

Procédure de laboratoireMFLP-73
avril 1995DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ
OTTAWAISOLEMENT ET DÉNOMBREMENT DE
Vibrio vulnificus DANS LES POISSONS ET LES FRUITS DE MERS. Stavric et D. Buchanan
Division de la recherche, Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments,
Santé Canada, Ottawa (Ont.), K1A 0L2**1. APPLICATION**

La présente méthode est applicable à la détection de *Vibrio vulnificus* dans les aliments pour déterminer la conformité aux articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues.

2. DESCRIPTION

La méthode a donné des résultats satisfaisants avec les poissons, les coquillages et les crustacés (9.2). *Vibrio vulnificus* est un halophile obligatoire, et une concentration en sel de 0,5 à 3,0 % est nécessaire pour maintenir une bonne croissance. **ATTENTION** : *V. vulnificus* est l'un des organismes pathogènes les plus dangereux pour l'homme et il peut entraîner la mort chez les sujets atteints de maladies du foie (9.6). Une infection par cet organisme peut se produire par ingestion d'un aliment contaminé, ou par pénétration directe dans une plaie ouverte. Comme mesure de précaution, on recommande à ceux qui utilisent cette méthode de porter des gants protecteurs.

3. PRINCIPE

La détection de ce microorganisme se fait en trois phases successives : i) enrichissement dans un bouillon non sélectif, ii) ensemencement sur milieu sélectif et identification présomptive, et iii) confirmation par des tests biochimiques et sérologiques. Il s'agit d'une méthode quantitative fondée sur la technique du « nombre le plus probable » (NPP), publiée récemment dans le *Bacteriological Analytical Manual* de la *Food and Drug Administration* des États-Unis (9.2).

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. COLLECTE DES ÉCHANTILLONS

5.1 Voir l'annexe B du volume 3.

5.2 Si l'analyse n'est pas effectuée immédiatement à l'arrivée des échantillons au laboratoire, les conserver au réfrigérateur (0-4 °C) ou les congeler, selon la nature du produit. Si cette méthode est utilisée dans le cadre d'études environnementales (p. ex. coquillages, crustacés ou poissons)

fraîchement récoltés), et que l'analyse est effectuée dans un délai minimum après la collecte des échantillons, il est préférable de ne pas les réfrigérer. À basse température, *V. vulnificus* peut entrer dans un état viable, mais non cultivable (9.7).

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

La concentration finale de NaCl pour la culture de *V. vulnificus* doit être comprise entre 2 et 3 % (p/v). Il pourra être nécessaire d'ajouter du NaCl aux milieux offerts dans le commerce.

- 1) Eau physiologique tamponnée aux phosphates (PBS)
- 2) Eau peptonée alcaline
- 3) Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-sucrose (TCBS)
- 4) Gélose cellobiose -polymyxine-colistine modifiée (mCPC)
- 5) Gélose tryptone-sel (T₁N₁)
- 6) Gélose trypticase-soja supplémentée avec NaCl 1,5 % (TSA-2%)
- 7) Gélose à la gélatine (GA)
- 8) Gélose gélatine-sel (GSA)
- 9) Tampon tris-EDTA-triton X-100 (TET) ou PBS avec formaldéhyde (FPBS)
- 10) Sérum antiflagelle de *V. vulnificus* (Fourni par R. Siebeling, Department of Microbiology, Louisiana State University, Baton Rouge. LA. 70803 U.S.A., Tél. no. (504) 388-2601, Fax No. (504) 388-2597).
- 11) Réactif pour la recherche de l'oxydase
- 12) Gélose inclinée arginine-glucose (AGS)
- 13) Réactif de Kovacs
- 14) Gélose trois sucres-fer (TSI)
- 15) Réactif pour la recherche de la o-Nitrophényl-β-D-galactosidase
- 16) Bouillon glucosé de Hugh-Leifson
- 17) Bouillons au bromocrésol pourpre, additionnés d'un glucide, soit le glucose, le lactose, le sucrose, le cellobiose, la salicine, le mannose ou l'arabinose
- 18) Bouillon rouge de méthyle-Voges Proskauer (MR-VP) et réactifs correspondants
- 19) Milieu de base pour la recherche de la décarboxylase de Falkow, additionné ou non d'un acide aminé, soit la lysine, l'ornithine ou l'arginine.
- 20) Bouillon tryptone additionné ou non de NaCl à des concentrations finales de 0 %, 3 %, 6%, 8 % et 10 %.
- 21) Bouillon trypticase-soja (TSB) et gélose trypticase-soja (TSA)
- 22) Milieu pour le test de la mobilité

