



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES
Vibrio cholerae O1 ET NON O1 DANS LES ALIMENTS**

S. Stavric et B. Buchanan
Division de la recherche, Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Santé Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0L2

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la recherche des *Vibrio cholerae* O1 et non O1 aux fins de vérification de la conformité des aliments aux articles 4 et 7 de la Loi des aliments et drogues.

2. DESCRIPTION

Cette méthode a donné des résultats satisfaisants avec le poisson, les coquillages, les légumes et le lait de coco. La classification des *V. cholerae* est fondée sur la réaction d'agglutination avec des antisérums produits contre les antigènes somatiques «O». Les espèces qui agglutinent avec l'antisérum O1 appartiennent au séro-groupe O1 et celles qui ne sont pas agglutinables appartiennent au séro-groupe non O1 (9.3). On trouve des souches produisant la toxine cholérique dans ces deux séro-groupes. Le séro-groupe O1 comprend le biotype classique et le biotype El Tor, définis d'après des caractères physiologiques et d'après leur sensibilité à certains bactériophages; le séro-groupe O1 comprend également trois sérotypes, soit Inaba, Ogawa et Hikojima, définis d'après la réaction d'agglutination avec des antisérums spécifiques (9.5, 9.7). Les souches isolées en Inde et au Bangladesh lors de l'épidémie de 1992-1993 forment le nouveau séro-groupe O139, aussi appelé «Bengal» (9.8). On les identifie avec une batterie de tests biochimiques utilisée pour les séro-groupes O1 et non O1, puis l'identification est confirmée par la réaction sérologique avec l'antisérum O139 (9.6).

3. PRINCIPE

Le dépistage de cet organisme comprend trois étapes : i) enrichissement en milieu non sélectif, ii) culture sur milieu sélectif et identification présomptive et iii) confirmation par des tests biochimiques et sérologiques. La méthode présentée ici est basée sur celle qu'Elliot *et al.* ont récemment publiée dans le Bacteriological

Analytical Manual de la United States Food and Drug Administration (9.2). Il est recommandé de rechercher la production de toxine cholérique chez tous les isolats des sérogroupes O1 et O139.

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir Annexe A, Volume 3.

5. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

5.1 Voir Annexe B, Volume 3.

5.2 Les échantillons qui ne sont pas analysés dès leur arrivée au laboratoire doivent être placés au réfrigérateur (0-4 °C) ou au congélateur, selon leur nature.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

- 1) Eau peptonée alcaline
- 2) Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-sucrose (TCBS)
- 3) Gélose à la tryptone salée (T₁N₁)
- 4) Gélose trypticase-soja (TSA)
- 5) Gélose aux trois sucres et au fer (TSI)
- 6) Gélose de Kligler au fer (KIA)
- 7) Géloses inclinées à l'arginine et au glucose (AGS)
- 8) Gélose-gélatine (GA)
- 9) Gélose-gélatine salée (GSA)
- 10) Bouillon de Hugh-Leifson glucosé
- 11) Réactif pour la recherche de l'oxydase
- 12) Réactif pour la recherche de l'ONPG
- 13) Antisérums pour la détection du sérotype O139 du séro groupe non O1. (W. Johnson, Laboratoire national pour les pathogènes, LLCM, Santé Canada, Ottawa, Téléphone : (613) 957-1386)
- 14) Antisérums de diagnostic du groupe O1 et des sous-groupes Inaba, Ogawa et Hikojima. (Wellmark Diagnostics Ltd., Guelph (Ont.))
- 15) Gélose à l'infusion coeur-cervelle (BHIA)
- 16) Gélose à l'infusion de coeur (HIA)
- 17) Gélose de Mueller-Hinton
- 18) Bouillon d'infusion de coeur (HIB)
- 19) Solution de polymyxine B

- 20) Érythrocytes de mouton - 5 %
- 21) Gélose au sang
- 22) Bouillon au rouge de méthyle-Voges Proskauer (MR-VP) et réactifs
- 23) Érythrocytes de poulet - 2,5 %
- 24) Milieu de base de Falkow additionné ou non d'acides aminés individuels (p. ex. lysine et arginine) pour la recherche de la décarboxylase
- 25) Bouillon trypticase-soja (TSB)
- 26) Bouillon à la tryptone (1 %) salé ou non (0, 3, 6, 8 et 10 % de NaCl)
- 27) Bouillons au bromocrésol pourpre additionnés de sucrose ou d'arabinose
- 28) O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylptéridine) - disques de 10 et 150 µg
- 29) Mélangeur Waring ou l'équivalent
- 30) Étuves pour incubation à $35 \pm 0,5$ °C et $42 \pm 0,5$ °C

7. MÉTHODE

On peut analyser chaque unité d'échantillonnage séparément ou les grouper. Les différentes étapes de l'analyse sont présentées à la figure 1 (Programme d'analyse). Faire l'analyse suivant les instructions présentées ci-après :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, conserver les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-4 °C) ou au congélateur, selon leur nature, jusqu'à l'analyse.
- 7.1.2 Analyser les échantillons dès que possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparatifs pour l'analyse

- 7.2.1 Préparer une réserve d'eau peptonée alcaline stérile.

