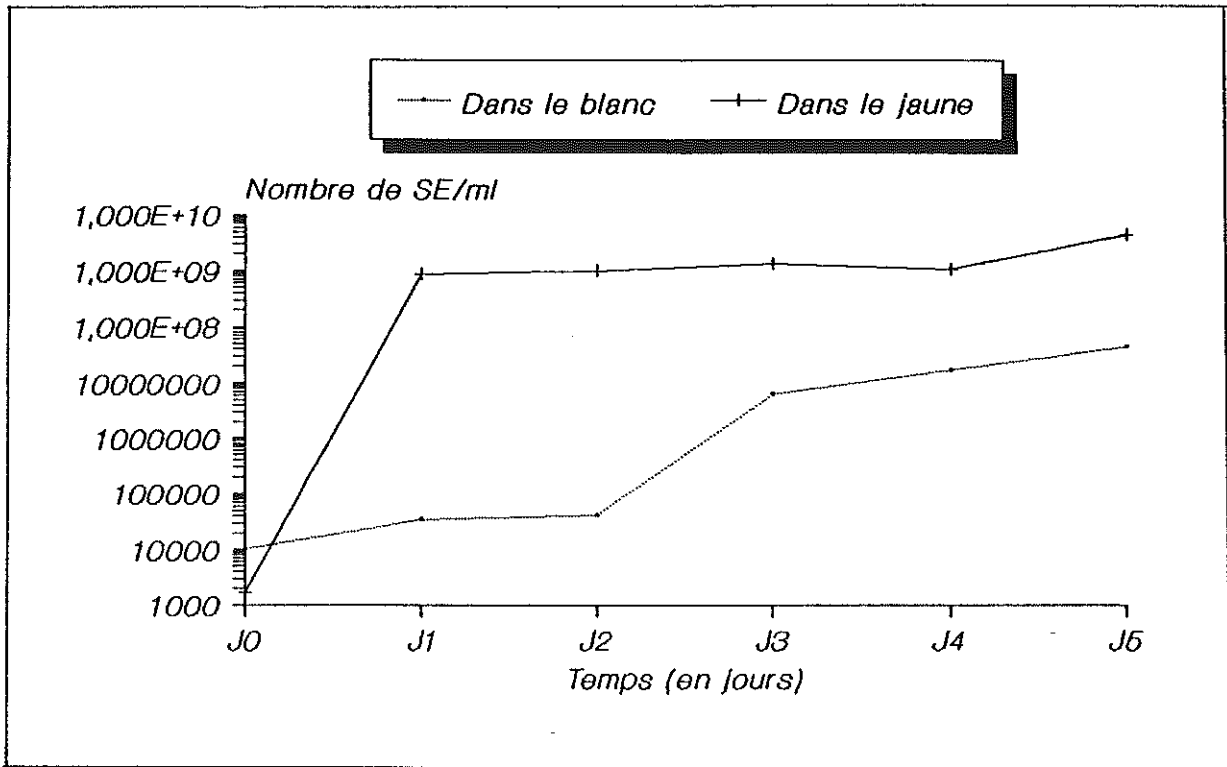


Fig. 23 : *S. enteritidis* dans l'oeuf  
(Blanc et jaune séparés)

Tableau XI

Jours	Nombre de SE/ml	
	Blanc	Jaune
J0 .....	1,0 10 <sup>4</sup>	1700
J1 .....	3,4 10 <sup>4</sup>	8,75 10 <sup>8</sup>
J2 .....	4,1 10 <sup>4</sup>	1 10 <sup>9</sup>
J3 .....	6,5 10 <sup>5</sup>	1,33 10 <sup>9</sup>
J4 .....	1,75 10 <sup>7</sup>	1,1 10 <sup>9</sup>
J5 .....	4,55 10 <sup>7</sup>	4,6 10 <sup>9</sup>

A l'inverse, le blanc d'oeuf ne semble pas constituer un excellent milieu de culture pour *Salmonella enteritidis*, en 5 jours, le nombre de *Salmonella enteritidis* a été multiplié par 4550 alors que dans le même laps de temps, le nombre de *Salmonella enteritidis* présentes dans le jaune a été multiplié par  $2,7.10^6$ .

E/. Mise en évidence du pouvoir bactériostatique du lysozyme de blanc d'oeuf :

Les résultats de l'étude précédente (*blancs et jaunes séparés*), nous ont montré que le blanc d'oeuf ne favorisait pas la croissance de *Salmonella enteritidis*. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la composition du blanc d'oeuf, afin de savoir quel composé présentait un pouvoir bactériostatique.

1/. Composition du blanc d'oeuf :

Le tableau XII donne la composition du blanc d'oeuf (en grammes pour 100 grammes de blanc).

Le blanc est composé en grande partie d'eau et de protéines, il renferme également du glucose libre (*deux fois plus concentré que dans le plasma sanguin*), ce glucose constitue une source d'énergie pour l'embryon.

Le tableau XIII détaille les principales protéines du blanc d'oeuf, en grammes pour 100 grammes de matière sèche du blanc. Chaque protéine est connue pour des propriétés spécifiques, fonctionnelles ou nutritionnelles :

\* *les ovalbumines, acquièrent lors du chauffage une forte rigidité, elles sont responsables de la coagulation du blanc d'oeuf.*

Tab. XII : Composition de l'oeuf

En g pour 100 g		
	BLANC	JAUNE
Eau	87,0 à 89,0	46,5 à 49,0
Matière sèche	11,0 à 13,0	51,0 à 53,5
Protéines	9,5 à 11,5	16 à 17
Lipides :		33 à 34
Saturés		11,2 à 11,7
Insaturés		18,2 à 19,0
Cholestérol		1,31 à 1,38
Glucides	0,4 à 0,5	0,15 à 0,25
Cendres	0,4 à 0,7	1,1 à 1,6

Tab. XIII : Composition du blanc

Protéines du blanc d'oeuf (en % de la matière sèche)			
Ovalbumine .....	54	Ovomucines.....	1,5
Conalbumine .....	13	Flavoprotéines ....	0,8
Ovomucoïdes .....	11	Avidine .....	0,05
Ovoglobuline .....	8	Autres protéines ..	8,5
Lysozyme .....	3,5		

\* Les globulines et le lysozyme permettent la formation de mousse (propriété tensioactive)

\* l'ovomucine joue le rôle de stabilisateur de mousse.

\* Les conalbumines fixent le fer et les flavoprotéines

\* L'avidine est une anti-biotine (à l'état cru seulement)

\* Les ovomucoïdes sont des inhibiteurs de la trypsine

\* Le lysozyme a une action hydrolysante des parois bactériennes.

A la vue de la composition protéique du blanc d'oeuf, le lysozyme semble être le composé soupçonné de ralentir la croissance de *Salmonella enteritidis*.

2/. Le lysozyme de blanc d'oeuf :

a/. Nature et structure :

Le lysozyme de blanc d'oeuf est une holoprotéine basique (pHi de 10,5 à 11), son poids moléculaire est de 14600. Cette protéine est formée de 129 acides aminés (49), la structure primaire du lysozyme est reproduite figure n°24.

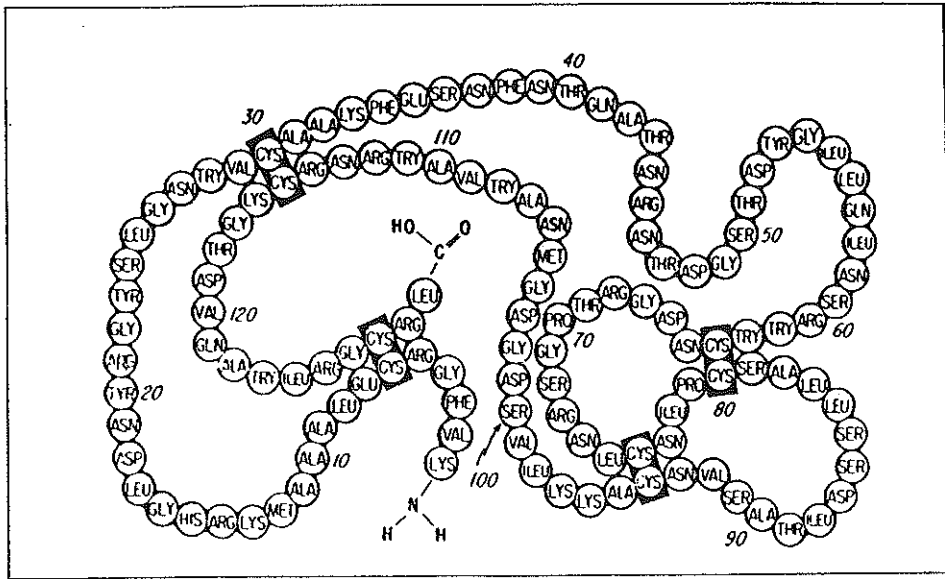


Fig. 24 : La molécule de lysozyme

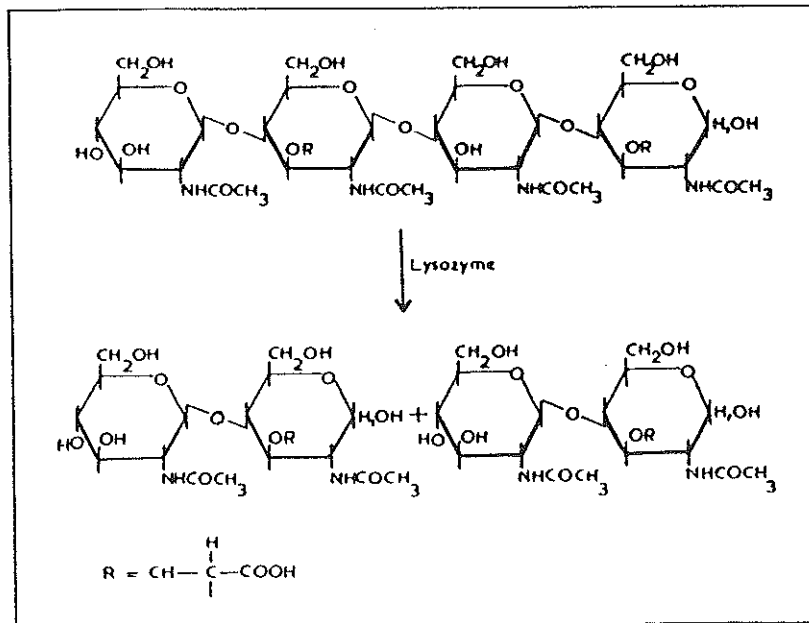


Fig. 25 : Action du lysozyme

b/. Activité du lysozyme :

Le lysozyme de blanc d'oeuf, est une enzyme capable d'hydrolyser les liaisons glycosidiques Bêta <1-4> (50) des composés de la paroi bactérienne.