- 23) Anticorps monoclonal pour essai immunoenzymatique (Disponible chez Aquatic Diagnostic, Inc. 3405 SW 40th Blvd., Box 304, Gainesville, FL. 32608, U.S.A.). Pour les solutions d'essai immunoenzymatique, voir la section 10.
- 24) Bouillon infusion de coeur (HIB) supplémenté de NaCl 1 %.
- 25) Mélangeur Waring, ou l'équivalent.
- 26) Incubateurs capables de maintenir une température de $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$, de $40 \pm 0.5^\circ\text{C}$ et de $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

7. MODE OPÉRATOIRE

Chaque unité d'échantillonnage doit être analysée individuellement ou les unités d'échantillonnage peuvent être réunies. Pour une description détaillée des techniques de lavage et d'ouverture des coquillages aux fins d'analyse, voir le point 9.4. Afin d'éviter toute blessure aux mains, porter des gants en coton épais ou en mailles d'acier pour le décorticage. Voir la figure 1, plan d'analyse des échantillons, pour un diagramme de l'ensemble de la méthode d'analyse. Effectuer l'essai conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées ($0 -4^\circ\text{C}$) ou congelées, selon la nature du produit. Dégeler les échantillons congelés au réfrigérateur, ou dans des conditions de temps et de température qui empêchent la croissance ou la mort des microorganismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible après leur réception au laboratoire

7.2 Préparatifs pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir à sa disposition du PBS et de l'eau peptonée alcaline stériles.

7.3 Préparation des échantillons

- 7.3.1 Les directives suivantes s'appliquent à la préparation de l'échantillon :
Poisson — peser des portions incluant des branchies, de l'intestin et des tissus superficiels, lorsque c'est possible.
Coquillages — peser tout l'intérieur de l'animal (chair et liquide), en réunissant plusieurs animaux provenant d'une seule unité d'échantillonnage. Dix ou douze huîtres ou davantage des de petits coquillages donnent environ 100 mL.
Crustacés — peser un animal entier si possible, ou la partie centrale de l'animal y compris les branchies et l'intestin, lorsque c'est possible.
- 7.3.2 Dans le cas des coquillages, mélanger la chair et le liquide et homogénéiser dans un mélangeur stérile. Préparer 100 à 200 g ou mL d'homogénat non dilué. Ajouter 50 g de cet homogénat dans un bocal de mélangeur stérile taré et ajouter 450 mL de PBS; homogénéiser à vitesse élevée pendant 2 min.
- 7.3.3 Dans le cas d'autres types de fruits de mer, couper les gros morceaux en morceaux plus petits. Selon le type d'échantillon, préparer des dilutions 1:10 dans du PBS, soit directement (50 g d'échantillon et 450 mL de PBS), ou préparer d'abord des dilutions plus faibles dans le PBS (p. ex. 1:2 ou 1:5), puis diluer davantage de façon à obtenir une dilution finale de l'échantillon de 1:10.
- 7.3.4 Préparer des dilutions décimales en série des homogénats d'échantillon de fruit de mer dans le PBS. On recommande des dilutions de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-5} pour obtenir une plage de détection d'environ 3 à 110 000 cellules par g d'échantillon. Lorsqu'on soupçonne que l'échantillon est fortement contaminé, il pourra être nécessaire de diluer davantage.

