
GELOSE MSR/V

DETECTION DES *SALMONELLA* MOBILES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose de Rappaport-Vassiliadis semi-solide modifiée (MSRV) est un milieu sélectif, historiquement utilisé pour l'isolement des *Salmonella* dans les produits de chocolaterie et les autres produits alimentaires.

Elle est très utilisée dans le domaine de la santé animale chez les mammifères, les oiseaux et dans l'environnement des productions animales. Elle est aussi préconisée pour la recherche des salmonelles mobiles dans les matières fécales des animaux et les échantillons environnementaux au stade de la production primaire.

Le milieu ne convient pas pour les salmonelles immobiles (*Salmonella* Gallinarum et Pullorum).

La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF EN ISO 6579-1/A1, NF U47-100, NF U47-101 et NF U47-102.

2 HISTORIQUE

Développée par De Smedt *et al*, la composition du milieu dérive de celle du bouillon de Rappaport-Vassiliadis, rendu semi-solide par adjonction d'une faible quantité d'agar. Sa sélectivité est réajustée par abaissement du taux de chlorure de magnésium présent dans ce bouillon et ajout de novobiocine à hauteur de 10 mg/L.

La gélose MSR/V (ISO 6579) est utilisée pour la recherche des salmonelles dans les prélèvements réalisés dans l'environnement (matières fécales animales et échantillons environnementaux) des élevages et des couvoirs, ainsi que pour la mise en évidence des salmonelles chez les oiseaux (œufs à couver, prélèvements d'organes) et chez les mammifères.

3 PRINCIPES

L'efficacité bactériologique est fondée sur la capacité des salmonelles à migrer de façon sélective dans le milieu.

Le milieu ne convient pas pour les salmonelles immobiles (*Salmonella* Gallinarum, Pullorum et certains variants Typhimurium monophasiques). Si la présence de telles salmonelles est suspectée, les cultures obtenues sur le milieu de pré-enrichissement doivent être repiquées sur les milieux appropriés, en suivant les procédures adaptées.

Les bactéries contaminantes sont inhibées par la forte concentration en chlorure de magnésium, ainsi que par la présence de vert malachite.

La Novobiocine permet d'inhiber la plupart des microorganismes à Gram positif et d'éviter le développement des *Proteus*.

Les *Salmonella* produisent un halo opaque, témoin de la culture.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	4,6 g
- Hydrolysate acide de caséine	4,6 g
- Chlorure de sodium	7,3 g
- Phosphate monopotassique.....	1,5 g
- Chlorure de magnésium anhydre	10,9 g
- Vert malachite (oxalate)	0,04 g
- Novobiocine	0,01 g
- Agar agar bactériologique	2,70 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,1-5,4.

Remarque : cette formule correspond à la formule complète décrite dans la note 2 du paragraphe B.4.6.2 Préparation en page 8 de l'amendement A1 de la norme NF EN ISO 6579-1(Mars 2020).

Pour 31,7 g de milieu déshydraté BK191

- Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux 4,6 g
- Hydrolysate acide de caséine 4,6 g
- Chlorure de sodium 7,3 g
- Phosphate monopotassique 1,5 g
- Chlorure de magnésium anhydre 10,9 g
- Vert malachite (oxalate) 0,04 g
- Novobiocine 0,01 g
- Agar agar bactériologique 2,70 g

Pour 31,6 g de milieu de base déshydraté BK134

- Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux 4,6 g
- Hydrolysate acide de caséine 4,6 g
- Chlorure de sodium 7,3 g
- Phosphate monopotassique 1,5 g
- Chlorure de magnésium anhydre 10,9 g
- Vert malachite (oxalate) 0,04 g
- Agar agar bactériologique 2,70 g

Pour un flacon de supplément BS056

- Novobiocine 40 mg

Pour un flacon de supplément BS033

- Novobiocine 10 mg

5 PREPARATION

A partir du milieu complet BK191

- Mettre en suspension 31,7 g de milieu complet déshydraté (BK191) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Ne pas retourner les boîtes.

✓ **Reconstitution :**
31,7 g/L

✓ **Stérilisation :**
Ne pas autoclaver

A partir du milieu déshydraté de base (BK134) et du supplément Novobiocine

- Mettre en suspension 31,6 g de milieu de base déshydraté (BK134) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.
- Reconstituer le supplément Novobiocine 10 mg (BS033) avec 5 mL d'eau stérile ou le supplément Novobiocine 40 mg (BS056) avec 20 mL d'eau stérile.
- Agiter ou vortexer de façon à assurer une dissolution complète, tout en évitant la formation de mousse.
- Ajouter stérilement 0,5 mL de supplément sélectif Novobiocine pour 100 mL de milieu de base préparé.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Ne pas retourner les boîtes.