7.3 Analyse

- 7.3.1 Préparation des échantillons :
 - Poisson : peser des portions comprenant les branchies, les viscères et des tissus superficiels (s'il y en a).
 - Coquillages : préparer et peser le contenu du coquillage au complet (chair et liquide) et grouper plusieurs spécimens.
 - Crustacés : préparer et peser l'animal au complet si possible ou la partie centrale avec les branchies et les viscères (lorsqu'ils sont présents).
 - Légumes : analyser l'eau de rinçage ou des homogénats de légumes.
 - Autres aliments (suivre les indications de l'Annexe B, Volume 3).
- 7.3.2 Avant d'homogénéiser l'échantillon, couper les gros morceaux. En conditions d'asepsie, faire une dilution au 1/10 en ajoutant 25 g de l'échantillon à 225 mL d'eau peptonée alcaline dans le bocal pré-pesé et stérilisé d'un mélangeur. Agiter 2 min à grande vitesse.

- 7.3.3 Pour les huîtres seulement : recueillir le contenu, c'est-à-dire la chair et le liquide, de 10-12 huîtres dans le bocal stérilisé d'un mélangeur : le tout devrait donner un volume de 100 mL environ. Homogénéiser 30 s à grande vitesse. Verser 50 g de l'homogénat dans un autre bocal de mélangeur stérilisé, ajouter 450 mL d'eau peptonée alcaline et homogénéiser 2 min. Répartir cet homogénat en portions égales dans deux flacons stériles (flacons A et B).
- 7.3.4 Les échantillons de coquillages et de légumes renferment parfois de fortes concentrations d'entérobactéries qui peuvent proliférer dans la solution peptonée alcaline. Le cas échéant, ou encore si l'on s'attend à trouver de fortes populations de *V. cholerae*, il peut être nécessaire de diluer les homogénats jusqu'à obtention de la concentration appropriée, ou d'analyser simultanément des solutions de divers degrés de dilution. Préparer des dilutions au 1/10. Diluer les échantillons de légumes au 1/100 et les échantillons de coquillages au 1/1 000. Pour les huîtres seulement : préparer les dilutions en double.

7.4 **Enrichissement**

La méthode d'enrichissement varie selon la nature de l'échantillon.

- 7.4.1 Pour les huîtres seulement : incuber 6-8 h, puis 24 h, les deux flacons d'homogénat additionné d'eau peptonée alcaline, l'un (flacon A) à 35 °C et l'autre (flacon B) à 42 °C.
- 7.4.2 Pour tous les autres types d'aliments : incuber à 35 °C pendant 6-8 h, puis pendant 24 h, un flacon d'homogénat additionné d'eau peptonée alcaline.
- 7.4.3 Aliments congelés (huîtres seulement) : incuber 6-8 h, puis 24 h les deux flacons, l'un à 35 °C et l'autre à 42 °C.
- 7.4.4 Autres aliments congelés ou transformés : incuber un flacon à 35 °C pendant 6-8 h, puis pendant 24 h.

Après les deux périodes d'incubation (6-8 h et 24 h), ensemer sur gélose TCBS toutes les cultures d'enrichissement à l'eau peptonée alcaline.

7.5 **Isolement**

- 7.5.1 Après l'incubation, ÉVITER DE SECOUER les flacons d'homogénat à l'eau peptonée alcaline, car c'est à la surface du liquide qu'on prélève l'inoculum pour l'ensemencement de la gélose TCBS. Incliner délicatement les flacons, et, avec une anse, prélever l'inoculum (3-5 mm) à la surface du liquide et ensemer en stries au moins une gélose par homogénat après chaque période d'incubation. Ensemer aussi des géloses avec une souche connue de *V. cholerae* comme témoin positif.
- 7.5.2 Examiner toutes les géloses et rechercher les colonies caractéristiques. Sur gélose TCBS, *V. cholerae* forme des colonies jaunes (à cause de la fermentation du sucrose) lisses de 2-3 mm de diamètre. En général, le centre des colonies est opaque et le pourtour est légèrement transparent.
- 7.5.3 Pour la suite de l'analyse, n'utiliser que les colonies suspectes bien isolées sur gélose TCBS. S'il y a eu prolifération, choisir au moins trois colonies caractéristiques sur chaque gélose et ensemer en stries des géloses T₁N₁ ou TSA; incuber 18-24 h à 35 °C.