7.4 Méthode d'enrichissement

- 7.4.1 Ensemencer une série de trois tubes pour l'obtention du NPP en ajoutant des aliquotes de 1 mL de chaque dilution d'homogénat à 10 mL d'eau peptonée alcaline, en commençant par l'homogénat de l'échantillon non dilué. Incuber les tubes pendant 12 à 16 h à 35°C . La durée d'incubation est très importante; si l'on incube trop longtemps, d'autres organismes ont tendance à prendre le dessus.

7.5 Méthode d'isolement

- 7.5.1 NE PAS AGITER OU MÉLANGER LES TUBES D'EAU PEPTONÉE ALCALINE AU VORTEX. Rechercher la présence de croissance bactérienne dans les tubes d'eau peptonée alcaline. Dans chaque tube montrant une turbidité, prélever une anse (3 mm) de zone de croissance (dans le premier cm) et ensemercer en stries des boîtes de Petri TCBS et mCPC. En parallèle, ensemercer en stries des boîtes de Petri avec une souche connue de *V. vulnificus* comme témoin positif. Incuber les boîtes de TCBS à 35 °C et les boîtes de mCPC à 40 °C pendant 18 à 24 h. À cette température les boîtes de mCPC ont tendance à sécher rapidement; il faut donc les recouvrir de plastique (sans serrer).
- 7.5.2 Rechercher la présence de colonies typiques dans les boîtes de TCBS et de mCPC en comparant avec le témoin positif. Sur TCBS, *V. vulnificus* produit des colonies vertes et rondes d'environ 3 mm de diamètre. Sur mCPC, les colonies sont jaunes et plates et mesurent environ 2 mm de diamètre; elles sont opaques au centre et translucides sur les bords.
- 7.5.3 Des colonies jaunes (fermentant le sucrose) sur TCBS ou pourpres (ne fermentant pas le cellobiose) sur mCPC pourraient indiquer la présence de *Vibrio cholerae*. Ne pas prélever ces colonies si l'on n'est pas intéressé à isoler *V. cholerae*.
- 7.5.4 Quand les boîtes de TCBS et de mCPC montrent une prolifération, prélever deux ou trois colonies suspectes et ensemercer en stries des boîtes T₁N₁ ou TSA-2 %. Incuber de 18 à 24 h à 35 °C. On peut également purifier les colonies sur gélose mCPC, auquel cas l'incubation se fait à 40 °C. Vérifier la pureté des cultures dans les boîtes. Parfois, cet organisme produit à la fois des colonies translucides et opaques (9.6).
- 7.5.5 Utiliser l'un ou l'autre type de colonie provenant des boîtes T₁N₁, de TSA-2 % ou mCPC pour ensemercer les milieux biochimiques. Autrement, prélever deux colonies suspectes ou plus de chacune des boîtes de TCBS et de mCPC, les repiquer sur de la gélose TSA-2 % et incuber de 18 à 24 h à 35 °C.
- 7.5.6 Utiliser des colonies isolées comme inoculum frais pour les tests biochimiques. Afin de maintenir la viabilité, il faut repiquer les cultures de travail tous les 3 à 4 jours, à moins qu'elle soient conservées sous une couche d'huile dans le milieu pour le test de la mobilité.