✓ **Reconstitution :**
31,6 g/L

✓ **Stérilisation :**
Ne pas autoclaver

✓ **Réhydratation supplém.**
5 mL eau stérile BS033
20 mL eau stérile BS056

✓ **Ajout base :**
0,5 mL / 100 mL

Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier :

- Faire fondre le milieu prêt-à-liquéfier (BM127) pendant le minimum de temps nécessaire à sa reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.

- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Ne pas retourner les boîtes.

6 MODE D'EMPLOI

- Ne pas sécher les boîtes ainsi préparées.
- Ensemencer trois gouttes (environ 0,1 mL) de la culture provenant d'un milieu de pré-enrichissement, au centre d'une boîte de milieu. Ne pas retourner les boîtes
- Incuber à $41,5 \pm 1$ °C pendant 24 ± 3 heures. Au constat de l'absence de migration, l'incubation sera éventuellement prolongée de 24 heures supplémentaires.

✓ **Ensemencement :**
3 gouttes au centre de la gélose

✓ **Incubation :**
24 h à 41,5 °C

NOTE

Si l'échantillon à tester est suspecté de contenir un élément inhibiteur de la croissance bactérienne ou lorsqu'on opère un contrôle de désinfection/nettoyage, il pourra être utile d'ajouter au milieu de pré-enrichissement des neutralisants de désinfectants.

Si la présence de salmonelles immobiles est suspectée, les cultures obtenues sur le milieu de pré-enrichissement doivent être repiquées sur les milieux appropriés, en suivant les procédures adaptées.

7 LECTURE

Le développement d'un halo opaque blanchâtre centré sur le point d'ensemencement indique présomptivement la présence de *Salmonella*.

Des subcultures peuvent être réalisées en prélevant une fraction de culture sur le bord externe du halo pour en confirmer la pureté et effectuer les tests biochimiques et sérologiques complémentaires.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre bleue, fluide et homogène.

Suppléments Novobiocine : lyophilisat blanc, donnant après reconstitution une solution incolore, limpide.

Milieu préparé (complet) : gélose bleue, semi-solide.

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 41,5 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WDCM 00031	Culture blanchâtre, opaque, ≥ 30 mm
<i>Salmonella</i> Enteritidis	WDCM 00030	Culture blanchâtre, opaque, ≥ 30 mm
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée

9 CONSERVATION

Milieus déshydratés : 2-30 °C.

Suppléments lyophilisés : 2-8 °C

Milieu prêt-à-liquéfier en flacons : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Supplément réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °C

Milieu préparé en boîtes (*) : 15 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté complet

Flacon de 500 g BK191HA

Milieu de base déshydraté (sans Novobiocine) :

Flacon de 500 g BK134HA

Supplément sélectif Novobiocine :

Coffret de 10 flacons de 10 mg BS03308

Coffret de 8 flacons de 40 mg BS05608

Milieu prêt-à-liquéfier

Pack de 10 flacons de 200 mL BM12708

11 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

De Smedt, J.M., Bolderdijk, R.F., Rappold, H. and Lautenschlaeger, D.. 1986. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis medium. *Journal of Food Protection*, **49** : 510-514.

De Smedt, J.M. and Bolderdijk, R.F.. 1987. Dynamics of *Salmonella* isolation with Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis medium. *Journal of Food Protection*, **50** : 658-661.

Bolderdijk, R.F. and Milas, J.E.. 1996. *Salmonella* detection in dried milk products by motility enrichment on modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium: collaborative study. *Journal of AOAC International*, **79** : 441-450.

Voogt N., Raes, M., Wannet, W.J.B., Henken, A.M. and van de Giessen, A.W.. 2001. Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. *Letters in Applied Microbiology*, **32** : 89-92.

NF U47-100. Juillet 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

NF U47-101. Novembre 2007. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les oiseaux.

NF U47-102. Janvier 2008. Méthodes d'analyse en santé animale. Isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles chez les mammifères.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 6579-1. Avril 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : recherche des *Salmonella* spp..

NF EN ISO 6579-1/A1. Mars 2020. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* - Partie 1 : Recherche des *Salmonella* P spp.- Amendement 1 : Extension de la plage de températures pour l'incubation, amendement du statut de l'Annexe D et correction de la composition des milieux MSRV et SC.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : MSRV GELOSE_FR_V16

Date création : 03-2007

Date de révision : 01-2022

Motif de révision : Correction volume d'ajout en supplément, en paragraphe 5

Gélose MSR/V

Détection des *Salmonella*.

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 41,5 °C.

***Salmonella* Typhimurium**

Colonie caractéristique :
couleur blanchâtre, présence
d'un halo opaque centré au
point d'inoculation.



***Enterobacteriaceae* immobile**

Colonie caractéristique :
absence de halo opaque;
croissance centrée uniquement
sur le point d'inoculation.