**RAPPELS :**

*La paroi des bactéries est formée par un polymère macromoléculaire appelé : Peptidoglycane. Ce peptidoglycane est composé de chaînes polysaccharidiques reliées entre elles par de courts peptides, les chaînes polysaccharidiques sont formées par l'alternance de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique.*

Le lysozyme s'attaque à la liaison Bêta <1-4> de :  
(Cf. figure n°25)

Acide N-acétyl-D muramique

<1-4>

L acétyl-amino-2 désoxy D glucose

*glucosamine*

C'est parce qu'il catalyse l'hydrolyse de ce type de liaisons, que le lysozyme de blanc d'oeuf est capable d'endommager la paroi des bactéries, et présente une activité bactéricide sur certains types de bactéries .

c/. Activité du lysozyme sur les bactéries à Gram négatif :

Le lysozyme de blanc d'oeuf ne provoque directement la lyse que d'un très petit nombre d'espèces bactériennes (à Gram positif), appartenant aux genres *Sarcina* (*Micrococcus lysodeikticus*) et *Bacillus* (*Bacillus megaterium*) (50,51,52).

Il est bien connu aujourd'hui que les bactéries à Gram négatif, renferment elles aussi dans leur paroi un substrat de cette enzyme. Mais la différence de structure des parois qui existe entre les bactéries à Gram négatif et Gram positif explique pourquoi ce substrat n'est pas directement accessible au lysozyme chez les bactéries à Gram négatif.

La paroi est en effet entourée d'une enveloppe externe de nature lipidique (lipopolysaccharides = endotoxines), qui masque le peptidoglycane.

Dés 1957, Colobert (50) a montré qu'une solution de lysozyme à  $20 \cdot 10^{-6}$  g/cm<sup>3</sup> n'altérerait nullement la paroi de *Salmonella typhi*, mais qu'il n'en était pas de même, si les bactéries mises en suspension dans du tampon phosphate pH 7,2 étaient chauffées à 100°C pendant 10 minutes.

Ce chauffage permet en effet de décoller l'enveloppe externe de nature lipidique présente chez les bactéries à Gram négatif. Le lysozyme peut alors se fixer sur son substrat (*alors accessible*) et le détruire.

En 1986, Le Gros (53) a mesuré l'efficacité du lysozyme de blanc d'oeuf sur différents sérotypes de salmonelles, et défini les conditions de son utilisation.

Il apparait que les *Salmonella* ne sont sensibles au lysozyme qu'après avoir été traitées par le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (*Na<sub>2</sub>EDTA*).



Cette étude montre en outre l'influence : de la température et de la durée de contact sur l'intensité de la bactéricidie. Il apparaît également que des salmonelles de sérotypes différents présentent des sensibilités différentes à l'égard du lysozyme et cela en raison de légères différences dans la composition du peptidoglycane.

### 3/. Etude de l'action du lysozyme sur *Salmonella enteritidis*

Comme il est expliqué plus haut, il est maintenant bien fondé que les salmonelles sont sensibles au lysozyme de blanc d'oeuf après délipidation de leur paroi.

Il nous a paru intéressant de soumettre *Salmonella enteritidis* à l'action du lysozyme sans avoir pratiqué de délipidation, de façon à se replacer dans des conditions de contamination naturelle.

#### a/. Méthodologie :

Le but de cette manipulation est de placer *Salmonella enteritidis* dans les mêmes conditions, que lors de notre expérience sur le blanc d'oeuf. Le lysozyme utilisé est du lysozyme pur cristallisé, préparé à partir de blanc d'oeuf (SIGMA Chemical Company Ref L-6876). Une solution de lysozyme a donc été préparée (54) :

<i>Lysozyme</i> .....	4 g
<i>NaCl</i> .....	5,85 g
<i>Glucose</i> .....	5 g
<i>Eau</i> .....	985,15 g

Les 5 grammes de glucose correspondent à la concentration du blanc d'oeuf en glucides (*Cf. Tableau XII*), l'adjonction de NaCl permet de donner à la solution une force ionique comparable à celle du blanc d'oeuf. La force ionique est un paramètre important de la réaction enzymatique.

La solution est répartie dans deux tubes (9 ml par tube). Parallèlement, il est préparé une solution de glucose et de NaCl (*aux mêmes concentrations*), mais sans lysozyme (*tubes témoins*), qui est répartie dans deux autres tubes (9 ml par tube).

A chacun de ces 4 tubes, 1 ml d'une suspension de *Salmonella enteritidis* à  $5 \cdot 10^5$  SE/ml est rajouté, soit une concentration dans le tube de  $5 \cdot 10^4$  SE/ml.

Toutes les deux heures, les Salmonelles sont numérees dans chacun des quatres tubes, les résultats sont ordonnés dans le tableau XIV.

b/. Résultats :

La figure n°26 représente les courbes de croissance de *Salmonella enteritidis* dans les deux types de solutions (avec et sans lysozyme). Il est aisé de remarquer que les salmonelles en l'absence de lysozyme, présentent une courbe de croissance "normale", avec une phase de latence, puis une phase exponentielle.

Il en est autrement lorsque les salmonelles sont en contact avec le lysozyme, la multiplication des salmonelles est ralentie, avec en fin d'expérience (à la 8e heure) une différence de population qui atteint une puissance de 10.

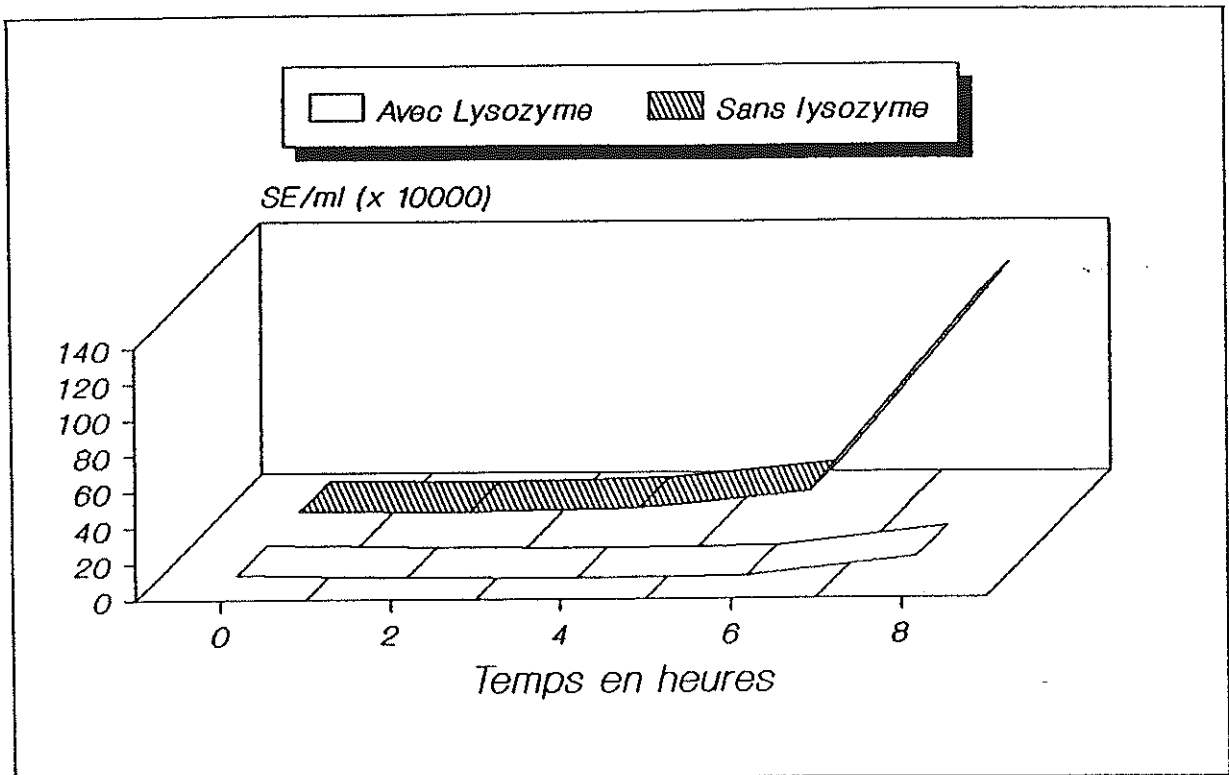


Fig. 26 : Activité du lysozyme de blanc d'oeuf sur *S. enteritidis*

Tableau XIV

Temps (en h)	n° TUBE			
	1	2	3	4
	(SE/ml x 10 <sup>4</sup> )			
T <sub>0</sub>	4,9	4,6	4,6	5,2
T + 2	2,3	4,4	3,5	5,4
T + 4	2,7	2,3	6,7	6,2
T + 6	3,5	3,6	10,8	20
T + 8	15	14	150	100
	<i>avec Lysozyme</i>		<i>sans Lysozyme</i>	

#### IV/. DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS :

##### A/. Notion de dose infectante :

*Salmonella enteritidis* est une bactérie pathogène, mais l'ingestion d'une seule bactérie ne déclenche pas l'apparition de la pathologie, le nombre de germes ingérés est le facteur le plus important.

L. Le Minor propose comme dose infectante un nombre de salmonelles de l'ordre du million (18), la quantité de germes qui déclenche l'apparition d'une toxi-infection alimentaire, est de plus, variable d'une souche à l'autre (en fonction de la virulence), elle varie aussi en fonction de la sensibilité des individus.

Il est important de rappeler que dans les oeufs contaminés par *Salmonella enteritidis*, le nombre de bactéries retrouvées juste après la ponte est très faible (8)(45) (inférieur à dix bactéries/oeuf).