7.6 Méthode d'identification — identification présomptive

- 7.6.1 Tests du caractère halophile et de la production de gélatinase — Diviser des boîtes GA et GSA en huit secteurs. Ensemercer des boîtes GA et GSA avec chacun des isolats présomptifs en une ligne au centre de chaque secteur. Incuber de 18 à 24 h à 35 °C. Rechercher la présence de zones de croissance dans les boîtes GA et GSA et d'un halo autour des zones. Les espèces halophiles de *Vibrio* ne poussent que sur milieu GSA. Les isolats qui ne donnent pas de croissance sur milieu GA, mais poussent bien sur milieu GSA, appartiennent probablement à *V. vulnificus* et nécessitent des analyses plus poussées. Un isolat croissant sur GA et/ou ne croissant pas sur GSA ne peut pas appartenir à *V. vulnificus*. La plupart des espèces de *Vibrio*, notamment *V. vulnificus*, sont gélatinase-positives et forment un halo opaque autour des zones de croissance. Cette réaction est importante pour différencier les espèces de *Vibrio* d'autres genres et familles.
- 7.6.2 Test d'agglutination des flagelles (facultatif) — On peut rapidement identifier *V. vulnificus* à l'aide des réactifs agglutinant les flagelles de Simonson et Siebeling (9.9). On peut obtenir de ces auteurs les réactifs accompagnés d'une méthode d'analyse détaillée. Prélever des colonies bien isolées des boîtes mCPC, T₁N₁ ou TSA-2 % et ensemercer dans le tampon TET ou FPBS (environ 3 mL). S'assurer de l'absence d'agglomérations dans la suspension. Garder la suspension de cellules dans le tampon TET à la température de la pièce pendant au moins 1 h pour permettre au Triton X-100 d'éliminer la gaine capsulaire autour de la flagelle, ou procéder immédiatement à l'essai de la suspension dans le FPBS. Mettre une goutte (10 à 15 µL) des cellules en suspension sur une lame de verre. Ajouter un volume égal de sérum anti-flagellaire et mélanger au moyen d'un bâtonnet applicateur en bois. Maintenir la lame sous une source de lumière indirecte et observer l'agglutination pendant 10 à 60 s; dans le tampon FPBS, la réaction peut prendre jusqu'à 3 min. Inclure un témoin positif et un témoin négatif. Les isolats qui ne montrent pas d'agglutination n'appartiennent pas à *V.*

vulnificus et ne nécessitent pas d'analyse plus poussée. Toutefois, les isolats qui montrent une agglutination doivent être soumis à d'autres essais, lesquels sont décrits plus loin.

- 7.6.3 Coloration de Gram — Soumettre tous les positifs présomptifs à une coloration de Gram en utilisant des bactéries fraîches (24 h de croissance). *V. vulnificus* est un bacille incurvé ou droit non sporulé, Gram négatif.
- 7.6.4 Recherche de l'oxydase — Utiliser des bactéries prélevées sur gélose TSA-2 % ou GSA, mais non sur TCBS, pour vérifier l'activité de l'oxydase. On a obtenu des faux négatifs à la recherche de l'oxydase avec des colonies prélevées directement sur gélose TCBS (9.11). Ne pas utiliser une anse en nickel-chrome. Gratter une zone de croissance à l'aide d'un applicateur en bois stérile et appliquer sur une bandelette imprégnée de réactif disponible dans le commerce. Dans le cas de souches positives, on devrait déceler l'apparition d'une coloration bleue en moins de 10 s. On peut également appliquer 2 ou 3 gouttes de réactif de la recherche de l'oxydase directement sur des cultures de 18 à 24 heures dans des boîtes de Petri et observer l'apparition de la coloration bleue en moins de 2 min.
- 7.6.5 Sensibilité au composé O/129 — Ensemencer en stries une boîte de TSA-2 % de façon à obtenir une croissance confluyente après incubation. Mettre les disques renfermant 10 et 150 µg du vibriostat O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylptéridine) dans les zones les plus densément ensemencées. Incuber les boîtes pendant 18 à 24 h à 35 °C et examiner les zones où il n'y a pas de croissance, ce qui indique une sensibilité au composé. *V. vulnificus* est sensible au composé O/129 aux deux concentrations (10 et 150 µg).
- 7.6.6 Utiliser des cultures pures provenant de boîtes ou de géloses inclinées TSA-2 % pour ensemencer les milieux suivants qui sont incubés pendant 18-24 h à 35 °C, à moins d'indication contraire.
- 7.6.7 Activité de l'arginine-dihydrolase — Des géloses inclinées AGS sont ensemencées en piqûre et en stries. Examiner si la pente présente une coloration et s'il y a production H₂S et de gaz. Étant donné que *V. vulnificus* est arginine-hydrolase négative, les cultures sur AGS présenteront une pente pourpre et un culot jaune à cause de la fermentation du glucose. Il n'y a pas production de gaz ou de H₂S.
- 7.6.8 Test de l'indole — Utiliser la gélose inclinée AGS pour le test de production d'indole uniquement après avoir vérifié la réaction de l'arginine-dihydrolase (7.6.7). Ajouter 5 gouttes de réactif de Kovacs à la gélose inclinée et agiter doucement le tube. L'apparition d'une couleur rose indique qu'il y a production d'indole. Les souches de *V. vulnificus* sont indole-positives. Un tube donnant une réaction douteuse ou négative doit être réincubé pendant 24 h.
- 7.6.9 Gélose trois sucres-fer (TSI) — Des géloses inclinées TSI sont ensemencées en piqûre et en stries. Examiner si la pente présente une coloration et s'il y a production de H₂S et de gaz. La pente doit être rouge (alcaline) et le culot jaune (acide). Aucune production de gaz ou de H₂S. Dans de rares cas, certaines souches de *V. vulnificus* présentent une pente acide.
- 7.6.10 Recherche de l'ONPG — Exécuter la recherche de l'ONPG sous la hotte à partir de cultures en gélose inclinées TSI. Émulsifier une pleine anse de chaque culture dans 0,25 mL d'eau physiologique stérile. Ajouter une goutte de toluène à la suspension et bien mélanger. Incuber pendant 5 min à 37 °C. Ajouter 0,25 mL de réactif ONPG au tube et incuber dans un bain-marie à 37 °C. Enregistrer les résultats après 30 min, 1 h et 24 h. Une solution jaune indique une réaction positive. On peut également utiliser des disques disponibles dans le commerce.
- 7.6.11 Oxydation/fermentation du glucose — Deux tube de bouillon glucosé de Hugh-Leifson sont ensemencés par piqûre. Recouvrir un des tubes de paraffine stérile. Le glucose est utilisé par fermentation dans le tube recouvert de paraffine et par oxydation dans l'autre tube. Les tubes de bouillon glucosé de Hugh-Leifson présentant une coloration jaune sont considérés positifs.
- 7.6.12 Fermentation des glucides — Ensemencer des bouillons au bromocrésol pourpre renfermant un des sucres suivants : sucrose, lactose, mannose, arabinose et cellobiose. Recouvrir les tubes d'huile minérale stérile et incuber pendant 4 ou 5 jours à 35 °C, en vérifiant chaque jour. Une fermentation