7.6 **Identification - Différenciation des *Vibrio* spp. des non vibrions**

- 7.6.1 Analyse biochimique - choisir des colonies bien isolées (TCBS, T₁N₁ ou TSA) dans les cultures témoins positives et dans les cultures d'échantillon; inoculer les milieux suivants et incuber 18-24 h à 35 °C :
- 7.6.2 Géloses TSI, KIA et AGS inclinées - ensemercer ces trois milieux par piqûre et en stries. Incuber les géloses inclinées sans visser le bouchon des tubes. Noter l'aspect des tranches et des culots des cultures avant d'ajouter les réactifs. Sur KIA et AGS, *V. cholerae* produit une tranche violette (alcaline) et un culot jaune (acide). Les géloses inclinées TSI sont habituellement acides, mais il peut arriver qu'elles soient alcalines, avec un culot acide. *V. cholerae* ne produit ni gaz, ni sulfure d'hydrogène dans ces trois milieux.
- 7.6.3 Besoins en sel et production de gélatinase - Diviser les géloses GA et GSA en huit secteurs. Ensemencer une ligne médiane dans chaque secteur, en utilisant les deux types de milieu de culture pour chaque isolat. Examiner les géloses GA et GSA sur un fond sombre. Comme *Vibrio* pousse dans un milieu contenant de 0 % jusqu'à environ 3 % de sel, les cultures sur GA et sur GSA devraient toutes deux présenter des lignes de croissance bien visibles. La présence d'un halo opaque autour de la zone de croissance signifie que l'isolat est gélatinase positif. *V. cholerae* est gélatinase positif.
- 7.6.4 Oxydation/fermentation du glucose - Ensemencer par piqûre deux tubes de bouillon Hugh-Leifson glucosé par isolat. Couvrir le milieu de l'un des tubes d'une couche d'huile minérale stérile. Les cultures sont considérées positives lorsque le milieu devient jaune, à cause de la production d'acide résultant de l'utilisation du glucide. Dans le tube contenant la couche d'huile, le glucose est utilisé par fermentation; dans l'autre tube, il est utilisé par oxydation. *V. cholerae* métabolise le glucose de ces deux façons.
- 7.6.5 Oxydase - Pour mettre l'activité oxydase en évidence, utiliser une culture de 18-24 h provenant d'un milieu sans glucides fermentescibles (p. ex. TSA, GSA ou GA). NE PAS UTILISER LE MILIEU TCBS, car des fausses réactions oxydase négatives ont été obtenues avec des colonies provenant directement de cultures sur TCBS (9.9). Ne pas utiliser d'anse en nickel et chrome. Prélever un inoculum en grattant la culture avec un bâtonnet applicateur en bois stérile et étaler sur une bande réactive de fabrication commerciale. La réaction est considérée positive lorsqu'une zone bleue apparaît en 10 secondes autour de l'inoculum. Comparer avec des cultures témoins positives et négatives avérées. Suivant une autre méthode, on peut ajouter deux ou trois gouttes de réactif de recherche de l'oxydase directement dans une culture de 18-24 h : on surveille alors l'apparition du bleu dans les 2 minutes qui suivent.
- 7.6.6 Coloration de Gram - Utiliser une culture de 18-24 h (de préférence sur gélose). *V. cholerae* est un bâtonnet droit ou incurvé Gram négatif, asporulé.
- 7.6.7 ONPG - Pour la recherche de l'ONPG, travailler sous la hotte. Avec une anse de grande taille, prélever un inoculum de culture sur un milieu au lactose (p. ex. TSI) et mettre en émulsion dans 0,25 mL de solution physiologique salée. Ajouter une goutte de toluène à chaque suspension. Bien mélanger et laisser reposer 5 min à 37 °C, puis ajouter 0,25 mL de réactif. Incuber 24 h au bain-marie à 37 °C. Examiner la coloration à intervalles de 30 min, 1 h et 24 h. La solution est considérée positive lorsqu'elle devient jaune. *V. cholerae* est ONPG positive. Suivant une autre méthode, on peut employer des disques de fabrication commerciale : utiliser une culture de 18 h sur milieu au lactose; mettre un inoculum en émulsion dans 0,2 mL de solution physiologique salée stérile dans un tube stérile, ajouter un disque et remuer délicatement. Incuber et lire les résultats comme pour la suspension.

Pour la suite de l'analyse, ne retenir aucun des isolats ne présentant pas les réactions caractéristiques décrites ci-dessus.

7.7 Identification - Différenciation des sérogroupes O1 et non O1

- 7.7.1 Tester les isolats présumés positifs avec des antisérums de diagnostic du groupe O1 de fabrication commerciale. Déposer deux gouttes de solution physiologique salée à bonne distance l'une de l'autre, sur une lame de microscope propre. Avec une anse, prélever de la culture fraîche et mélanger à chacune des gouttes de façon à produire des suspensions riches. Veiller à ce que les gouttes n'entrent pas en contact l'une avec l'autre et à ce qu'il ne reste pas d'agrégats de cellules visibles. Ajouter à l'une des suspensions un volume égal d'antisérum anti-O1. Bien mélanger en inclinant légèrement la lame. Les isolats qui agglutinent avec l'antisérum, mais non avec la solution physiologique salée, appartiennent au groupe O1. Au besoin, identifier le sous-groupe auquel appartient l'isolat au moyen d'antisérums plus spécifiques (Inaba et Ogawa), suivant la même méthode.
- 7.7.2 Les isolats qui n'agglutinent pas avec l'antisérum anti-O1 sont classés dans le groupe des souches non O1. Faire parvenir les isolats ainsi classés au laboratoire de référence où ils seront testés avec des sérums anti-O139. (S'adresser à W. Johnson, Laboratoire national pour les pathogènes, LLCM, Santé Canada, Ottawa, Téléphone : (613) 957-1356).
- 7.7.3 Si l'isolat agglutine avec la solution salée et avec le sérum anti-O1, reprendre le sérotypage après avoir cultivé l'isolat dans un milieu riche comme du BHIA ou du HIA. Si ce second test donne le même résultat (agglutination dans les deux suspensions), l'isolat ne peut être classé.

7.8 Biotypage - facultatif

Pour distinguer le biotype El Tor du biotype classique, faire au moins deux des tests énumérés ci-après en utilisant des témoins positifs et négatifs. La sensibilité à la polymyxine B, la recherche de l'hémolysine et la réaction de Voges-Proskauer sont les plus simples; on peut aussi étudier la sensibilité aux phages ou l'héماغglutination. Les résultats correspondant à chacun des biotypes de *V. cholerae* sont présentés au tableau 1.

- 7.8.1 Sensibilité à la polymyxine B - Ce test s'inspire de la méthode de Han et Khie (9.4). Prélever un inoculum dans une culture en milieu HIB (4 h à 35 °C) et étaler à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton de façon à obtenir une croissance confluyente. Laisser l'inoculum pénétrer dans la gélose. Placer un disque de polymyxine B de 50 unités sur la gélose et incubé 18-24 h à 35 °C. Rechercher les zones d'inhibition de la croissance. Avec le biotype classique, la zone d'inhibition est de 12-15 mm; avec le biotype El Tor, elle est plus étroite et ne mesure que 1-2 mm.