La consommation de tels oeufs (très faiblement contaminés) ne constituerait pas un réel danger, mais comme nous l'avons montré, le nombre de *Salmonella enteritidis* présent dans l'oeuf, augmente considérablement lorsque ces oeufs contaminés sont soumis à différentes conditions de conservation ou d'utilisation.

##### B/. Multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les oeufs :

Le jaune d'oeuf constitue un excellent milieu de culture pour *Salmonella enteritidis*, sa composition (Cf tableau XII) riche en nutriments, permet une croissance très rapide.

Une faible contamination du jaune (1 bactérie/ g d'oeuf) se transforme, en l'espace de 24 heures à température ambiante en une dose dangereuse de salmonelles (+ d'1 million de SE/g).

T.J. Humphrey rapporte, dans un article au World's Poultry Science (8), les résultats d'une étude, montrant que la conservation à température ambiante d'un oeuf volontairement contaminé avec un inoculum de 5 bactéries, avait favorisé la multiplication des germes. Deux jours seulement après la contamination, le nombre de bactéries retrouvées dans cet oeuf, atteignait  $10^{12}$ .

Notre expérimentation sur les omelettes, nous a permis de vérifier ce phénomène avec blancs et jaunes mélangés, la courbe de croissance de *Salmonella enteritidis* dans ce mélange est identique à celle observée dans le jaune seul.

Pourtant, le blanc ne favorise pas la multiplication de *Salmonella enteritidis*, malgré une conservation à température ambiante, les salmonelles éprouvent des difficultés à se multiplier dans le blanc d'oeuf, et la courbe de croissance de *Salmonella enteritidis* est très différente de celle observée dans le jaune.

Le blanc d'oeuf renferme du lysozyme, cette enzyme semble présenter un pouvoir bactériostatique sur *Salmonella enteritidis*, bien que son action sur la paroi des bactéries soit entravée par la présence d'une enveloppe lipopolysaccharidique.

C/. Influence de la température :

1/. Température de stockage :

Il n'est pas besoin de rappeler que *Salmonella enteritidis* fait partie des germes mésophiles, nous avons montré plus haut que la température ambiante permettait une multiplication très rapide de cette bactérie.

En revanche il est intéressant de remarquer l'efficacité du froid sur les cultures de *Salmonella enteritidis*. A une température de + 4°C (chambre froide), la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les omelettes est totalement bloquée, et nous avons montré que dans un produit même fortement contaminé (8 millions de SE/g), le nombre de *Salmonella enteritidis* avait tendance à diminuer lors d'une conservation à basse température.

Ces constatations seront d'une importance capitale lorsque nous évoquerons les solutions à envisager pour enrayer la montée des TIAC à *Salmonella enteritidis*.

2/. Température de cuisson :

La température de cuisson influence directement la survie de *Salmonella enteritidis* dans les oeufs et les aliments à base d'oeuf. La température atteinte pendant la cuisson, dépend du mode de cuisson et du temps de cuisson. Nous n'avons pas procédé à des essais en laboratoire, car la littérature est abondante sur la résistance des salmonelles à la chaleur (55).

En 1989, T.J. Humphrey (56) a étudié l'influence de différents modes de cuissons des oeufs (à la coque, au

plat...), sur la survie des salmonelles. Il a mesuré les températures atteintes au coeur des aliments, les résultats sont donnés dans le tableau XV.

Les températures atteintes au coeur de l'aliment conditionnent l'efficacité d'un mode de cuisson. Le pourcentage de survie de *Salmonella enteritidis* est en effet inversement proportionnel à cette température ainsi qu'à la durée de la cuisson.

Déjà en 1965 J.J. Licciardello et son équipe (57), avait mesuré la température atteinte dans des oeufs cuits durs, en fonction du temps de cuisson. Il apparait que la taille de l'oeuf constitue un paramètre supplémentaire.

La température au coeur d'un oeuf trempé dans de l'eau bouillante, augmente proportionnellement avec la durée de l'immersion.

Pour un oeuf de taille moyenne, la température maximum atteinte est de 72 °C, avec 10 minutes de cuisson alors qu'elle n'est que de 68°C pour un oeuf de gros calibre placé dans les mêmes conditions.

Les solutions préventives passeront sans doute, par la mise à l'écart de certains modes de cuisson (à la coque...), qui ne permettent pas d'atteindre une température suffisante.

#### D/. Influence du pH :

Nous avons étudié l'efficacité de ce dernier paramètre lors de notre expérimentation sur les mayonnaises. Il apparait qu'à partir de 2 ml de vinaigre (pour 100 ml de produit), le nombre de *Salmonella enteritidis* contenues dans la mayonnaise décroît rapidement.

Tableau XV

<i>Différents modes de cuisson</i>			
	1	2	3
Durée de cuisson (en mn)	4	1,6	2,4
Température (en °C)	54	55,2	67,7
% de survie	90	100	55
1 --> A la coque 2 --> Au plat 3 --> Au plat (cuisson des deux cotés)			



L'adjonction d'une petite quantité de vinaigre, permet de rendre la mayonnaise plus sûre, avec 5 ml de vinaigre le pourcentage de *Salmonella enteritidis* détruites atteint 98,6 %, l'efficacité finale de cette technique culinaire, dépendra (comme pour toute stérilisation) de la quantité de *Salmonella enteritidis* présente dans les oeufs utilisés pour préparer la mayonnaise.

En 1989, au laboratoire de santé publique de Bilbao (Espagne), Perales et Garcia (58) ont étudié l'influence du pH sur la survie *Salmonella enteritidis* dans les mayonnaises "faites maison".

Ils ont montré que le vinaigre avait une activité bactéricide supérieure à celle du jus de citron. Un pH compris entre 3,6 et 4 (soit environ 6 ml de vinaigre à 6° pour 100 ml de produit) ainsi qu'une conservation à température ambiante permettent de prévenir le risque de contamination massive par *Salmonella enteritidis*.

Dans cette étude, il apparaît qu'une température de stockage trop basse (+ 4°C) entrave l'action bactéricide du vinaigre, le vinaigre semble avoir une efficacité maximale vers 35 °C.

# 4eme PARTIE

# Discussion

## I/. INTRODUCTION :

Dans cette quatrième et dernière partie, nous allons essayer de comprendre les mécanismes des TIAC à *Salmonella enteritidis*. Nous allons suivre la chaîne alimentaire, de la formation de l'oeuf jusqu'à sa consommation par l'homme.

Dans un premier temps, il s'agira de montrer à quels niveaux se fait la contamination de l'oeuf, et par quels mécanismes. Puis nous nous pencherons sur le traitement des oeufs après leur ponte (conservation, stockage...), en essayant de déterminer les facteurs favorisant la multiplication de *Salmonella enteritidis*. Enfin, nous étudierons l'utilisation des oeufs, dans la cuisine familiale, mais aussi par les industries alimentaires.

A chaque stade, nous tenterons de proposer des solutions visant à minimiser les risques de toxi-infections alimentaires.

## II/. LA CONTAMINATION DES OEUFES :

### A/. Fréquence de la contamination :

Si on considère la grande quantité d'oeufs produits et consommés, la proportion d'oeufs contaminés reste très faible. Si faible que la plupart des études (8) entreprises pour essayer de définir une fréquence relative d'oeufs contaminés se sont soldées par des échecs.

Ainsi en 1990, le laboratoire départemental de la Haute-Vienne (Prof. J.A. Nicolas), a entrepris une étude sur la fréquence de contamination des oeufs dans notre département (59).

1500 oeufs, répartis en 250 lots ont été prélevés, ces différents lots se répartissent en :

205 lots de 6 oeufs d'origine familiale  
45 lots de 6 oeufs d'origine industrielle

Toutes les recherches de *Salmonella* ont été négatives, le risque de contamination est donc très faible. Mais il faut souligner que 1500 oeufs ne représentent qu'un "petit" échantillon du nombre d'oeufs consommés chaque année. De plus nous verrons plus loin que le caractère intermittent de la production d'oeufs contaminés, rend aléatoire les résultats de ce type d'enquête.

B/. Mécanisme de la contamination :

Deux modes de contamination sont à distinguer : la contamination trans-ovarienne (avant la ponte) d'une part, et la contamination après la ponte d'autre part.

1/. La contamination avant la ponte :

Ce type de contamination nécessite que la poule pondeuse soit porteuse de *Salmonella enteritidis*. La contamination des poules s'explique en partie par la nature de leur alimentation. L'alimentation des volailles est à base de farines ou granulés préparés industriellement à partir de déchets d'origine animale. Le recyclage des déchets d'éviscération constitue une source importante de contamination.

De même, d'après les travaux de Colin et de son équipe (46), il existerait une relation entre la production d'oeufs contaminés par un sérotype et la présence de ce même sérotype dans les matières premières prélevées à l'usine de fabrication des aliments.

La contamination trans-ovarienne de *Salmonella enteritidis*, a été longtemps considérée comme un mode de contamination secondaire, assez exceptionnel. Une étude menée au laboratoire départemental de la Haute-Vienne (60) a montré que des poules sans aucun signe clinique pouvaient être porteuses de *Salmonella enteritidis* au niveau de leurs ovaires. La présence de *Salmonella enteritidis* au niveau de l'appareil génital de la poule est facilement explicable par la physiopathologie de ce germe.

La contamination de la poule a lieu par voie orale (aliments, environnement contaminé...), à partir du tube digestif, les salmonelles sont capables de gagner la circulation sanguine (Cf. Rappels sur les *Salmonella*) afin d'envahir les ovaires (Voir figure n°27).

Ce mode de contamination est bien connu chez la cane, il a entraîné l'abandon de l'utilisation des oeufs de canes en pâtisserie.

Ce mode de contamination permet en outre d'expliquer la présence de *Salmonella enteritidis* au niveau du jaune dans des oeufs à coquille intacte, propre, recueillis dans des conditions d'hygiène correcte.