acide fait virer le milieu au jaune. S'il y a production de gaz, on observera des bulles dans le flacon de Durham.

- 7.6.13 Test de Voges-Proskauer (VP) — On ensemence du bouillon MR-VP et on incube pendant 48 h à 35 °C. À 1 mL de la culture de 48 h, ajouter 0,6 mL de α -naphtol et 0,2 mL de réactif au KOH. Agiter le tube après addition de chaque solution. 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 avoir ajouté les réactifs. L'apparition d'une coloration rose indique un test positif. *V. vulnificus* est VP-négatif. On peut également utiliser un réactif VP du commerce.
- 7.6.14 Recherche de la décarboxylase — Ensemencer des bouillons de Falkow pour la recherche de la décarboxylase qui comprend des tubes dont chacun renferme un des acides aminés (lysine, arginine ou ornithine) et un tube sans acide aminé, et incuber pendant 4 à 5 jours à 35 °C, en vérifiant chaque jour. Ces tubes présentent à l'origine une couleur pourpre, mais ils virent au jaune en 3 à 4 h à cause de la croissance et de la formation d'acide. La présence d'une décarboxylase spécifique de chaque acide aminé se traduit par la réapparition de la coloration pourpre due à la production d'amine. Toutefois, les résultats ne peuvent être considérés comme positifs que si, pour cette souche, le tube sans acide aminé demeure jaune.
- 7.6.15 Test de tolérance au sel — Ensemencer des bouillons à la tryptone renfermant 0, 3, 6, 8 et 10 % de NaCl. Un résultat positif se traduit par une croissance abondante dans le bouillon à la tryptone renfermant 3 et 6 % de NaCl, et par peu ou pas de croissance aux concentrations de 0, 8 et 10 %.
- 7.6.16 Test de thermotolérance — Ensemencer du TSB et incuber à 42 °C. La réaction n'est jugée positive que s'il y a croissance abondante. *V. vulnificus* croît rapidement à cette température.
- 7.6.17 Test de la mobilité — Ensemencer une fois le milieu pour le test de la mobilité par piqûre au centre, presque jusqu'au fond du tube. *V. vulnificus* est mobile. Une croissance diffuse de la bactérie à partir de la ligne de piqûre indique une réaction positive. Si la croissance est observée uniquement le long de la ligne de piqûre, l'organisme est considéré comme non mobile.