N. B. : s'il est impossible de se procurer des disques de polymyxine B de 50 unités, préparer une solution de polymyxine B, stériliser par filtration et imbiber des disques vierges stériles avec un volume suffisant de solution, puis laisser sécher. Toutes ces opérations doivent être exécutées en conditions de stérilité.

- 7.8.2 Recherche de l'hémolysine - Pour chaque isolat, prélever un inoculum dans une culture de 24 h en milieu HIB. Diviser chaque culture en deux portions; chauffer l'une des portions 30 min à 56 °C. Avec chaque portion, préparer un mélange composé de 0,5-1,0 mL de culture et d'un volume égal de suspension salée d'érythrocytes de mouton à 5 %. Préparer le même mélange en utilisant des souches de *V. cholerae* hémolytiques et non hémolytiques comme témoins. Incuber tous les tubes au bain-marie à 35 °C pendant 2 h, puis réfrigérer (4 °C) 18-24 h. Rechercher les signes d'hémolyse, c'est-à-dire la coloration du liquide, qui devient rouge rosâtre, et la présence de débris cellulaires au fond du tube. Une centrifugation à basse

vitesse peut faciliter la détection. La plupart des souches El Tor lysent les érythrocytes. Le biotype classique ne lyse pas les érythrocytes car il ne produit pas d'hémolysine. S'il y a des signes d'hémolyse dans les échantillons chauffés et non chauffés, l'hémolysine produite est thermostable. Si l'hémolyse n'est apparente que dans les échantillons non chauffés, l'hémolysine est thermolabile. Le biotype El Tor produit de l'hémolysine thermolabile. On peut aussi ensemercer par touches les isolats et les témoins sur des géloses au sang contenant 5 % d'érythrocytes de mouton; incuber toute la nuit à 35 °C, puis vérifier si les colonies sont entourées d'une zone de *bêta*-hémolyse.

- 7.8.3 Réaction de Voges-Proskauer - Ensemencer du bouillon MR-VP avec les isolats et les souches témoins et incuber les tubes 18-24 h à 22 °C. Après 24 h, prélever 1 mL de culture et ajouter 0,6 mL d' α -naphтол et 0,2 mL de KOH (réactif de VP). Secouer le tube après chaque ajout. Pour intensifier et accélérer la réaction, ajouter quelques cristaux de créatine au mélange. Laisser reposer à la température de la pièce. Lire les résultats 4 h après l'adjonction des réactifs. Une coloration rose indique une réaction positive. Habituellement, le biotype El Tor est positif et les souches classiques sont négatives. On peut aussi utiliser du réactif de VP de fabrication commerciale.
- 7.8.4 Sensibilité aux phages - Ce test est basé sur la méthode de Finkelstein et Mukerjee (9.3). Prélever un inoculum dans une culture en milieu HIB (4 h à 35 °C) et étaler à la surface d'une gélose de Mueller-Hinton de façon à obtenir une croissance conflente. Laisser l'inoculum pénétrer dans la gélose, puis, avec une anse de 3 mm, étaler le phage (IV ou V) à la surface de la gélose. Incuber toute la nuit à 35 °C, puis rechercher les zones d'inhibition de la croissance. Le biotype classique, sensible au phage IV, est lysé. L'inhibition de la croissance (zone où la gélose est limpide) devrait s'observer autour du phage. Si la croissance est conflente, c'est que la souche isolée appartient au biotype El Tor, lequel est résistant au phage IV. Avec le phage V, les réactions sont inversées (tableau 1).
- 7.8.5 Agglutination avec les érythrocytes de poulet - À partir d'une culture de 18-24 h en milieu TSA, préparer une riche suspension dans de la solution physiologique salée. Avec une anse, déposer une portion de cette suspension sur une lame de microscope propre et mélanger avec un volume égal d'érythrocytes de poulet rincés (2,5 % en solution salée). Rechercher les signes d'agglutination. Les souches El Tor donnent une réaction d'agglutination; le biotype classique est négatif.

7.9 **Identification - Confirmation**

Soumettre les isolats suspects et des souches témoins aux tests biochimiques suivants, pour recueillir le minimum d'information nécessaire à l'identification de *V. cholerae* (Sect. 7.10) :

- 7.9.1 Recherche de la décarboxylase - Inoculer trois tubes de bouillon de Falkow contenant de la lysine, de l'arginine ou aucun acide aminé (milieu de base). Bien visser les bouchons ou couvrir le milieu d'une couche d'huile minérale ou d'huile de paraffine pour empêcher la pénétration d'oxygène; incuber à 4 jours à 35 °C, en vérifiant les cultures chaque jour. D'abord violet, le milieu de culture devient jaune en 3-4 h à cause de la croissance des organismes et de la formation d'acide qui s'ensuit. La réaction est positive si le milieu redevient violet, une coloration qui s'explique par la production d'amines dans les bouillons contenant des acides aminés. La culture témoin, qui ne contient pas d'acide aminé, devrait rester jaune. *V. cholerae* est arginine-dihydrolase-négatif et lysine-décarboxylase-positif.
- 7.9.2 Température de croissance - Inoculer des tubes de TSB et incuber toute la nuit à 42 °C. Comme cet organisme pathogène peut pousser à température élevée (42 °C), on considère la réaction positive lorsque le milieu de culture est trouble.