## 2/. La contamination après la ponte :

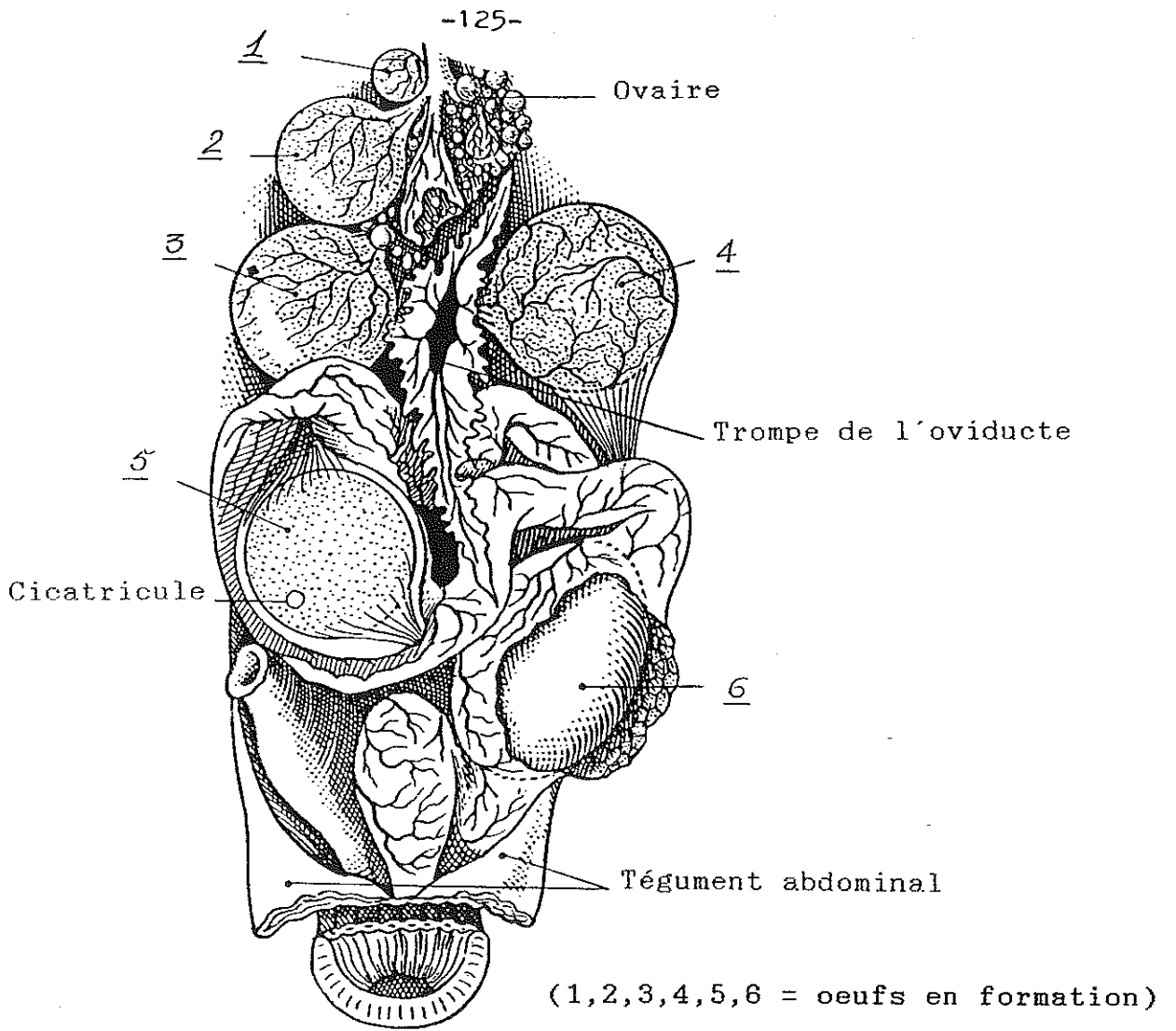
Les poules pondeuses infectées par *Salmonella enteritidis*, peuvent être des porteurs sains, qui éliminent le germe dans le milieu extérieur par l'intermédiaire de leurs matières fécales.

La contamination après la ponte est le mode de contamination qui a été jusqu'à aujourd'hui le plus souvent retenu, il s'explique facilement : l'oeuf humide se souille au contact des matières fécales présentes dans le cloaque, ainsi que celles qui tapissent le sol (élevages familiaux surtout).

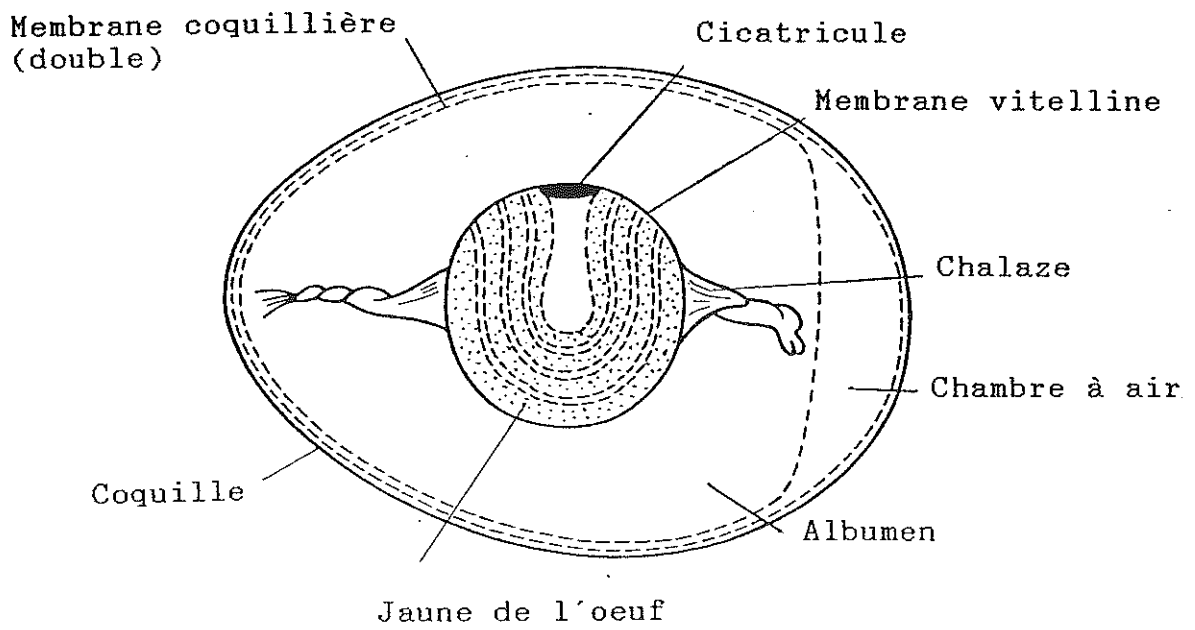
Les salmonelles présentes à ce niveau , peuvent alors pénétrer dans l'oeuf à travers les pores de la coquille.

L'oeuf possède cependant différents moyens de s'opposer à cette contamination (Cf figure n°28):

1 - La cuticule, qui en séchant va obturer les pores de la coquille.



*Fig. 27 : Appareil génital de la poule*



*Fig. 28 : Oeuf de poule*

2 - La coquille elle-même, qui s'oppose à la pénétration des bactéries, d'autant plus efficacement qu'elle est épaisse et intacte.

3 - Les fibres des membranes coquillières.

4 - Le blanc d'oeuf avec son lysozyme dont nous avons étudié le pouvoir bactériostatique.

Ce n'est qu'après avoir traversé ces quatre barrières naturelles que la salmonelle pourra atteindre le jaune d'oeuf et s'y multiplier.

#### C/. Niveau de la contamination :

Lorsque l'oeuf est contaminé par *Salmonella enteritidis*, le nombre de germes retrouvés juste après la ponte est faible, de l'ordre de 1 germe/ml. La multiplication de ces quelques bactéries est très rapide, comme nous l'avons étudié (3e partie), quelques jours suffisent pour obtenir un nombre de germes assez élevé pour entraîner une toxi-infection alimentaire.

De plus, la production d'oeufs contaminés par un élevage est intermittente. En analysant tous les oeufs pondus par une poule porteuse de *Salmonella enteritidis*, Humphrey et son équipe (45) ont constaté que la production d'oeufs contaminés n'était pas continue. Ils ont découvert des ovules sains mélangés à des ovules contaminés et cela sur un même ovaire.

Ces auteurs ont émis l'hypothèse d'un stimulus particulier qui interviendrait pour déclencher la ponte d'oeufs contaminés.



D/. Moyens de lutte :

1/. Curatifs :

Dans le cas de petits élevages, comme cela est souvent le cas dans notre région, la solution la plus efficace est celle qui consiste à l'abattage des volailles infectées, avec désinfection du poulailler et à la mise en place d'un vide sanitaire. Ce type de traitement a été utilisé en Grande Bretagne à la fin des années 80, bien qu'il soit beaucoup moins bien adapté aux grands élevages industriels.

Dans ce type d'élevage, où les troupeaux comportent un très grand nombre d'individus, l'abattage représente une perte économique difficilement supportable pour l'entreprise. Pour les producteurs, le problème majeur est un problème de diagnostic.

En effet, seuls quelques individus sont contaminés, les volailles atteintes restent en parfaite santé (porteurs sains), et sont donc cliniquement indifférentiables des autres.

Il a été montré que l'écouvillonnage des cloaques est un moyen de diagnostic insuffisant pour dépister efficacement les poules infectées.

La sérologie, de par son coût élevé, ne peut être employée à grande échelle.

Le traitement des troupeaux de poules pondeuses par antibiothérapie, n'est pas souhaitable. Bien que beaucoup d'antibiotiques soient actifs sur *Salmonella enteritidis*, leur utilisation ne présente à long terme aucun intérêt.

Même si l'antibiothérapie permet de décontaminer les tubes digestifs des volailles en quelques jours, la durée du

portage asymptomatique de *Salmonella enteritidis* ne s'en trouve pas pour autant diminuée.

Guillot et Milleman (62), ont testé l'enrofloxacin sur des volailles contaminées par salmonella typhimurium, les résultats de leur étude ont montré que cet antibiotique avait une efficacité réelle mais limitée, puisque la salmonelle était ré-isolée dans les jours suivant l'arrêt du traitement.

De plus, l'emploi d'antibiotiques chez la poule pondeuse, expose au risque de voir apparaitre des résidus d'antibiotiques dans les oeufs, ce qui n'est pas acceptable.