7.7 **Caractéristiques minimales requises pour l'identification de *V. vulnificus***

- 1) Morphologie — Bacille droit ou incurvé, asporulé, à Gram négatif.
- 2) Aspect sur TSI — pente alcaline et culot acide, pas de production de gaz ou de H₂S.
- 3) Test de Hugh-Leifson — positif pour l'oxydation et la fermentation du glucose.
- 4) Oxydase- positif.
- 5) Arginine-dihydrolase-négatif.
- 6) Lysine- décarboxylase -positif.
- 7) Test de Voges-Proskauer négatif.
- 8) Croissance à 42°C positive.
- 9) Tolérance au sel — positive pour NaCl 3 and 6%, négative pour NaCl 0, 8 et 10%.
- 10) Fermentation du sucrose — négative (rarement positive).
- 11) Recherche de l'ONPG positive.
- 12) Fermentation de l'arabinose négative
- 13) Sensibilité au composé O/129 - sensible à 10 et 150 μ g.

Le tableau 1 montre les réactions biochimiques typiques de *V. vulnificus* par comparaison à deux autres espèces pathogènes de *Vibrio*.

7.8 **Méthodes d'identification — Confirmation (tests facultatifs)**

Toute culture présentant des réactions typiques de *V. vulnificus* est présumée positive. Une confirmation plus poussée de ces souches est facultative. La confirmation peut se faire par agglutination des flagelles, immunodosage enzymatique (EIA), analyse par sonde génique et analyse des acides gras. Les méthodes sont décrites en détail à la référence 9.2.

7.8.1 **Agglutination des flagelles** — L'agglutination des flagelles à été décrite à la section 7.6.2.

7.8.2 Immunodosage enzymatique (EIA) (référence 9.10)

7.8.2.1 Gratter deux colonies dans des boîtes de mCPC et étaler dans des puits individuels d'une plaque de microtitrage de 96 puits renfermant 100 µL d'eau peptonée alcaline. Incuber pendant 6 à 8 h à 35 °C. Après incubation, transférer deux fois 25 µL de la solution de chacun des puits dans deux puits en parallèle d'une deuxième plaque de microtitrage (un puits sert d'essai, l'autre sert de témoin négatif).

7.8.2.2 Ajouter 25 µL de la solution de revêtement dans chacun des puits. Déposer les plaques dans un incubateur sec à 35 °C jusqu'au lendemain pour assécher les échantillons dans les puits. À ce point, on peut interrompre la méthode et conserver les isolats indéfiniment à -70 °C après addition, dans chaque puits, de 100 µL de TSB stérile additionné de NaCl 1 % et de glycérol 24 %.

7.8.2.3 Si l'on poursuit la méthode, s'assurer que les puits sont secs, puis ajouter 200 µL de BSA 1 % dans du PBS, un agent bloquant, dans chacun des puits. Incuber les plaques à la température de la pièce pendant 1 h. Laver les puits trois fois à l'aide d'un laveur de plaque ou à la main en remplissant complètement les puits avec la solution de lavage pour EIA. Enlever l'excédent de solution entre chaque lavage en tapant fermement les plaques sur du papier absorbant déposé sur le comptoir.