- 7.9.3 Besoins en sel - Inoculer des tubes de bouillon à la tryptone (1 %) contenant 0, 3, 6, 8 et 10 % de NaCl. Incuber 18-24 h à 35 °C; déterminer si le milieu de culture est trouble. *V. cholerae* pousse dans un milieu contenant 0-3 % de NaCl et certaines souches peuvent même tolérer jusqu'à 6 % de NaCl.
- 7.9.4 Utilisation des glucides - Inoculer des tubes de bouillon au bromocrésol pourpre contenant du sucrose et de l'arabinose; couvrir d'une quantité suffisante d'huile minérale pour former une couche de 1-2 mm d'épaisseur. Incuber jusqu'à 7 jours à 35 °C. La réaction positive se dénote à la coloration jaune (production d'acide) du milieu. Cet organisme pathogène fermente le sucrose, mais non l'arabinose.
- 7.9.5 Sensibilité au composé vibriostatique O/129 - Ensemencer en stries une gélose TSA, puis déposer dans les zones les plus denses des disques contenant 10 et 150 µg du composé vibriostatique O/129. Incuber 18-24 h à 35 °C, puis rechercher les zones d'inhibition de la croissance. Les souches de *V. cholerae* sont sensibles au composé O/129 à ces deux concentrations.

7.10 **Caractéristiques minimum à connaître pour identifier les *V. cholerae* (O1 et non O1)**

1. Morphologie - bâtonnet droit ou incurvé Gram négatif, asporogène.
2. Aspect sur TSI - pente acide /culot acide (pente alcaline : rare), pas de production de gaz, ni de H₂S.
3. Oxydase - réaction positive.
4. Milieu de Hugh-Leifson - réaction positive d'oxydation et de fermentation du glucose.
5. Arginine-dihydrolase - réaction négative
6. Lysine-décarboxylase - réaction positive.
7. Réaction de Voges-Proskauer - biotype El Tor : réaction positive; biotype classique : réaction négative.
8. Croissance à 42 °C - positive.
9. Tolérance au sel - réaction positive à 0 et à 3 % de NaCl; habituellement négative à 6 %. Certaines souches du groupe non O1 ne poussent pas à 0 % de NaCl.
10. Fermentation du sucrose - réaction positive.
11. ONPG - réaction positive.
12. Fermentation de l'arabinose - réaction négative.

Au tableau 2, on peut comparer des réactions biochimiques caractéristiques de *V. cholerae* à celles de deux autres *Vibrio* spp. pathogènes.

8. PRODUCTION DE TOXINES

V. cholerae produit une entérotoxine, la toxine cholérique, ainsi qu'une cytotoxine : les deux se détectent en culture tissulaire. Diverses lignées cellulaires s'utilisent à cette fin, par exemple les lignées Y-1 (cellules surrénales de souris), CHO (cellules ovariennes de hamster chinois) ou Véro (cellules rénales de singe africain). Parmi les tests de détection immunologique de la toxine cholérique, signalons l'immunosorption enzymatique (ELISA) et l'agglutination inverse passive du latex (RPLA). Dans les méthodes les plus récentes, on utilise des sondes d'ADN ou des amorces de PCR spécifiques au gène de la toxine cholérique. La plupart de ces méthodes sont décrites en détails dans le BAM (9.2) et dans d'autres documents (9.8). L'essai de RPLA est le plus simple et n'exige pas d'installations spéciales.

9. BIBLIOGRAPHIE

- 9.1 Baumann, P. and Schubert, R.H.W. 1984. Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. *Vibrionaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I. (ed.) N.R. Krieg and J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore MD. pp. 516-545.

- 9.2 Elliot, E.L., Kaysner, C.A. and Tamplin, M.L. 1992. Chapter 9. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In: Bacteriological Analytical Manual, 7th edition. AOAC International, Arlington VA. pp 111-141.
- 9.3 Finkelstein, R.A. and Mukerjee, S. 1963. Hemagglutination: a rapid method for differentiating *Vibrio cholerae* and El Tor vibrios. Proc. Soc. Experim. Biol. and Med. 112:355-359.
- 9.4 Han, G.K. and Khie, T.D. 1963. A new method for the differentiation of *Vibrio comma* and *Vibrio El Tor*. Am. J. Hyg. 77:184-186.
- 9.5 Madden, J.M., McCardell, B.A. and Morris Jr., J.G. 1989. *Vibrio cholerae*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. (ed.) M.P. Doyle. Marcel Dekker Inc., New York NY. pp. 525-542.
- 9.6 Nair, G.B. and Takeda, Y. 1993. *Vibrio cholerae* in disguise - a disturbing entity. World J. Microbiol. and Biotechnol. 9:399-400.
- 9.7 Sakazaki, R. and Shimada, T.. 1986. Chapter 5. *Vibrio* species as causative agents of food-borne infection. In: Developments in Food Microbiology - 2. (ed.) R.K. Robinson. pp. 123-151.
- 9.8 Shimada, T., Nair, G.B., Deb, B.C., Albert, M.J., Seck, R.B. and Takeda, Y. 1993. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet 341:1347.
- 9.9 Vila, J., Abdalla, S., Gonzalez, J., Garcia, C., Bombi, J.A. and Jimenez de Anta, M.T. 1992. A one-minute oxidase test to detect *Vibrio* strains isolated from cultures on thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) medium. J. Appl. Bacteriol. 72:490-492.

10. PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

10.1 Eau peptonée alcaline

Peptone	10 g
NaCl	10 g
Eau distillée	1 L

Dissoudre les ingrédients, puis ajuster le pH à $8,5 \pm 0,2$. Répartir par portions de 225 ou 450 mL dans des flacons. Autoclaver 10 min à 121 °C.

