

# Intérêt du milieu Rambach pour l'isolement et l'identification rapide des *Salmonella*

P. LAUDAT\* et J.-P. WERTHEIMER\*\*

## RÉSUMÉ

Rambach est un nouveau milieu pour l'isolement des *Salmonella* spp.

Cette étude évalue sur 247 examens de selles, les performances du milieu Rambach (Technogram) qui a été testé en parallèle du milieu Hektoen (Korano) avant et après enrichissement en milieu Rappaport.

Le milieu Rambach contient du propylène glycol et un substrat chromogène révélateur de  $\beta$ -galactosidase. Après incubation de 24 heures à 35-37 °C, seules les *Salmonella* apparaissent sous forme de colonies de deux à quatre mm à centre rouge et à bords incolores ou roses pâles.

Sur les 247 coprocultures consécutives testées, 17 souches de *Salmonella* ont été isolées : 17 sur milieu Rambach et seulement 12 sur milieu Hektoen.

En outre, le milieu a été testé sur les prélèvements vétérinaires et agro-alimentaires toujours en parallèle du milieu Hektoen. Au cours des cinq derniers mois, 53 *Salmonella* ont été retrouvées parfois sur milieu Hektoen et toujours sur milieu Rambach. La non ambiguïté de la réponse rouge du Rambach fait que l'examen d'une seule colonie « pré-identifiée *Salmonella* » est plus performant que l'examen de cinq colonies « suspectes » sur Hektoen. Les temps de lecture, de manipulation et les coûts de réactif se trouvant de ce fait diminués. Le milieu Rambach permet d'optimiser la recherche des *Salmonella* en bactériologie médicale, vétérinaire ou agro-alimentaire.

## MOTS-CLÉS

*Salmonella* – milieu Rambach – milieu d'isolement – identification rapide.

## SUMMARY

Because of the ubiquitous occurrence of *Salmonella* spp. and the high incidence of salmonellosis in foodborne disease, identification of pathogenic *Salmonella* is worldwide problem.

Rambach agar exploits a novel phenotypic characteristic of *Salmonella* spp: the formation of acid from propylene glycol, this characteristic is used in combination with a chromogenic indicator of beta-galactosidase to differentiate *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other members of the enterobacteriaceae.

Among veterinary specimens (food, water), 53 *Salmonella* strains were isolated on Rambach agar easily. *Salmonella* spp. yield distinct, bright red colonies on this medium, allowing rapid and facilitated identification and unambiguous differentiation from *Proteus* spp. and *Citrobacter* spp.

A second clinical study was conducted to compare the Rambach agar, with conventional methods. Rambach agar has been tested as well as the Hektoen medium. Among the 247 consecutive stools tested, 17 *Salmonella* strains were isolated: 17 on Rambach agar and only 12 on Hektoen (increased isolates 30%).

The authors propose Rambach agar as a new plate medium for rapid and facilitated identification of *Salmonella* spp.

## KEY-WORDS

*Salmonella* – Rambach agar – isolation medium – rapid identification.

## Introduction

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont en augmentation essentiellement dues aux *Salmonella* spp. qui constituent une source importante d'entérites infectieuses (1).

La méthode de recherche des *Salmonella* comporte des milieux d'isolement sélectifs (Hektoen, SS, DCLS)

et un enrichissement (Mueller Kauffman, Rappaport, Sélénite) (3).

\* Ancien assistant au CHU de Tours  
Laboratoire Arnaud – Tours.

\*\* Symbiolab – Tours.

TIRÉS A PART :

M. P. LAUDAT – Laboratoire Arnaud  
40, rue Jules-Simon - 37010 TOURS

article reçu le 12 juin, accepté le 19 septembre 1991.

En 1990, RAMBACH proposa un nouveau milieu d'isolement pour la mise en évidence des *Salmonella* spp. qui à la différence des autres milieux existant utilise un caractère positif des *Salmonella* : acidification du propylène glycol (5). Nous avons testé dans ce travail le milieu Rambach en bactériologie médicale et en milieu vétérinaire et agro-alimentaire, en parallèle au milieu Hektoen.

## 1. Matériel et méthode

Une première étude en bactériologie médicale a été réalisée sur 247 coprocultures successives adressées au laboratoire entre juillet et décembre 1990. Ces selles provenaient de consultants externes et de malades hospitalisés dans des unités de médecine et de chirurgie de cliniques d'hospitalisation du secteur privé.

L'inoculum a été réalisé par mise en suspension d'une noix de selles dans 10 ml d'eau peptonée.

Cette suspension a été utilisée pour l'ensemencement des milieux usuels (Hektoen, Rambach, CIN et Karmali) respectivement pour la recherche de *Salmonella-Shigella*, *Yersinia* et *Campylobacter*. En outre, le milieu de Rappaport a été ensemencé par trois gouttes d'inoculum et après 24 heures à 37 °C repiqué sur milieu Hektoen et Rambach en vue de la recherche de *Salmonella*. Tous les milieux d'isolement en boîte ont été incubés 24 heures à 37 °C (2).

