



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

MÉTHODE D'ISOLEMENT DES ESPÈCES DU GENRE *SALMONELLA*
SUR MILIEU MODIFIÉ SEMI-SOLIDE DE RAPPAPORT-VASSILIADIS (MSRV)

C. Poppe¹, E.D. Mann², S. Shaw³, D. Warburton⁴ et A. Sewell⁴
Laboratoire de référence pour les salmonelloses^{1,2}

Laboratoire des zoonoses alimentaires, Santé Canada, Guelph, N1G 3W4
Services de laboratoire³, [Agriculture] Agence canadienne de l'inspection des aliments, Ottawa,
Division de l'évaluation⁴, Bureau des dangers microbiens
Santé Canada, K1A 0L2

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détection des espèces viables et mobiles de *Salmonella* dans les provendes, les aliments crus, les fèces, le fumier, le duvet, la poussière et autres échantillons environnementaux. Ce test de dépistage convient également pour les aliments transformés et les échantillons environnementaux. La méthode ne devrait pas être utilisée pour la culture des échantillons lorsque la maladie Pullorum ou la Typhoïde aviaire, causées respectivement par *S. Pullorum* et *S. Gallinarum*, est suspectée. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-75 datée de septembre 1998 et le supplément daté de septembre 1999.

2. DESCRIPTION

Cette méthode a été mise au point par Chau et Huang (8.2) et DeSmedt et coll. (8.4, 8.5) et a été comparée à la méthode de la DGPS (MFHPB-20) par Poppe et coll. (8.9, 8.10) et Oggel et coll. (8.8) pour l'isolement de *Salmonella*. Cette méthode est fondée sur la capacité des espèces de *Salmonella* de se reproduire et d'être mobiles dans le milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) après incubation à 42 °C sous des conditions adéquates d'humidité. La plupart des souches de *Salmonella* sont capables de migrer à plus de 20 mm du point d'inoculation en 24-48 heures (un minimum de 48 heures est recommandé pour les aliments transformés et autres échantillons ayant subi un stress). L'utilisation de ce milieu peut réduire de 24 heures le temps requis pour l'identification d'un échantillon positif comparativement à la méthode conventionnelle de culture.

3. PRINCIPE

Le milieu MSRV est composé d'une gélose semi-solide très molle. Les boîtes de gélose sont fragiles et il faut les manipuler avec soin. Elles sont toutefois très simples à utiliser et permettent habituellement de poser un diagnostic sérieux sur la présence présumée de *Salmonella* moins de 48 heures après l'ensemencement des bouillons de pré-enrichissement. Après le pré-enrichissement, la gélose MSRV est ensemencée. Les *Salmonella* mobiles migrent au travers de la surface de la gélose semi-solide.

Note : Cette méthode ne détecte pas les *Salmonella* non mobiles. Aucune souche pathogène non mobile n'a été incriminée dans les intoxications alimentaires depuis 1964 (8.11; E.C.D. Todd, comm. pers.). Les souches non mobiles représentent moins de 1 % des isolats provenant des échantillons cliniques et des provendes (J. Oggel, Agriculture et Agro-Alimentaire Canada (AAAC) et H. Lior, Direction générale de la protection de la santé (DGPS), comm. pers.). Des épreuves de confirmation biochimique et sérologique sont effectuées sur des colonies isolées.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe A du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS

Les milieux énumérés plus bas (1 à 4) sont commercialement disponibles et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3, la référence 8.1 ou autre source appropriée pour la formulation des milieux individuels.

Note: Si l'analyste utilise toute variation des milieux énumérés ci-après (produit disponible commercialement ou préparé à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au surveillant du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) Milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV)
- 2) Eau peptonée tamponnée (EPT), bouillon nutritif (BN) ou d'autres milieux de pré-enrichissement tel que spécifié pour les commodités particulières (voir MFHPB-20, tableau 3)
- 3) Boîtes de gélose MacConkey
- 4) Bouillon au tétrathionate et vert brillant (TBG)
- 5) Milieux pour les épreuves de confirmation (tels que pentes de gélose aux trois sucres et au fer (TSI) et de gélose lysine-fer) au besoin (voir MFHPB-20)
- 6) Sacs à stomacher pour les homogénats
- 7) Grands sacs en plastique résistants, pour la technique de rinçage de la volaille
- 8) Incubateurs, contrôlés par thermostat, à 35 et 42 °C