L'emploi des antibiotiques, présente beaucoup plus d'intérêt, dans le traitement des jeunes poussins. L'utilisation d'antibiotiques en prophylaxie, permet la production d'individus sélectionnés indemnes de contamination salmonellique.

## 2/. Mesures préventives :

### a/. Sur les volailles :

Pour protéger les poules de toute infection par *Salmonella enteritidis*, plusieurs solutions ont été proposées. La plupart d'entre elles n'en sont encore qu'au stade expérimental.

Le principe "d'exclusion compétitive" (competitive exclusion) étudié par Mead et Barrow (63) est très prometteur. Il s'agit de réintroduire chez un individu sain (ou décontaminé par antibiothérapie) une flore intestinale mature préparée à partir du contenu caecal d'un donneur sain. Les résultats semblent très encourageants, bien que la

composition exacte de cette flore de remplacement fasse encore l'objet de recherches.

Des méthodes de vaccination sont également étudiées, il s'agit d'induire chez la poule une réponse immunologique. L'utilisation de vaccin tué fabriqué à partir d'un lysat de bactéries, induit bien une synthèse d'anticorps, mais l'incidence d'une telle vaccination sur l'excrétion de la salmonelle n'a pu être démontrée.

Par contre, l'emploi de vaccins vivants atténués, préparés à partir de souches de bactéries mutantes (devenues moins pathogènes), permet de réduire de 70 % l'excrétion de la salmonelle. De plus, ces vaccins peuvent être administrés par voie orale, ce qui les rend facilement utilisables. La voie orale permet en outre de se rapprocher du mode de contamination naturel.

*b/. Sur les locaux :*

Ces mesures permettront de lutter contre la contamination des oeufs après la ponte, ainsi que la contamination des poules entre elles. Il s'agit de mesures d'hygiène générale, de nettoyage et de désinfection :

- désinfection régulière des bâtiments
- nettoyage des tapis de ramassage des oeufs
- évacuation et traitement des matières fécales

Les différences qu'il peut exister à ce niveau, entre un élevage industriel et familial, permettent d'expliquer pourquoi les oeufs issus de productions familiales sont beaucoup plus souvent contaminés (64). Les petits élevages familiaux, se font la plupart du temps à même le sol, la ponte a lieu dans des caisses de bois souvent maculées de

matières fécales. Les oeufs restent longtemps en contact avec le sol, la contamination lorsqu'elle a lieu est massive.

Beudje, Colin, et Lahellec (65), ont étudié l'influence de certains paramètres d'environnement sur la survie des salmonelles. Ils ont notamment observé de grandes différences de survie, en fonction de la litière utilisée.

Dans cette étude, il apparait que l'utilisation de copeaux de bois d'une essence exotique entraîne une inhibition significative de la croissance des salmonelles. Ces résultats pourraient entraîner un changement de la nature des litières, la paille pourrait être remplacée par des copeaux de bois dans les élevages familiaux.

*c/. Sur les oeufs :*

Les oeufs doivent être récoltés rapidement après la ponte, il ne doivent pas rester en contact avec les matières fécales de la poule.

Le lavage ou brossage des oeufs juste après la ponte est une opération néfaste, car elle a pour conséquence la destruction de la cuticule. Cette cuticule, en permettant l'obstruction des pores de la coquille, augmente l'imperméabilité de l'oeuf.

### III/. CONSERVATION DES OEUFES :

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons étudié la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les oeufs. Nous avons montré que cette multiplication pouvait être, dans certaines conditions, extrêmement rapide.

Les oeufs, lorsqu'ils sont contaminés par *Salmonella enteritidis*, ne le sont que faiblement. Le nombre de germes susceptible de déclencher une toxi-infection alimentaire chez un homme sain est de l'ordre du million. Les conditions de conservation jouent donc un rôle capital sur la qualité bactériologique des oeufs mis sur le marché.

Avant de détailler quelles sont les différentes méthodes de conservation pour les oeufs, il nous a semblé intéressant de faire un rappel de législation sur les oeufs.

#### A/. Rappels de législation :

Les textes régissant le commerce des oeufs et ovoproduits sont reproduits dans une brochure d'hygiène alimentaire (66), publiée par la direction des journaux officiels.

#### 1/. Les différentes catégories d'oeufs :

Les différentes catégories d'oeufs sont définies par le règlement (C.E.E) n° 2772/75 du conseil du 29 octobre 1975 (publié au J.O.C.E le 01/11/75).

Les oeufs sont classés en trois catégories de qualité décroissante :

- catégorie A ou oeufs frais

- catégorie B ou oeufs de deuxième qualité ou conservés

- catégorie C ou oeufs déclassés destinés à la casserie ou à l'industrie de l'alimentation humaine.

En outre les oeufs des catégories A et B sont également classés selon des catégories de poids :

*Catégorie 1 : 70 g et plus*

*Catégorie 2 : 70 à 65 g*

*Catégorie 3 : 65 à 55 g*

*Catégorie 4 : 60 à 55 g*

*Catégorie 5 : 55 à 50 g*

*Catégorie 6 : 50 à 45 g*

*Catégorie 7 : moins de 45 g*

Les mentions obligatoires devant figurer sur l'emballage sont les suivantes :

\* le nom, raison sociale et adresse de l'entreprise qui a emballé ou fait emballer les oeufs.

\* le numéro distinctif du centre d'emballage

\* la catégorie de qualité et de poids

\* le nombre d'oeufs emballés

\* la période d'emballage

\* l'indication de la réfrigération ou du mode de conservation le cas échéant.

## 2/. Caractéristiques des oeufs "A" :

*Coquille et cuticule : normales, propres, intactes*

*Chambre à air* : hauteur ne dépassant pas 6 mm, immobile

*Blanc d'oeuf* : clair, limpide, de consistance gélatineuse, exempt de corps étrangers de toute nature

*Jaune d'oeuf* : visible au mirage sous forme d'ombre seulement, sans contour apparent, ne s'écartant pas sensiblement de la position centrale en cas de rotation de l'oeuf, exempt de corps étrangers de toute nature

*Germe* : développement imperceptible

*Odeur* : exempt d'odeurs étrangères

Il est également précisé que pour appartenir à la catégorie A, les oeufs ne devaient avoir été soumis à aucun traitement de conservation. De plus, il est ajouté que ces oeufs ne devront pas être conservés à une température inférieure à + 8°C.

Les oeufs de première catégorie sont donc des oeufs transportés et conservés à température ambiante, du producteur au consommateur.

*Remarque :*

*Les oeufs de la catégorie A peuvent être qualifiés d'oeufs "EXTRA" pendant les 7 jours qui courent à compter de la date d'emballage.*

### 3/. Caractéristiques des oeufs "B" :

*Coquille* : normale, intacte

*Chambre à air* : ne dépassant pas 9 mm

*Blanc d'oeuf* : clair, limpide, exempt de corps étrangers de toute nature

*Jaune d'oeuf* : visible au mirage sous forme d'ombre seulement, exempt de corps étrangers de toute nature

On distingue trois types d'oeufs dans la catégorie "B" :

- \* les oeufs non réfrigérés, non conservés
- \* les oeufs réfrigérés (température < + 8°C)
- \* les oeufs conservés (par trempage)

#### 4/. Caractéristiques des oeufs "C" :

Les oeufs appartenant à la catégorie C, sont des oeufs qui ne satisfont pas aux exigences des catégories A et B. Ces oeufs ne peuvent être cédés qu'à la casserie ou à l'industrie.

#### B/. Les différentes méthodes de conservation :

Les méthodes de conservation rapportées ici, concernent principalement les oeufs destinés à l'industrie alimentaire humaine, ces techniques permettent la conservation des oeufs sur plusieurs mois (67). Les oeufs peuvent être conservés sous trois formes : oeufs entiers, oeufs en poudre, oeufs cassés et congelés.



1/. Oeufs entiers :

Deux techniques sont utilisées :

*a/. Le trempage :*

Il consiste à tremper les oeufs dans un lait de chaux ou dans une solution sirupeuse de silicate de sodium, ce traitement permet l'obturation des pores de la coquille, et empêche ainsi la pénétration des bactéries. Ce traitement doit s'appliquer à des oeufs non contaminés.

*b/. La réfrigération :*

Le froid permet de conserver des oeufs pendant plusieurs mois. Il faut prendre soin de ne pas placer les oeufs à une température trop inférieure à 0°C. L'oeuf gèle à partir de -3°C, ce qui provoque l'éclatement de la coquille. Pour éviter les oxydations provoquées par l'oxygène de l'air, certaines techniques utilisent des atmosphères neutres (azote ou CO<sub>2</sub>).

2/. Les oeufs en poudre :

La déshydratation de l'oeuf permet d'empêcher la multiplication des bactéries. Cette technique a l'avantage de diminuer le poids et le volume des oeufs, et de permettre leur manipulation à température ambiante.

Les oeufs destinés à ce type de traitement doivent être des oeufs recueillis dans des conditions d'hygiène

rigoureuses. Certains auteurs préconisent même une pasteurisation (60°c pendant 3 à 4 mn), avant la dessiccation.

La dessiccation doit être poussée très loin, l'eau résiduelle ne doit pas dépasser 2 % en poids. Cette dessiccation peut être obtenue par deux techniques différentes :

*a/. Par la chaleur :*

La poudre d'oeuf est obtenue par nébulisation. Le produit liquide est pulvérisé dans une chambre où de l'air chaud (200°c) est insufflé. Les gouttelettes sont séchées instantanément.

L'inconvénient de cette méthode est le brunissement du blanc d'oeuf, dû à la présence de glucose (Cf composition du blanc d'oeuf).

*b/. Par le froid :*

Les oeufs sont cassés puis congelés à très basse température (- 40°c), la glace est sublimée sous un vide poussé. Cette méthode est la plus coûteuse en énergie.

Le conditionnement de la poudre d'oeuf doit se faire sous une atmosphère d'anhydride carbonique ou en mélange avec de l'azote (20 % de CO<sub>2</sub>, 80 % d'azote).