Le lendemain et le surlendemain, le repérage des colonies suspectes a été réalisé selon les critères habituels, repiquage des colonies lactose négatif ( $H_2S \pm$ ) sur milieu Hektoen ou colonies à centre rouge sur milieu de Rambach. Chaque type de colonie suspecte a été testé en milieu urée-indole et identifié en galerie Api 20E. L'identification des *Salmonella* a été poursuivie : activité du phage *Salmonella* (Diagnostics Pasteur) et typage à l'aide des immuno-sérums de Diagnostics Pasteur. L'identification complète a été confiée à l'Institut Pasteur si nécessaire.

Dans le secteur vétérinaire du laboratoire, une deuxième étude a été réalisée : le milieu Rambach a été évalué systématiquement en parallèle du milieu Hektoen pour la recherche de

*Salmonella* après enrichissement sur milieu Rappaport. Au total, 410 prélèvements ont été analysés sur une période de quatre mois en milieu aviaire : contrôle de poussins, de couvoirs et produits pathologiques.

## 2. Résultats

### 1. Étude en secteur médical

Sur les 247 coprocultures analysées, 12 souches de *Salmonella* ont pu être isolées sur milieu Hektoen et milieu Rambach alors que 5 n'ont pu être retrouvées que sur milieu Rambach. Les résultats évalués quantitativement sont représentés tableau I.

Le repérage des *Salmonella* à l'isolement et après enrichissement a été obtenu sur 27 boîtes sur milieu Rambach contre 17 sur milieu Hektoen ( $p < 0,01$ ).

Cette différence s'explique par le fait qu'il suffit d'isoler une ou deux colonies suspectes rouges, sur milieu Rambach et non plus cinq colonies comme sur milieu Hektoen parce que le Rambach utilise un critère positif (coloration rouge spécifique des *Salmonella*) (figure 1).

Ce milieu nous a permis d'augmenter nos isolements de *Salmonella* de 30 %.

### 2. Étude en secteur vétérinaire

En milieu vétérinaire sur les 410 prélèvements analysés, 53 *Salmonella* ont pu être isolées et identifiées sur le milieu Rambach qui n'a jamais été en défaut au lieu de 30 *Salmonella* retrouvées sur milieu Hektoen.

Il s'agissait de *S. typhimurium* : 16, *S. enteritidis* : 5, *S. branderup* : 4, *S. heidelberg* : 6, *S. infantis* : 4, *S. vireshow* : 4, *S. saint-Paul* : 4, *Salmonella* sérotype divers : 10.

Les 53 résultats positifs concernent : 24 contrôles de poussins, 20 produits pathologiques aviaires et 9 contrôles de couvoirs (eaux : 6 et surfaces : 3).

Toujours pour cette même raison, repérage facilité des colonies suspectes par un caractère positif des *Salmonella*, la lecture du milieu Hektoen a été progressivement abandonnée car conduisant à un nombre trop important de colonies suspectes s'avérant être non *Salmonella* : *Proteus*, *Citrobacter*, *Providencia*...

TABLEAU I  
Evaluation des *Salmonella* isolées  
sur milieu Rambach et Hektoen en bactériologie médicale :  
à propos de 247 coprocultures

	MILIEU HEKTOEN		MILIEU RAMBACH	
	isolement	après enrichissement	isolement	après enrichissement
<b>Salmonella groupe B</b>				
<i>S. paratyphi</i> B	2	3	3	3
<i>S. typhimurium</i>	1	2	2	4
<i>S. branderup</i>	0	2	2	5
<b>Salmonella groupe D</b>				
<i>S. enteritidis</i>	2	5	3	5
<b>TOTAL</b>	5 (29,4 %)	12 (70,6 %)	10 (58,8 %)	17 (100 %)
<b>(sensibilité) %</b>	17*		27*	

\*  $p < 0,01$

## 3. Discussion

Les milieux d'isolement classiques utilisés pour la détection des *Salmonella* orientent le repiquage des colonies suspectes mais donnent de nombreux suspects négatifs qui doivent être ensuite éliminés par l'identification.

Le milieu testé ici utilise un critère positif (coloration rouge due à l'acidification du propylène glycol) étant ainsi moins exposé au risque de résultats faussement positifs que les milieux classiques (4). De ce fait, l'examen d'une seule colonie « pré-identifiée » de *Salmonella* sur milieu Rambach est plus puissant que l'examen de cinq colonies suspectes sur milieu traditionnel, le choix de colonies suspectes étant aléatoire. Les colonies « pré-identifiées » *Salmonella* peuvent être confirmées rapidement et économiquement en raison de la spécificité des marqueurs utilisés.