Note: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que l'on maintient les incubateurs ou les bains-marie à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, les incubateurs peuvent être réglés à 35 +/-1,0 °C. De même, une température moindre, soit de 30 ou 25 degrés, peut s'établir à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est crucial de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/-0,5 °C de la température recommandée car des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

- 9) Culture témoin - Positive: *Salmonella* Typhimurium (ATCC #14028) ou *S. Berta* (ATCC #8392), ou autre culture de *Salmonella* mobile; Négative: *E. coli* ou autre non-salmonelle
- 10) Antisérums polyvalents et/ou antisérums somatiques spécifiques

- 11) Trousses de confirmation: c.à-d., API-20E, Enterotube, Vitek ou autres trousse ou techniques commercialement disponibles.

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage peut être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage peuvent être regroupées lorsque les exigences du plan d'échantillonnage applicable peuvent être rencontrées.

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5°C) ou au congélateur, selon la nature du produit, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température empêchant la croissance ou la destruction microbienne.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir en main les milieux stériles de pré-enrichissement.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail à l'aide d'un désinfectant approprié.

7.3 Analyse de l'échantillon

- 7.3.1 Afin d'assurer la représentativité de chaque unité d'analyse, agiter les liquides ou les matières fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion à différents endroits dans l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut regrouper les unités d'analyse. Il est recommandé que l'échantillon composite ne contienne pas plus de cinq unités d'analyse.

7.3.2. Volaille entière

Déposer la carcasse entière, incluant les abats et les égouttures, si présents, dans un grand sac en plastique résistant, dans des conditions aseptiques. Ajouter 1000 ml d'EPT ou de BN comme pré-enrichissement pour les poulets à griller ou 1500 ml pour les carcasses de dindon. Agiter vigoureusement pendant 30 secondes afin que toutes les surfaces et les cavités de l'échantillon entrent en contact avec le bouillon. Retirer la carcasse du bouillon, laisser égoutter le liquide des cavités de la carcasse dans le sac en plastique.

7.3.3 Échantillons liquides (plasma sanguin, eau de réservoir de refroidissement, etc)

Ajouter aseptiquement 25 ml (ou un volume d'échantillon requis pour maintenir une dilution finale 1:10) à 225 ml d'EPT ou de BN.

7.3.4. Viandes crues

Si l'on n'analyse pas pour déceler la présence d'autres organismes, une technique de rinçage similaire à la technique décrite pour la volaille peut être utilisée. Utiliser 200 ml d'EPT ou BN par échantillon de 100 g. On peut aussi placer un échantillon de 25 g dans 225 ml de pré-enrichissement et macérer le tout dans le mélangeur Stomacher.

7.3.5 Provendes et ingrédients de provende, échantillons environnementaux (échantillons secs, poussière, etc, ou écouvillons)

Équilibrer le 25g, 100 g (ou le poids de l'échantillon) dans 2 volumes d'EPT ou BN pendant une heure à 35°C. Ajouter 7 autres volumes de bouillon de pré-enrichissement et mélanger au stomacher.

7.3.6. Pour les autres échantillons, voir MFHPB-20, tableau 3.

Note : Les ratios de dilution pour les épices et les assaisonnements peuvent varier. Voir MFHPB-20, tableau 5.

7.3.7 Incuber le bouillon de pré-enrichissement ensemencé dans un sac en plastique ou le contenant original de bouillon pendant 18 à 24 heures à 35 °C.

7.3.8 Ensemencer les cultures témoins dans des tubes du même pré-enrichissement utilisé pour l'analyse. Utiliser ces cultures témoins pour inoculer tous les milieux subséquents.

Note : Il est recommandé d'ensemencer le témoin positif en dernier afin d'éviter tout risque de contaminer les échantillons analysés par les *Salmonella*.

Enrichissement secondaire

7.3.9 Inoculer 0,1 ml de bouillon de pré-enrichissement sur un côté d'une boîte de gélose MSR/V, à quelques millimètres de la paroi de la boîte. Procéder de la même façon pour inoculer les bouillons témoins positif et négatif sur d'autres boîtes de gélose.

7.3.10 Empiler les boîtes de gélose MRS/V dans des cabarets, pas plus de 3 boîtes de hauteur, et incuber à l'endroit dans un incubateur à humidité élevée, pendant 24-72 heures à 42 °C.