### 3/. Les oeufs cassés congelés :

Les oeufs vidés de leur coquille, sont conservés à une température de - 15°C. Les oeufs sont ainsi congelés par lot de 500 g à 1 kg, ce qui permet une grande facilité d'utilisation.

Les oeufs utilisés doivent être des oeufs à coquille propre, le cassage doit s'effectuer dans des conditions d'hygiène maximales. Les oeufs devront être triés avec soin, de façon à éviter la contamination d'un lot tout entier par un seul oeuf douteux. Cette remarque est d'ailleurs également valable pour les oeufs en poudre.

Les règles valables pour tous les aliments congelés doivent bien entendu être appliquées :

- délais de congélation le plus court possible
- descente en température la plus rapide possible
- décongélation la plus rapide possible

### C/. Contrôles de qualité :

Les oeufs doivent faire l'objet de contrôles de leur qualité. Ces contrôles ont été définis par l'instruction du 12 décembre 1985 relative à la réglementation aux normes de production et de commercialisation des oeufs de consommation.

Ce règlement prévoit que chaque centre d'emballage doit posséder :

- une installation de mirage

- un dispositif permettant de mesurer la hauteur de la chambre à air
- une machine pour classer les oeufs par catégorie de poids
- une balance homologuée pour le pesage des oeufs.

Les contrôles obligatoires sont les suivants :

1/. Aspect extérieur de l'oeuf :

Des normes ont été définies, quand au pourcentage maximum toléré d'oeufs fêlés, ou tachés.

2/. Le mirage :

Cette technique permet de mesurer par transparence les dimensions de la chambre à air. La grandeur de la chambre à air ne permet pas cependant de dater avec précision l'oeuf, mais elle renseigne sur sa qualité physique (Cf catégories d'oeufs).

La transparence de l'oeuf évolue dans le temps. Lorsque l'oeuf est très frais, la transparence est uniforme, le jaune ne se distingue pas. Dans le cas d'oeufs plus anciens, le jaune apparait sous la forme d'une tache sombre.

Le mirage permet de classer les oeufs dans les différentes catégories définies par les règlements, les normes qualitatives sont reproduites au tableau XVI.

## Tableau XVI

### NORMES DE COMMERCIALISATION DES OEUFS

Cat. Coquille	Cuticule	Chambre à air	Jaune
<u>A</u> Normale propre intacte	Nettoyage interdit	Extra < 4mm Frais < 6mm	Peu mobile contours flous Absence de corps étranger
<u>B</u> Normale intacte	Nettoyage possible par brossage	< 9mm	Contours flous Absence de corps étranger

Cat.	Blanc	Germe	Odeur
<u>A</u>	Clair Limpide Gélatineux Exempt de corps étranger	Imperceptible	Exempt d'odeurs anormales
<u>B</u>	Clair Limpide Exempt de corps étranger	Imperceptible	Exempt d'odeurs anormales

3/. Le contrôle du poids :

Le pesage des oeufs permet de classer les oeufs en catégories de poids (Cf différentes catégories d'oeufs).

D/. Discussion :

Ce bref rappel sur la législation concernant la conservation des oeufs de poule laisse apparaître de profondes lacunes.

1/. Température de conservation :

La conservation des oeufs de type A, se fait à température ambiante, du producteur jusqu'au consommateur. Il est même explicitement dit que les oeufs de catégorie A, ne doivent pas être maintenus à une température inférieure à + 8°C.

Or les oeufs de la catégorie A, sont les oeufs qui sont distribués commercialement, et qui sont destinés à la vente au public. Lorsqu'on connaît l'influence d'une température basse sur la multiplication de *Salmonella enteritidis*, on comprend l'urgence d'une nouvelle réglementation sur la conservation des oeufs de catégorie A.

Nous avons montré qu'à une température de + 4°C, la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les oeufs était totalement inhibée.

## 2/. Absence de contrôles microbiologiques :

Les contrôles obligatoires effectués dans les centres d'emballage ne concernent que des paramètres physiques : aspect, poids...

Pour l'heure, rien n'est prévu sur le plan bactériologique : aucune recherche de germe, pas de norme.

Certes, la mise en place de ces contrôles reste problématique. La taille de l'échantillon est difficile à définir, le nombre d'oeufs contaminés étant très faible.

## IV/. UTILISATION DES OEUFS :

Ce dernier maillon de la chaîne alimentaire, permet d'expliquer la différence de nombre de foyers recensés entre la restauration collective et familiale (68).

### A/. Dans la cuisine familiale :

Comme nous l'avons expliqué dans la première partie, le nombre important de foyers familiaux déclarés est bien souvent dû à un manque de rigueur de la part de la ménagère.

La prévention des T.I.A.C. à salmonella enteritidis passe par le respect des règles d'hygiène alimentaire.

De simples conseils permettraient de limiter les risques de contamination :

\* La propreté du plan de travail et des accessoires doit être rigoureuse.

\* La préparation des aliments à base d'oeufs non cuits, doit se faire le plus tard possible.

\* Les aliments doivent être conservés à basse température jusqu'à leur consommation.

Il est également souhaitable de rappeler que certains modes de cuisson des oeufs ne sont pas satisfaisants. En particulier la cuisson dite "à la coque", ne permet pas d'atteindre une température suffisante au coeur de l'oeuf. Les salmonelles ne sont pas totalement détruites, ce mode de cuisson devrait être abandonné.

B/. Utilisation des oeufs par l'industrie alimentaire :

En 1989, les mayonnaises se sont révélées comme l'aliment le plus souvent mis en cause lors des foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis* (6). Les mayonnaises incriminées sont des mayonnaises de fabrication familiale.

Les produits de préparation industrielle, ne sont pratiquement jamais à l'origine de toxi-infections (69). La fabrication des mayonnaises industrielles utilise pourtant de grandes quantités d'oeufs, nous avons donc voulu comprendre pourquoi ces produits n'étaient presque jamais contaminés.

En octobre 1991, nous avons pris contact avec la société BENEDICTA. Cette société fabrique et commercialise des mayonnaises toutes préparées. Nous avons posé au chef du département qualité, un certain nombre de questions concernant :



- les types d'oeufs utilisés
- les contrôles effectués sur ces oeufs
- les additifs ou techniques de conservation

La société BENEDICTA a bien voulu nous répondre.

**\* type d'oeuf :**

Le chef du département qualité nous a indiqué que pour la préparation de leurs émulsions de mayonnaise, du jaune d'oeuf en coule fraiche est utilisé.

**\* les contrôles :**

Les contrôles bactériologiques sont effectués par lots par les fournisseurs d'une part, et par l'usine de fabrication d'autre part, en contrôle de réception.

**\* les additifs et techniques de conservation :**

Le jaune d'oeuf est salé à 8 ou 11 %. Cette adjonction de sel, outre la protection qu'elle apporte au produit, permet de dépasser largement la température minimale de 64 °c ainsi que la durée de pasteurisation (2 mn 30) prévue par la loi.

De plus, les mayonnaises préparées industriellement possèdent un pH inférieur à 4, ce qui gêne considérablement la multiplication de *Salmonella enteritidis* (58).

Ces informations permettent d'expliquer la qualité de ce type de produit. Les mayonnaises industrielles sont pourtant beaucoup critiquées, souvent accusées de ne pas être des produits "sains". Si leur qualité gustative est

laissée à l'appréciation de chacun, leur qualité microbiologique n'est pas discutable, et reste très supérieure aux mayonnaises "faites maison".

# CONCLUSION

# CONCLUSION

Malgré la stabilisation du nombre des foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis* déclarés en 1990, le problème des salmonelles dans les oeufs de poules reste préoccupant.

Nous avons pu définir le profil type d'une toxoinfection alimentaire à *Salmonella enteritidis*.

\* L'aliment contaminant est presque toujours l'oeuf, soit directement, soit incorporé dans une préparation culinaire. Les préparations à base d'oeufs non cuits (mayonnaises...) sont les plus souvent incriminées.

\* Les oeufs issus de petits élevages familiaux sont plus souvent mis en cause, que ceux produits par l'industrie.

\* Les types de restaurations les plus touchées, sont la restauration familiale, et les petites collectivités.

Des moyens de lutte efficaces existent, différentes méthodes permettent de mettre à la disposition des consommateurs des oeufs exempts de contamination.

En amont, les mesures prophylactiques utilisées pour les petits élevages familiaux (abattage systématique...) sont difficilement applicables aux grands élevages industriels, en raison du portage asymptotique, et du

faible taux de contamination des oeufs. Des travaux intéressants et prometteurs, basés sur l'immunisation des poules pondeuses permettront peut être de juguler cette épidémie à la base.

Grâce à des techniques de production moderne, et à des règles d'hygiène bien respectées, les oeufs issus de productions industrielles en France sont si rarement contaminés que les contrôles microbiologiques aléatoires ne permettent pas de mettre en évidence cette contamination.

Lorsqu'on connaît le faible niveau de contamination des oeufs (environ 1 salmonelle/ml), on comprend l'urgence d'une nouvelle réglementation sur la conservation des oeufs, notamment sur les températures de stockage.

Nous avons montré qu'à température ambiante la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans le jaune d'oeuf était très rapide. Malgré un inoculum de départ de faible taille (100 germes/oeuf), quelques heures suffisent pour atteindre un nombre de germes capable d'engendrer une toxi-infection alimentaire.

Une conservation à basse température (+ 4°C), permet de ralentir très fortement la prolifération de ce germe. Nous avons également noté que le lysozyme contenu dans le blanc des oeufs, gêne considérablement le développement de cette *Salmonella*.

Des essais ont été entrepris sur les mayonnaises. L'adjonction de petites quantités de vinaigre entrave très sensiblement la croissance de *Salmonella enteritidis* dans cet aliment fréquemment incriminé.

Les mesures prophylactiques les plus efficaces sont certainement celles applicables en bout de chaîne alimentaire. La diminution du nombre de foyers de TIAC à *Salmonella enteritidis* passe par une meilleure information de la population (rappels des règles d'hygiène alimentaire élémentaires, abandon de certains modes de cuisson des oeufs...).

Cette diminution passe également par une meilleure formation du personnel amené à manipuler des oeufs (personnels de la restauration collective, petits commerçants...)