Pour développer le milieu qui porte son nom, RAMBACH (5) a pris en compte une caractéristique de l'espèce : la capacité d'acidification du propylène glycol qui existe pour l'ensemble des *Salmonella* à l'exclusion de *S. typhi* et *S. paratyphi* A.

Sur les 247 coprocultures étudiées, 6,9 % ont permis la culture d'une espèce de *Salmonella*. Dans 29,4 % des cas seulement, la bactérie a été isolée avant enrichissement sur milieu Hektoen et dans 58,8 % des cas sur milieu Rambach. Ces résultats sont conformes aux données classiques, le nombre des isolements pouvant être multipliés par deux à cinq fois selon LE MINOR (3) après enrichissement. La mise en évidence de *Salmonella* a pu être faite dans 17 cas pour le milieu Rambach contre 12 pour le milieu Hektoen. Dans 5 cas, le milieu Hektoen a donc été mis en défaut par rapport au milieu Rambach.

Il faut cependant dire que le milieu Rambach n'est pas adapté à la mise en évidence de *S. typhi* et *S. paratyphi* A. Il convient de rappeler également que le milieu de Rappaport n'est pas adapté à l'enrichissement de *S. typhi* (6). Toutefois, la fréquence en France de *S. typhi* et encore plus de *S. paratyphi* A étant bien inférieure à celle des autres *Salmonella* spp., il semble justifié d'utiliser le milieu Rambach en dehors d'une recherche spécifique de *S. typhi* ou d'un contexte épidémiologique particulier. Ce milieu nous a d'ailleurs permis d'augmenter le nombre de nos isolements de *Salmonella* spp. de 30 %.

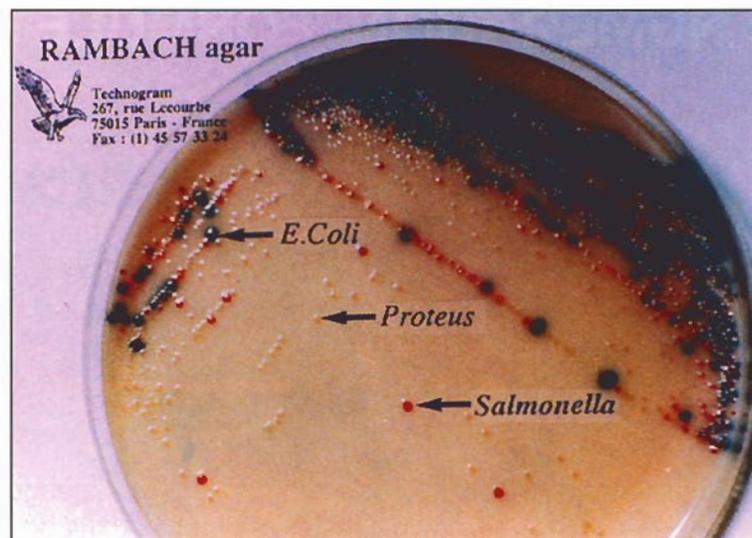
En pratique médicale, en vue d'optimiser la recherche de *Salmonella*, il est possible de proposer le schéma suivant :

- isolement primaire sur milieu Rambach et Hektoen ou SS (repérage de *S. typhi*) ;
- enrichissement sur milieu Rappaport et repiquage sur milieu Rambach.

Cette démarche permet un repérage efficace et rapide de l'ensemble des souches de *Salmonella*.

En milieu vétérinaire, l'apport du milieu Rambach est considérable par la discrimination des souches de *Salmonella* au milieu des flores holoxéniques.

**FIGURE 1**  
Différenciation de *Salmonella* sur milieu Rambach



### Conclusion

**Le milieu Rambach, permettant simultanément isolement et identification des agents pathogènes, appartient à une nouvelle génération de milieux dont le développement est prévisible dans un proche avenir.**

## BIBLIOGRAPHIE

1. ARCHER D.L., YOUNG F.E. - Contemporary issues : diseases with a food vector. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1** : 377-398.
2. AUDURIER A., LOULERGUE J., LAUDAT P., CARBONNELLE J. - Analyse bactériologique des selles. In : CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R. - *Bactériologie médicale*, pp. 61-69. Simep Ed., Paris, 1987, 330 p.
3. LE MINOR L. - Le diagnostic de laboratoire des bacilles à Gram négatif. *Entérobactéries*. Tome I, Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé, 1972.
4. POISSON D.M., RAKOTONDRAZAKA M., THUAL M.C., CANON N. - *Salmonella agona* saccharose-positif : problèmes posés par son isolement et son identification. *Feuil. Biol.*, 1988, **24** : 13-17.
5. RAMBACH A. - New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *J. App. Microbiol.*, 1990, **56** : 301-303.
6. SAIVIN S., BOUCHARD S., MEGRAUD F. - Intérêt du milieu de Rappaport pour l'enrichissement des *Salmonella* en bactériologie médicale. *Rev. Fr. Lab.*, 1989, **189** : 51-54.