10.2 Gélose inclinée à l'arginine et au glucose (AGS)

Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Tryptone	10 g
NaCl	20 g
Glucose	1 g
L-arginine (hydrochlorure)	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Bromocrésol pourpre	0,02 g
Gélose	13,5 g
Eau distillée	1 L

Mettre les ingrédients en suspension dans l'eau distillée et faire bouillir le tout pour dissoudre la gélose. Ajuster le pH (6,8 à 7,0). Répartir par portions de 8 mL dans des tubes à bouchons à vis. Autoclaver 10 min à 121 °C. Placer les tubes à refroidir en les inclinant de façon à ce qu'il se forme un culot d'environ 3 cm.

10.3 Gélose au sang

Préparer les géloses au sang dès que possible après l'arrivée du sang frais; utiliser une base de gélose au sang (Oxoid n° 2) ou une gélose trypticase-soja avec 5 % de sang de mouton défibriné. Réhydrater et stériliser suivant les instructions du fabricant. Amener la température de la gélose et du sang à 45-50 °C, puis mélanger et couler en boîtes de Petri. Le pH final doit être de $6,8 \pm 0,2$. On peut aussi utiliser des géloses de fabrication commerciale. Conserver à 4 °C; dans ces conditions, les géloses au sang se conservent 1 mois.

10.4 Gélose à l'infusion coeur-cerveille (BHIA) (vendue sur le marché)

Infusion de 200 g de cervelle de veau et de 250 g de coeur de boeuf dans l'eau distillée	1 L
Protéose peptone ou gélystate	10 g
NaCl	25 g
Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	2,5 g
D-glucose	2 g
Gélose	15 g

Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée. Le pH final doit être de $7,4 \pm 0,2$. Autoclaver 15 min à 121 °C. Refroidir à 50 °C. Couler en boîtes de Petri.

10.5 Bouillon au bromocrésol pourpre

Milieu de base

Peptone	10 g
Extrait de viande de boeuf	3 g
NaCl	5 g
Bromocrésol pourpre	0,04 g
Eau distillée	1 L

Dissoudre les ingrédients et ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$. Répartir le milieu de base dans des tubes par portions de 9 mL. Autoclaver 10 min à 121 °C. Après avoir fait refroidir, ajouter stérilement 1 mL de solution sucrée à 10 % stérilisée par filtration.

10.6 Érythrocytes de poulet - 2,5 %

Mélanger 2,5 mL d'érythrocytes de poulet à 97,5 mL de solution physiologique salée.

10.7 Milieu de base de Falkow pour la recherche de la décarboxylase

Milieu de base

Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Glucose	1 g
NaCl	15 g

Bromocrésol pourpre	0,02 g
Eau distillée	1 L

Chauffer le mélange pour dissoudre les ingrédients. Ajouter 10 g de L-lysine ou de L-arginine au milieu de base. Ajuster le pH (6,5 à 6,8). Répartir par portions de 5 mL dans des tubes à bouchon à vis; sans visser les bouchons, autoclaver 15 min à 121 °C. Visser les bouchons lorsque les tubes ont refroidi.

10.8 Gélose-gélatine (GA)

Peptone	4 g
Extrait de levure	1 g
Gélatine	15 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1 L

Mettre les ingrédients en suspension en remuant constamment et faire bouillir pour dissoudre la gélatine et la gélose. Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,2$. Autoclaver 15 min à 121 °C. Refroidir à 50 °C et couler en boîtes de Petri.

10.9 Gélose-gélatine salée (GSA)

Gélose-gélatine (10.8) additionnée de 30 g de NaCl.

10.10 Bouillon d'infusion de coeur (HIB) (vendu sur le marché)

Infusion de 500 g de coeur de boeuf dans l'eau distillée	1 L
Tryptose	10 g
NaCl	5 g

Dissoudre les ingrédients et ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$. Répartir par portions de 10 mL. Autoclaver 15 min à 121 °C.

10.11 Gélose à l'infusion de coeur (HIA) (vendue sur le marché)

Bouillon d'infusion de coeur (10.10) additionné de 15 g de gélose.

10.12 Bouillon de Hugh-Leifson glucosé

Peptone	2 g
Extrait de levure	0,5 g
NaCl	20 g
Glucose	10 g
Bromocrésol pourpre	0,015 g
Gélose	3 g
Eau distillée	1 L

Mettre les ingrédients en suspension et faire bouillir pour dissoudre. Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$. Répartir par portions de 5 mL dans des tubes à bouchons à vis. Autoclaver 15 min à 121 °C.

10.13 Gélose de Kligler au fer (KIA) (vendue sur le marché)

Polypeptone	20 g
Lactose	20 g
Glucose	1 g
NaCl	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Thiosulfate de sodium	0,5 g
Rouge de phénol	0,025 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1 L

Faire bouillir pour dissoudre les ingrédients. Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$. Répartir par portions de 8 mL dans des tubes à bouchon à vis. Autoclaver 15 min à 121°C . Mettre les tubes à refroidir en les inclinant de telle façon qu'il se forme une pente et un culot de 3 cm.

10.14 Bouillon au rouge de méthyle-Voges Proskauer (MR-VP)

Peptone	7 g
Glucose	5 g
K_2HPO_4	5 g
Eau distillée	1 L

Dissoudre les ingrédients dans 800 mL d'eau en chauffant doucement. Filtrer, refroidir à 20°C et allonger à 1 L. Ajuster le pH à $6,9 \pm 0,2$. Répartir dans des tubes par portions de 5 mL. Autoclaver 15 min à 121°C .

Réactif de VP

Solution d' α -naphтол - Dissoudre 5 g d' α -naphтол dans 100 mL d'éthanol absolu. Préparer cette solution le jour de l'analyse.