Au stade de la production, l'élimination totale des risques de contamination des oeufs reste encore problématique. Par conséquent, à chaque étape de la chaîne alimentaire, toutes les précautions doivent être prises pour empêcher la multiplication dans l'oeuf d'éventuelles salmonelles.

Il ne s'agit pas d'induire une "psychose" à l'égard des oeufs et des ovoproduits, mais au contraire d'expliquer que grâce à quelques précautions, ces produits peuvent être utilisés sans risque.

# BIBLIOGRAPHIE

# BIBLIOGRAPHIE

- 1 - LE MINOR L.  
*Problème Mondial des Salmonelles*  
Gazette médicale de France, 1975, 82 (15), p. 1735-36.
  
- 2 - RAULT D. GALLAIS H. CASANOVA P.  
*Les salmonelloses*  
Le concours médical 1985, 19 (10), p. 107-137.
  
- 3 - O.M.S.  
*Report of who consultation on epidemiological emergency in poultry and eggs salmonellosis.*  
O.M.S., 1989, Genève (Suisse), 20-23 mars 1989, 49 p.
  
- 4 - RICHARD C.  
*Actualités des Salmonelles en 1990*  
L'information du technicien biologiste 1990, 4, p. 172-180.
  
- 5 - LE MINOR L., GLEDEL J., VEIT P.  
*Salmonelloses d'origine alimentaire*  
Le concours médical, 1990, 12 (4), p. 333-4.
  
- 6 - HUBERT B., DEHAUMONT P., LELARD G., GRIMOND P.A.D., BOUVET P.  
*Les infections à Salmonella enteritidis : situation en 1990*  
B.E.H., 1991, 25, p. 103-104.
  
- 7 - ROBERTS T.  
*Salmonellosis control : Estimated economic cost*  
Poultry Science, 1988, 67, p. 936-943.



**8 - HUMPHREY T.J.**

*Public health implications of the infection of egg-laying hens with Salmonelle enteritidis PT4*

World's Poultry Science Journal, 46 march 90, p. 5-13.

**9 - GIRARD J.-F.**

*Toxi-infections alimentaires et santé publique*

B.E.H., 1989, 16, p. 61.

**10 - FERRON A.**

*Bactériologie Médicale*

12e édition, Edition C et R, 1984, 375 p., 24 cm.

**11 - LE MINOR L. VERON M. POPOFF M.**

*Taxonomie des Salmonella*

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1982, 133 B, p. 223-243.

**12 - LE MINOR L.**

*Comment désigner les sérotypes de Salmonella*

Médecine et Maladies infectieuses 1988, 12, p. 859-862.

**13 - LE MINOR L., POPOFF M.Y., LAURENT B., HERMANT D.**

*Individualisation d'une septième sous-espèce de salmonella*

Ann. Inst. Pasteur, 1986, 137 B, p. 211-217.

**14 - PELLERIN J L.**

*Salmonellose et santé publique*

La semaine vétérinaire, juin 1990, p. 26-27.

**15 - CATSARAS M.**

*Salmonella et toxi-infections alimentaires par contamination indirecte.*

Revue Med. Vét. 1984, 135(10), p. 621-625.

**16 - NICOLAS J.-A.**

*Salmonellose : pathologie et diagnostic biologique*

Le Moniteur d'internat, 1987, 1, p. 76-80.

17 - BUISSON Y.

*Faut-il traiter les porteurs de Salmonella ?*  
B.E.H., 1991, 4, p. 13-14.

18 - LE MINOR L., VERON M.

Bactériologie médicale  
2e Edition, Paris, FLAMMARION MEDECINE SCIENCE, 1990,  
1107 p., 27 cm.

19 - JWGS

*Memorandum of evidence to the agriculture comittee inquiry on salmonella in eggs*  
Public Health Laboratory Service Microbiology Digest Jan 1989, 6 (1),  
p. 1-8.

20 - P.H.L.S.

*Update on Salmonella infection*  
S.V.S., janvier 1990.

21 - COWDEN J.M., LYNCH D., O'MAHONY M., MAWER S.L.,  
ROWE B., BARTLETT C.L.R.

*Case-control study of infections with salmonella enteritidis phage type 4 in England*  
British Medical Journal, 1989, 299, p. 771-773.

22 - CORBION B., GLEDEL J.

*Les salmonelles chez les animaux, dans l'alimentation, et dans l'environnement, en France en 1984 et 1985.*  
B.E.H., 1987, 3, p. 11.

23 - CORBION B., GLEDEL J.

*Les salmonelles chez les animaux, dans l'alimentation et dans l'environnement en France en 1986 et 1987.*  
B.E.H., 1989, 16, p.64-65.

24 - HUBERT B.

*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1985*  
B.E.H., 1987, 3, p. 9-10.

25 - HUBERT B., OLIVARES R., MASSENOT C.

*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1986*  
B.E.H. juil 1987, 28, p. 109-110.

26 - HUBERT B., OLIVARES R.

*Les infections à Salmonella enteritidis en 1987*  
B.E.H., 1988, 26, p. 101.

27 - HUBERT B.

*Mise au point sur l'épidémie d'infections à Salmonella enteritidis*  
B.E.H., 1988, 36, p. 151.

28 - HUBERT B., MAILLOT E., QUENUM B., MASSENOT C.

*Les infections à Salmonella enteritidis*  
B.E.H., 1989, 16, p. 66-67.

29 - HUBERT B., DEHAUMONT P., QUENUM B., PIGNAULT A.

*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1989*  
B.E.H., 1990, 16, p. 65-67.

30 - HUBERT B., GRIMOND P.A.D.

*La surveillance des Salmonelloses en France*  
B.E.H., 1990, 16, p. 68.

31 - HUBERT B., DEHAUMONT P., LE GOSLE Y., MAILLOT E., CORBION B.,  
GRIMOND P.A.D.

*Les infections à Salmonella enteritidis : situation en 1989*  
B.E.H., 1990, 16, p. 69-71.

32 - OLIVARES R., LARIVIERE L., MASSENOT C., HUBERT B.

*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1987.*  
B.E.H., 1988, 35, p. 137-138.

33 - PIGNAULT A., CLUZAN S., DEHAUMONT P., HUBERT B.

*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1990*  
B.E.H., 1991, 25, p. 99-101.

- 34 - QUENUM B., HUBERT B., MASSENOT C.  
*Les toxi-infections alimentaires collectives en 1988*  
B.E.H., 1989, 16, p. 61-63.
- 35 - GRIMOND P.A.D., BOUVET P.J.M.  
*Les salmonelles et les shigelles en 1989*  
B.E.H., 1990, 16, p. 69.
- 36 - GRIMOND P.A.D., BOUVET P.  
*Les salmonelles et les shigelles en 1990 en France*  
B.E.H., 1991, 25, p. 91.
- 37 - LE MINOR L., GRIMONT P.A.D.  
*Origine et répartition en sérovars des souches de Salmonella isolées en France continentale au cours des années 1984 à 1987*  
Médecine et maladies infectieuses 1989, 19 (1), p. 12-17.
- 38 - LE MINOR L., GRIMONT P.A.P.  
*Les salmonelles et les shigelles en 1987*  
B.E.H., 1988, 36, p. 147.
- 39 - LE MINOR L., GRIMOND P.A.P.  
*Les salmonelles et les shigelles en 1988*  
B.E.H., 1989, 16, p. 63-64.
- 40 - DIRECTION GENERALE DE LA SANTE  
Brochure : Le praticien et les toxi-infections alimentaires.  
Imprimerie Nationale, Paris, janvier 1988, 15 p., 21 cm.
- 41 - JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE  
Brochure n° 1487 : Toxi-infection alimentaires collectives  
Imprimerie des Journaux officiel, Paris, avril 1988, 61 p., 21 cm.
- 42 - SALVAT G., PROTAS J., FRANCAIS S., GERARD G., CHARTIER F., HAMANN F.  
*Oeufs et toxi-infections alimentaires à Salmonella : importance de la contamination des élevages.*  
Colloque annuel de la section microbiologie alimentaire de la S.F.M. 13 et 14 mars 1991, I. PASTEUR, PARIS.

43 - NICOLAS J.-A., CHAMPAGNOL M.-P., MAURATILLE M.

*Toxi-infections alimentaires familiales à Salmonella enteritidis en région Limousin.*

Colloque annuel de la section microbiologie alimentaire de la S.F.M. 13 et 14 mars 1991, I. PASTEUR, PARIS.

44 - FERRIAL Marie-Laure

*Actions coordonnées DDASS autres services départementaux à propos d'une toxi-infection alimentaire à Salmonella goldcoast.*

Mémoire Médecine, Limoges, 1984, 87 p., 30 cm.

45 - HUMPHREY T.J. BASKERVILLE A. MAWER S. ROWE B.

*Salmonella enteritidis PT4 from the contents of intact eggs : a study involving naturally infected hens*

Epidemiol. Infect., 1989, 103, p. 415-423.

46 - COLIN P.

*Etude de l'évolution de la contamination par Salmonelles aux différents stades de la production de poulets de chair.* Bull. Inf. Sta. Exp. Avic., 1978, 18 (3), p. 79-88.

47 - BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A.

Manuel des techniques bactériologiques

4e édition, Paris, FLAMMARION MEDECINE SCIENCE, 1974, 700 p., 24 cm.

48 - VIEU J.F. JEANJEAN S. TOURNIER B. KLEIN B.

*Application d'une série unique de bactériophages à la lysotypie de Salmonella dublin, et de Salmonella enteritidis*  
Médecine et Maladies infectieuses, 1990, 20 (5), p. 229-233.

49 - PHILLIPS D.C.

*The hen egg-white lysozyme molecule*

Proc. Nat. Acad. Science. USA 1967, 57, p. 484-495.

50 - COLOBERT L.

*Etude de la lyse de salmonelles pathogènes provoquée par le lysozyme, après délipidation de la paroi externe.*

Ann. Inst. Pasteur. 1958, 95, p. 156-167.

51 - COLOBERT L.

*Action du lysozyme sur les bactéries à Gram négatif*  
Expo. Ann. Bioch. Med. 1966, 27, p.65-84

52 - AKASHI A.

*Preservative effect of egg white lysozyme added to cooked sausage*  
Japan Jour. of Zootech. Science. 1969, 40, p. 243-248.

