

BOUILLON MULLER-KAUFFMANN AU TETRATHIONATE-NOVOBIOCINE (MKTTN)

ENRICHISSEMENT SELECTIF DES *SALMONELLA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon MKTTn (Müller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine) est l'un des milieux d'enrichissement sélectifs utilisé pour la recherche des salmonelles suivant la méthode horizontale décrite dans la norme internationale NF EN ISO 6579-1. Associé au MSRV, il fait également partie du protocole mis en œuvre pour l'isolement et l'identification des salmonelles dans l'environnement des productions animales. (NF U47-100), chez les oiseaux (NF U47-101) et chez les mammifères (NF U47-102).

Le bouillon MKTTn est aussi utilisé comme second milieu d'enrichissement sélectif pour la recherche de *Salmonella* dans les eaux suivant le protocole décrit dans la norme NF EN ISO 19250.

2 HISTORIQUE

Le milieu a été décrit par Müller en 1923, afin de pouvoir favoriser l'inhibition des coliformes, tout en permettant le développement des bacilles typhiques et paratyphiques. Kauffmann, en modifiant la formule, a obtenu un plus grand nombre de résultats positifs avec cette méthode d'enrichissement préalable qu'avec la méthode directe d'isolement sur des milieux sélectifs coulés en boîtes.

3 PRINCIPES

Les sels biliaires et le vert brillant inhibent principalement le développement des microorganismes à Gram-positif.

La production extemporanée de tétrathionate, résultant de l'action de la solution iodo-iodurée sur le thiosulfate de sodium, provoque l'inhibition des coliformes et de la plupart des bactéries intestinales.

La novobiocine inhibe le développement des *Proteus*.

Le carbonate de calcium neutralise l'acide sulfurique qui est produit lorsque le tétrathionate est réduit. L'effet résultant est de favoriser le maintien du pH.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1025 mL de milieu :

- Tryptone	8,6 g
- Extrait de viande	4,3 g
- Sels biliaires	4,78 g
- Chlorure de sodium	2,6 g
- Carbonate de calcium	38,7 g
- Thiosulfate de sodium anhydre*	30,45 g
- Vert brillant	9,6 mg
- Iode	4,0 g
- Iodure de potassium.....	5,0 g
- Novobiocine	40 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 - 8,0

Pour 89,5 g de base déshydratée BK208

- Tryptone	8,6 g
- Extrait de viande	4,3 g
- Sels biliaires	4,78 g
- Chlorure de sodium	2,6 g
- Carbonate de calcium	38,7 g
- Thiosulfate de sodium anhydre*	30,45 g
- Vert brillant	9,6 mg
- Novobiocine	40 mg

Iode, iodure de potassium :

Non fournis

Pour 89,5 g de base déshydratée BK169

- Tryptone	8,6 g
- Extrait de viande	4,3 g
- Sels biliaires	4,78 g
- Chlorure de sodium	2,6 g
- Carbonate de calcium	38,7 g
- Thiosulfate de sodium anhydre*	30,45 g
- Vert brillant	9,6 mg

Pour un flacon de supplément BS056

- Novobiocine 40 mg

Pour un flacon de supplément BS033

- Novobiocine 10 mg

Iode, iodure de potassium :

Non fournis

* NOTE : 30,45 g de thiosulfate de sodium anhydre sont équivalent à 47,8 g de thiosulfate de sodium pentahydraté.

5 PREPARATION

A partir du milieu de base BK208

- Mettre en suspension 89,5 g de milieu de base déshydraté (BK208) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter à ébullition lentement, sous agitation constante.
- Maintenir l'ébullition pendant 2 minutes.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir le milieu jusqu'à 25 °C.
- Dissoudre 4 g d'iode dans 20 mL d'une solution contenant au préalable 5 g d'iodure de potassium dans une fiole stérile.
- Ajouter la solution iodo-iodurée au milieu.
- Bien homogénéiser l'ensemble.
- Répartir stérilement à raison de 10 mL (ou 20 mL) par tube.

✓ **Reconstitution :**
89,5 g/L

✓ **Stérilisation :**
Ne pas autoclaver

✓ **Ajouts :**
Iodo-iodure

A partir du milieu déshydraté BK169

- Respecter le mode opératoire de préparation ci-dessus.
- Avant de répartir en tubes, ajouter la novobiocine comme suit :
- 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 40 mg de Novobiocine en solution stérile.
- Bien homogénéiser l'ensemble.
- Répartir stérilement à raison de 10 mL (ou 20 mL) par tube.

6 MODE D'EMPLOI

- Transférer 1 mL de bouillon d'enrichissement dans les tubes de bouillon complet ainsi préparés ou prêts-à-l'emploi (BM078).
- Incuber pendant 24 ± 3 heures :
 - à 36 ± 2 °C pour la détection des salmonelles dans les eaux,
 - entre 34 et 38 °C pour la détection des salmonelles en microbiologie des aliments,
 - à $41,5 \pm 1$ °C pour la détection des salmonelles en santé animale.

✓ **Ensemencement :**
1 mL dans 10 mL

✓ **Incubation :**
24 h à 36, entre 34 et 38
ou 41,5 °C

7 LECTURE

Effectuer un repiquage sur gélose XLD et sur un second milieu au choix (tel COMPASS Salmonella Agar), au moyen d'une anse bouclée.

En présence de colonies caractéristiques, procéder aux confirmations nécessaires.

8 CONTROLE QUALITE

Milieux déshydratés : poudre blanchâtre, fluide et homogène.

Milieu préparé complet : suspension bleuâtre, opaque, présentant au repos un précipité important.

Réponse culturale de croissance après enrichissement pendant 24 heures à 37 °C, puis subcultures (NF EN ISO 11133 ; FD T90-461) :

Microorganismes		Croissance
<i>Salmonella</i> Enteritidis	WDCM 00030	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	
+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WDCM 00031	> 10 colonies caractéristiques
+ <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	
+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	≤100 colonies
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	≤10 colonies

9 CONSERVATION

Milieux déshydratés : 2-30 °C.

Milieu complet prêt-à-l'emploi en tubes : 2-8 °C.

Suppléments lyophilisés Novobiocine : 2-8 °C

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Suppléments Novobiocine réhydratés (*) : 30 jours à 2-8 °C.

Milieu de base préparé en tubes ou en flacons (*) : 30 jours à 2-8 °C.

Milieu complet préparé en tubes ou en flacons (*) : 8 jours à 2-8 °C

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

10 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté (sans iode, ni novobiocine) :

Flacon de 500 g BK169HA

Milieu de base déshydraté (sans iode) :

Flacon de 500 g BK208HA

Supplément sélectif Novobiocine :

Coffret de 10 flacons de 10 mg BS03308

Coffret de 8 flacons de 40 mg BS05608

Milieu complet prêt-à-l'emploi :

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Müller, L.. 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comptes Rendus de la Société de Biologie, **89** : 434-437.

Kauffmann, F.. 1935. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für *Salmonella* bazillen. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheit, **117**: 26-32.

Jeffries, L.. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae in feces. Journal of Clinical Pathology, **12** : 568-571.

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 19250. Juin 2013. Qualité de l'eau. Recherche de *Salmonella* spp.

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)).

FD T90-461. Août 2016. Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture.

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 : MKTTN_FR_V16

Date création : 06-2002

Date de révision : 06-2020

Motif de révision : Mise en conformité avec la NF EN ISO 6579-1/A1