Solution de KOH - Dissoudre 40 g de KOH dans 100 mL d'eau distillée.

10.15 Gélose de Mueller-Hinton (vendue sur le marché)

Infusion de 300 g de boeuf dans l'eau distillée	1 L
Acides casamino	17,5 g
Amidon	1,5 g
Gélose	17 g

Mettre les ingrédients en suspension et ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$. Faire bouillir 1 min pour dissoudre. Autoclaver 15 min à 116°C . Refroidir à 50°C . Couler en boîtes de Petri.

10.16 Réactif pour la recherche de l'ONPG

Solution 1 (phosphate monosodique 1 M, pH 7)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,9 g
Solution de NaOH (30 %)	3 mL
Eau distillée	45 mL

Dissoudre le $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillée. Ajouter la solution de NaOH pour amener le pH à 7,0. Allonger à 50 mL avec de l'eau distillée. Conserver à 4°C .

Solution 2 [o-nitrophényl-β-D-galactoside (ONPG) 0,0133 M]

ONPG	80 mg
Solution de phosphate monosodique 1,0 M, pH 7 (Solution 1)	5 mL
Eau distillée	15 mL

Dissoudre l'ONPG dans l'eau distillée chauffée à 37 °C et ajouter 5 mL de la solution 1. La solution finale doit être incolore. Conserver à 4 °C. Avant d'utiliser, réchauffer à 37 °C le volume de solution d'ONPG nécessaire pour le nombre de tests à réaliser. On peut aussi utiliser des disques d'ONPG vendus sur le marché.

10.17 Réactif pour la recherche de l'oxydase

N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine.2HCl	0,1 g
Eau distillée	10 mL

Utiliser ce réactif le jour même où il a été préparé.

10.18 Solution de polymyxine B

Sulfate de polymyxine B
Eau distillée stérilisée
Disques de papier filtre vierges de 5 mm ou ¼ de pouce, stérilisés
Micropipetteur (10 µL)

Stériliser les disques de papier filtre dans des boîtes de Petri en verre. Dissoudre la polymyxine B dans de l'eau stérile jusqu'à obtention d'une concentration finale de 5 000 unités/mL. Déposer 10 µL de la solution à 5 000 unités/mL sur chacun des disques. Laisser sécher. Conserver après séchage à l'abri de la lumière au réfrigérateur.

Exemple : On trouve sur le marché des polymyxines B d'activités différentes, exprimées en unités USP par mg. Vérifier sur la bouteille l'activité du lot. S'il s'agit d'une polymyxine B à activité antibiotique de 8 090 unités USP par mg, en dissoudre 0,618 mg dans 1 mL d'eau stérile. Calcul :

$$\frac{5\,000\text{ unités/mL}}{8\,090\text{ unités/mg}} = 0,618\text{ mg/mL}$$

10.19 Érythrocytes de mouton - 5 %

Mélanger des érythrocytes de mouton frais (de 3 semaines au plus) défibrinés avec un volume égal de solution physiologique salée. Centrifuger à basse vitesse (4 000 g pendant 10 min à 4 °C). Éliminer le surnageant et rincer le culot au moins deux fois de plus. Continuer de rincer tant que le surnageant est rosé; cesser lorsqu'il est incolore. Remettre les érythrocytes en suspension dans une quantité suffisante de solution physiologique salée pour obtenir le même volume qu'au départ. Ajouter 5 mL d'érythrocytes rincés à 95 mL de solution physiologique salée.

10.20 Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-sucrose (TCBS) (vendue sur le marché)

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Sucrose	20 g
Thiosulfate de sodium·5H ₂ O	10 g
Citrate de sodium·2H ₂ O	10 g
Cholate de sodium	3 g
Bile de boeuf	5 g
NaCl	10 g
Citrate ferrique	1 g
Bleu de bromothymol	0,04 g
Bleu de thymol	0,04 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1 L

Verser tous les ingrédients dans un flacon. Ajuster le pH à 8,6. Faire bouillir de 1 à 2 min pour faire entièrement dissoudre les ingrédients. NE PAS AUTOCLAVER. Refroidir à 50 °C. Couler en boîtes de Petri par portions de 20 mL.

10.21 Gélose aux trois sucres et au fer (TSI) (vendue sur le marché)

Extrait de viande de boeuf	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Glucose	1 g
FeSO ₄	0,2 g
NaCl	5 g
Na ₂ S ₂ O ₃	0,3 g
Rouge de phénol	0,024 g
Gélose	12 g
Eau distillée	1 L

Faire bouillir 1 min pour que les ingrédients se dissolvent complètement. Ajuster le pH à 7,4 ± 0,2. Répartir par portions de 8 mL dans des tubes à bouchon à vis. Autoclaver 15 min à 121 °C. Laisser solidifier en position inclinée de façon à ce qu'il se forme un culot de 3 cm.

10.22 Gélose trypticase-soja (tryptique) (TSA) (vendue sur le marché)

Trypticase (tryptone)	15 g
Phytone peptone	5 g
NaCl	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1 L

Mettre les ingrédients en suspension et faire bouillir 1 à 2 min. Ajuster le pH à 7,3 ± 0,2. Autoclaver 15 min à 121 °C. Refroidir, puis couler en boîtes de Petri par portions de 20 mL.

10.23 Bouillon trypticase-soja (tryptique) (TSB) (vendu sur le marché)

Trypticase (tryptone)	17 g
Phytone peptone	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucose	2,5 g
Eau distillée	1 L

Faire dissoudre les ingrédients et ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$. Répartir dans des tubes par portions de 10 mL.
Autoclaver 15 min à 121 °C.