53 - LE GROS L.

*Sensibilité des Salmonelles au lysozyme de blanc d'oeuf*  
Sci. Aliments, 1986, n° hors série 6, p. 149-156

54 - THAPON J.-L., BRULE G.

*Dosage du lysozyme dans blanc d'oeuf par chromatographie liquide haute performance*  
Science des Aliments, 1982, 2, p.251-260.

55 - STAFSETH H.J. MARGARET M. COOPER M. WALLBANK A.M.

*Survival of Salmonella pullorum on the skin of human beings and in eggs during storage and various methods of cooking*  
Journal of Milk and Food technology 1952, 15, p. 70-73.

56 - HUMPHREY T.J. GREENWOOD M. GILBERT R.J. ROWE B. CHAPMAN P.A.

*The survival of Salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions*  
Epidemiol. Infect., 1990, 103, p. 35-45.

57 - LICCIARDELLO J.J. NICKERSON J.T.R.

*Destruction of Salmonella in Hard-boiled eggs*  
American Journal of Public health october 1965, 55, p. 1622-1628.

58 - PERALES I. & GARCIA I.

*The influence of pH and temperature on the behaviour of Salmonella enteritidis PT4 in home-made mayonnaise*  
Letters in Applied Microbiology 1990, 10, 19-22.

59 - O.R.S.

*T.I.A. à Salmonella enteritidis en Haute-Vienne*  
Bulletin d'information de l'O.R.S. du Limousin, Fev. 1991, 32 p.

60 - NICOLAS J- A., CHAMPAGNOL M- P., FERAL M- L., MAURATILLE M.  
*Toxi-infections alimentaires familiales à Salmonella enteritidis en région Limousin.*

B.E.H., 1991, 16, p. 64-65.

61 - BOUE H. CHANTON R.

Zoologie tome II

2e édition, Paris, Edition DOIN, 1966, 636 p., 21 cm.

62 - GUILLOT J.F., MILLEMAN Y.

*Etude du portage salmonellique et essais de décontamination digestive chez les volailles.*

Colloque annuel de la section microbiologie alimentaire de la S.F.M. 13 et 14 mars 1991, I. PASTEUR, PARIS.

63 - MEAD G.C., BARROW P.A.

*Salmonella control in poultry by "competitive exclusion" or immunization*  
Letters in Appl. Microbiology, 1990, 10, p. 221-227.

64 - BERNARD G, TOSI JC

*Oeufs, volailles et Salmonella enteititidis*

Bull. Acad. Vét. de France 1990, 63 (suppl. au n°3) p. 17-31

65 - BEUDJE F., COLIN P., LAHELEC C.

*Influence de différents paramètres d'environnement sur la survie de certaines Salmonella dans les conditions simulant celles des poulaillers.*

Colloque annuel de la section microbiologie alimentaire de la S.F.M. 13 et 14 mars 1991, I. PASTEUR, PARIS.

66 - JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANCAISE

Oeufs et ovoproduits

Hygiène alimentaire, Brochure n° 1488-IV, 1987, 3e édition  
165 p., 21 cm.

67 - LEDERER J.

Hygiène Alimentaire tome II

LOUVAIN, Edition Nauwelaerts, 1971, 246 p, 24 cm

68 - SALVAT G., PROTAIS J., NICOLAS J.-A., FRANCHAT S., GERARD G.,  
CHARTIER F., HAMANN F., DEHAUMONT P.

*Oeufs et toxi-infection alimentaires à Salmonella*  
B.E.H., 1991, 25, p. 104-105.

69 - BILLAUX MS.

*Des salmonelles dans les oeufs*  
Gazette médicale, 1989, 96 (24), p. 61-63.



TABLE  
DES MATIERES

# TABLE DES MATIERES

PLAN .....	2
INTRODUCTION .....	11
PREMIERE PARTIE :	
RAPPELS SUR LES SALMONELLES .....	15
I/. HISTOIRE .....	15
II/. CARACTERES DES SALMONELLES .....	15
III/. ROLE PATHOGENE .....	16
IV/. CLINIQUE .....	17
V/. PHYSIOPATHOLOGIE .....	17
A/. Le processus entéro-invasif .....	18
B/. L'endotoxine lipopolysaccharidique .....	19
VI/. DIAGNOSTIC .....	19
A/. Diagnostic direct .....	19
B/. Diagnostic indirect .....	20
VII/. TRAITEMENT .....	23
DEUXIEME PARTIE :	
BILAN EPIDEMIOLOGIQUE .....	25
EN ANGLETERRE .....	25
I/. INTRODUCTION .....	25

II/.	METHODOLOGIE .....	25	
III/.	EVOLUTION DES FOYERS DE TIAC A SALMONELLES ...	26	
IV/.	PROGRESSION DU SEROTYPE ENTERITIDIS .....	29	
	A/.	Salmonella typhimurium .....	29
	B/.	Salmonella enteritidis .....	31
V/.	CARACTERISTIQUES DES TIAC A SALMONELLA ENTERITIDIS .....	33	
	A/.	Enquête sur les poulets .....	33
	B/.	Enquête sur les oeufs .....	33
VI/.	PRINCIPAUX ALIMENTS MIS EN CAUSE .....	34	
<b>EN FRANCE</b> .....		<b>36</b>	
I/.	METHODOLOGIE .....	36	
	A/.	Les données DDASS, DSV .....	36
	B/.	Les données du C.N.R. ....	42
II/.	LES T.I.A.C. A SALMONELLA ENTERITIDIS .....	42	
	A/.	T.I.A.C. tous germes confondus .....	43
	B/.	T.I.A.C. à Salmonelles .....	45
	C/.	T.I.A.C. à Salmonella enteritidis .....	45
	D/.	Types de restaurations .....	51
	E/.	Types d'aliments .....	55
	F/.	Conclusion .....	55
<b>EN HAUTE-VIENNE</b> .....		<b>56</b>	

I/. BILAN DES TIAC EN HAUTE-VIENNE .....	56
A/. 1984 .....	56
B/. Les premières TIAC à S. enteritidis en 87 .	57
C/. TIAC à S. enteritidis en 89-90 .....	58
D/. Enquête de 1989 .....	60
E/. Données du C.N.R. des Salmonella .....	61
II/. ETUDE D'UN CAS PARTICULIER .....	62
A/. Première toxi-infection .....	63
B/. Récidive .....	67
III/. CONCLUSION .....	70
<b>TROISIEME PARTIE :</b>	
<b>EXPERIMENTATIONS SUR LES OEUFS .....</b>	<b>73</b>
I/. INTRODUCTION .....	73
II/. RAPPELS SUR LA RECHERCHE DES SALMONELLES .....	75
A/. Prise d'essais .....	75
B/. Pré-enrichissement non sélectif .....	75
C/. Enrichissement sélectif .....	77
D/. Isolement et identification .....	78
E/. Confirmation .....	79
F/. Typage .....	88
G/. Lysotypage .....	93
III/. ETUDE DE LA SURVIE DE SALMONELLA ENTERITIDIS DANS LES OEUFS ET OVOPRODUITS .....	94
A/. Méthodologie .....	94

B/.	Expérimentation sur les mayonnaises .....	96
C/.	Expérimentation sur les omelettes .....	97
D/.	Expérimentation sur le blanc et le jaune séparés .....	102
E/.	Mise en évidence du pouvoir bactériostatique du lysozyme de blanc d'oeuf .....	105
IV/.	DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS .....	114
A/.	Notion de dose infectante .....	114
B/.	Multiplication de Salmonella enteritidis dans les oeufs .....	114
C/.	Influence de la température .....	116
D/.	Influence du pH .....	117
<b>QUATRIEME PARTIE :</b>		
<b>DISCUSSION .....</b>		
I/.	INTRODUCTION .....	121
II/.	LA CONTAMINATION DES OEUFS .....	122
A/.	Fréquence de la contamination .....	122
B/.	Mécanisme de la contamination .....	123
C/.	Niveau de la contamination .....	126
D/.	Moyens de lutte .....	127
III/.	CONSERVATION DES OEUFS .....	131
A/.	Rappels de législation .....	131
B/.	Les différentes méthodes de conservation .	134
C/.	Contrôles de qualité .....	137
D/.	Discussion .....	140
IV/.	UTILISATION DES OEUFS .....	141

A/. Dans la cuisine familiale .....	141
B/. Par l'industrie alimentaire .....	142
CONCLUSION .....	146
BIBLIOGRAPHIE .....	150
TABLE DES MATIERES .....	160

ROUQUIÉ (Jean-Philippe). — Survie de *Salmonella enteritidis* dans des préparations culinaires à base d'ovoproduits. — 164 f. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (Thèse : Pharm. ; Limoges ; 1992).

**RESUME :**

Depuis 1987, la France est touchée par une épidémie de Toxi-Infections Alimentaires Collectives à *Salmonella enteritidis*. Les œufs de poules s'avèrent être contaminés par ce sérotype, jusque-là rarement isolé.

Le but de notre travail a été de comprendre les causes et les mécanismes de cette épidémie. Après un bilan épidémiologique qui nous a permis de mesurer l'ampleur de ce phénomène, nous avons étudié le devenir de *Salmonella enteritidis* dans les constituants de l'œuf. Différents paramètres physico-chimiques ont été testés : températures de stockage, utilisation d'additifs alimentaires. Nous avons également étudié l'action du lysozyme de blanc d'œuf sur cette bactérie.

L'étude de la multiplication de *Salmonella enteritidis* dans les œufs nous a permis de mettre en évidence les lacunes de la législation actuelle réglementant le commerce des œufs. En outre, nous avons recensé les mesures prophylactiques qui permettraient de garantir aux ovoproduits une qualité microbiologique satisfaisante.

**MOTS CLES :**

- *Salmonella enteritidis*.
- Œufs.
- Ovoproduits.
- Epidémiologie.
- Technologies alimentaires.

**JURY :** Président : Monsieur le Professeur HABRIOUX.  
Juges : Monsieur le Professeur NICOLAS.  
Mademoiselle FÉRIAL, Médecin Inspecteur de la Santé.  
Madame DESSENDIER, Docteur en Pharmacie.