7.3.11 Examiner les géloses après 24 ± 2 h (à l'aide d'une lampe d'observation, si requis). Mesurer la distance à partir du bord du point d'inoculation jusqu'à la limite extérieure de la migration. Si la migration n'est pas évidente ou est inférieure à 20 mm, incuber de nouveau et réexaminer une fois ou plus au besoin, de 48 ± 4 h jusqu'à un maximum de 72 ± 6 h d'incubation (ceci permettra une meilleure régénération des *Salmonella* endommagées dans les aliments transformés et dans les échantillons ayant subi un stress). A ce point, la gélose MRS/V est déclarée négative pour *Salmonella* si la migration est encore inférieure à 20mm.

7.3.12 Prélever un inoculum à partir du bord extérieur de la zone de migration (c.à d., le plus éloigné du point d'inoculation) et ensemencer une gélose MacConkey pour obtenir des colonies isolées. Incuber à 35°C pendant 18-24 heures. Prélever des colonies isolées à partir de la gélose MacConkey pour les épreuves de confirmation.

7.3.13 Se référer à la méthode MFHPB-20 pour les épreuves de confirmation.

Facultatif:

Note: L'addition des étapes suivantes réduira la probabilité des résultats faux-négatifs (données non publiées).

7.3.14 Pipetter 1,0 ml du bouillon de pré-enrichissement dans 9,0 ml de bouillon au tétrathionate et vert brillant (TBG). Incuber à 42°C pendant 24 ± 2 heures.

7.3.15 Inoculer une boîte de gélose MRSV tel qu'indiqué au point 7.3.9 et procéder aux étapes 7.3.10 à 7.3.13.

7.4 Interprétation

Si la zone de migration a plus de 20 mm, les réactions biochimiques sont typiques pour *Salmonella* (voir MFHPB-20, tableau 4) et la sérologie est positive, l'isolat est considéré positif pour *Salmonella* spp.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Chau, P.Y and C.T. Huang.1976. A simple procedure for screening Salmonellae using a semi-solid enrichment and semi-solid indicator medium. *J. Appl. Bacteriol.* **41**:283-294.
- 8.3 D'Aoust, J-Y. 2000. In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Volume 2, pp. 1233-1299, B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds), Aspen Publishers Inc. Gaithersburg,
- 8.4 DeSmedt, J.M., R.F. Bolderdijk, H.F. Rappold and D. Lautenschlaeger. 1986. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food Prot.* **49**: 510-514.
- 8.5 DeSmedt, J.M. and R.F. Bolderdijk. 1987. Dynamics of *Salmonella* isolation with Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food Prot.* **50**: 658-661.
- 8.6 De Smedt, J. and R. Bolderdijk. 1994. *Salmonella* detection in coca and chocolate by motility enrichment on Modified Semi-solid Rappoport-Vassiliadis Medium: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **77**(2): 365-373.
- 8.7 De Zutter, L., J.M. De Smedt, R. Abrams, H. Beckers, M. Catteau , J. de Borchgrave , J. Debevere, J. Hoekstra, F. Jonkers, J. Lenges, S. Notermans, L. Van Damme, R. Vandermeersch, R. Verbraeken and G. Waes. 1991. Collaborative study on the use of motility enrichment on Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *Int. J. of Food Microbiol.* **13**: 11-20.
- 8.8 Oggel, J., D.C. Nundy, P.A. Zebchuk and S.J. Shaw. 1995. Reliability of the Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis agar and the modified 1-2 Test™ system for detection of *Salmonella* in poultry feeds. *J. Food Prot.* **58**:98-101.
- 8.9 Poppe, C., R.J. Irwin, C.M. Forsberg, R.C. Clarke and J.J. Oggel. 1991. The prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial layer flocks. *Epidemiol. Infect.* **106**: 259-270.
- 8.10 Poppe, C., C.L. Duncan and A. Mazzocco. 1998. *Salmonella* contamination of hatching and table eggs: a comparison. *Can. J. Vet. Res.* **62**: 191-198.
- 8.11 Warburton, D.W., J. Oggel, B. Bowen, et al. 1993. A comparison study of the modified 1-2 Test and the standard HPB method in the isolation of *Salmonella*. *Food Microbiol.* **11**:253-263.
- 8.12 Wiberg, C. and P. Norberg. 1996. Comparison between a cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth and motility enrichments on Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection from food and feed. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 353-360.

FIGURE # 1: DIAGRAMME - ISOLEMENT DE SALMONELLA SUR MSR/V