10.24 Bouillon à la tryptone (1 %) (T₁N₀) et bouillons à la tryptone (1 %) salés (T₁N₁; T₁N₃; T₁N₆; T₁N₈; T₁N₁₀)

Trypticase (tryptone)	10 g
NaCl	0, 10, 30, 60, 80 ou 100 g
Eau distillée	1 L

Faire dissoudre les ingrédients. Pour le bouillon T₁N₀, aucun sel n'est ajouté. Pour le bouillon T₁N₁, ajouter 10 g de NaCl; pour le T₁N₃, ajouter 30 g, pour le T₁N₆, 60 g, et ainsi de suite. Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,2$. Répartir par portions de 5 mL et autoclaver 15 min à 121 °C.

10.25 Gélose à la tryptone salée (T₁N₁)

Trypticase (tryptone)	10 g
NaCl	10 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1 L

Mettre les ingrédients en suspension et faire bouillir 1 à 2 min. Autoclaver 15 min à 121 °C. Refroidir à 50 °C avant de couler en boîtes de Petri par portions de 20 mL.

TABLEAU 1. DIFFÉRENCIATION DES BIOTYPES de *V. cholerae*^a

Test	Classique	EI Tor
Sensibilité à la Polymyxine B	+	-
Hémolyse (érythrocytes de mouton)	-	v
Réaction de Voges-Proskauer	-	+
Sensibilité au phage V (spécifique à EI Tor)	-	+
Sensibilité au phage IV (spécifique au biotype classique)	+	-
Hémagglutination (érythrocytes de poulet)	-	+

^a Source : BAM (9.2)

^b + : réaction positive

^c - : réaction négative

^d v : variable

TABLEAU 2. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DE TROIS ESPÈCES DE VIBRIO^a

	<i>Vibrio cholerae</i> ^b	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Milieu AGS	K/a ^c	K/A ^d	K/A
Milieu TSI	A (K rare)/A	A (K rare)/A	K/A
Production de H ₂ S	-	-	-
Mobilité	+	+	+
Croissance dans			
0 % de NaCl	+	-	-
3 % de NaCl	+	+	+
6 % de NaCl	-	+	+
8 % de NaCl	-	-	+
10 % de NaCl	-	-	-
Production d'acide à partir de			
glucose	+	+	+
sucrose	+	-	-
cellobiose	-	+	V ^e
lactose	-	+	-
arabinose	-	-	+
mannose	V	+	+
Production de gaz à partir de glucose	-	-	-
Décarboxylase			
lysine	+	+	+
arginine	-	-	-
ornithine	+	(+) ^f	(+)
Croissance à 42 °C	+	+	+
Hugh Leifson:			
oxydation	+	+	+
fermentation	+	+	+
Indole	+	+	+
Oxydase	+	+	+
ONPG	+	+	-
Voges-Proskauer	V	-	-
Gélatinase	+	+	+
Sensibilité au O/129			
10 µg	S ^g	S	R ^h
50 µg	S	S	S

^a tiré en partie de 9.1 et 9.2.

^b sérogroupes O1 et non O1.

^c K, pente alcaline; a, culot légèrement acide.

^d A, culot acide.

^e V, résultats variables.

^f () réaction faible.

^g S, sensible.

^h R, résistant.

Figure 1

Programme d'analyse

JOUR 1 Préparation des échantillons

Préparer un homogénat de 25 g d'aliment dans 225 mL d'eau peptonée alcaline, ou, dans le cas des huîtres, de 50 g dans 450 mL d'eau peptonée alcaline. Répartir l'homogénat d'huîtres en deux portions (flacons A et B).

Enrichissement

Incuber l'homogénat (flacon A dans le cas des huîtres) 6-8 h, puis 24 h à 35 °C.

Exceptions

- a. Incuber l'homogénat d'huîtres (flacon B) à 42 °C 6-8 h, puis 24 h.
- b. Incuber les aliments congelés* ou autrement conditionnés 6-8 h, puis 24 h à 35 °C et à 42 °C (huîtres).

Milieux sélectifs

Prélever un inoculum à la surface des cultures d'enrichissement de 6-8 h (8 h-E) non perturbées et ensemercer en stries des géloses TCBS. Incuber 18-24 h à 35 °C.

JOUR 2 Cultures présumées positives

Choisir des colonies caractéristiques dans les cultures sur TCBS et ensemercer en stries des géloses T₁N₁ ou TSA. Incuber 18-24 h à 35 °C.

Prélever un inoculum dans les cultures d'enrichissement de 24 h (24 h-E) et ensemercer en stries des géloses TCBS; incuber 18-24 h à 35 °C.

JOUR 3 Propriétés biochimiques

Prélever un inoculum dans les cultures sur T₁N₁ ou TSA et ensemercer des bouillons TSI, KIA, AGS, GA, GSA, de Hugh-Leifson glucosé et faire le test de la recherche de l'oxydase, la coloration de Gram et la recherche de l'ONPG pour obtenir le minimum de renseignements nécessaires à la différenciation des vibrios et des nonvibrios.

Prélever un inoculum de culture sur TCBS (24 h-E) et ensemercer des géloses T₁N₁ ou TSA.

JOUR 4 Confirmation

Lire les résultats des tests biochimiques. Faire les tests sérologiques pour distinguer les O1 des non O1.

Faire les tests biochimiques (24 h-E).

JOUR 5 Confirmation

Lire les résultats des tests biochimiques (24 h-E).

Biotypage : faire au moins deux des cinq tests de différenciation.

Production de toxines : faire des tests en culture tissulaire ou des épreuves immunologiques (ELISA ou agglutination du latex).