7.8.2.4 Ajouter 50 µL d'anticorps monoclonal spécifique de *V. vulnificus*, dilué 1:4 avec du PBS, dans les puits d'essai. Les puits témoins reçoivent des anticorps spécifiques d'autres espèces que *V. vulnificus*. Incuber les plaques pendant 1 h à la température de la pièce. Laver les puits avec la solution de lavage pour EIA comme il est indiqué plus haut. Diluer l'IgG anti-souris de chèvre conjuguée à la peroxydase avec du BSA-PBS selon les directives du fabricant. Ajouter 50 µL de cette solution dans chacun des puits. Incuber les plaques dans l'obscurité pendant 1 h à la température de la pièce. Laver cinq fois, puis ajouter dans chaque puits 100 µL de solution de substrat pour EIA fraîchement préparée. Incuber pendant 10 à 30 min à la température de la pièce. Un puits d'essai est considéré positif lorsque sa densité optique à 410 nm est de 0,200 supérieure à celle du témoin négatif.

7.8.3 Sonde génique

7.8.3.1 Les sondes géniques pour *V. vulnificus* sont basées sur la détection du gène de la cytotoxine-hémolysine. On peut obtenir cette sonde en s'adressant à A.C. Wright (9.12) ou à J. Madden (réf. 9.2; téléphone : (202) 205-4197). La méthode détaillée d'hybridation des colonies est décrite à la référence 9.3.

7.8.3.2 En général, l'ADN plasmidique est isolé du vecteur, coupé par une endonucléase de restriction et des séquences géniques spécifiques sont séparées par électrophorèse sur gel. Les fragments peuvent être marqués par un atome radioactif (³²P) ou par une autre méthode et ils sont utilisés pour l'hybridation de l'ADN. Des cultures bactériennes, dont des témoins positifs et négatifs connus, sont ensemencées en piqûre dans des boîtes de gélose et incubées. On peut faire l'essai de plusieurs cultures dans une seule boîte, à condition que les colonies soient bien isolées. On peut également utiliser directement des homogénats d'aliments (9.3). Les colonies sont transférées sur des filtres de nitrocellulose où les cellules sont lysées et hybridées avec l'une des sondes d'ADN marquées. Lorsqu'il s'agit de sondes radioactives, la détection se fait par autoradiographie; les souches positives apparaissent comme des taches sombres sur le film à rayons X. Lorsqu'il s'agit de sondes enzymatiques non radioactives, la détection se fait par révélation au moyen d'un colorant. Il est important d'étiqueter les filtres et les films de façon à ce que l'orientation permette d'identifier chaque souche.

7.8.4 Analyse des acides gras

7.8.4.1 La détermination des acides gras cellulaires des espèces de *Vibrio* par chromatographie en phase gazeuse peut servir à identifier des organismes inconnus ou à confirmer des positifs présomptifs (9.5). Lorsque le système d'identification des microorganismes (Hewlett Packard) est utilisé, il faut suivre le protocole fourni par le fabricant. En général, les cultures bactériennes croissent dans des conditions précises (milieu, température et durée d'incubation). Les cellules sont récoltées, mises en suspension dans une solution fortement alcaline et saponifiées. Après chauffage et acidification, les acides gras libérés sont méthylés et les esters d'acides gras produits sont extraits, lavés dans une base diluée et dosés. Le système informatique d'identification des microorganismes est doté d'une banque de profils d'acides gras correspondant à un grand nombre de bactéries, y compris les espèces de *Vibrio*. Le profil d'une culture « inconnue » est comparé à tous les profils de la banque. Pour augmenter au

maximum la probabilité d'une identification correcte, il faut que les conditions de croissance soient exactement les mêmes que celles utilisées à l'origine pour la constitution de la banque.

7.9 **Calcul des résultats**

7.9.1 Lorsque les isolats positifs sont confirmés, on peut calculer le NPP de *V. vulnificus* par g de matériel original. Le tableau 2 renferme les NPP pour différentes dilutions. Parfois, on ne décèlera pas l'organisme dans des tubes renfermant des concentrations élevées de l'inoculum original, mais on le décèlera dans des tubes renfermant des concentrations moins élevées, ce qui se traduira par des tubes négatifs parmi des tubes positifs ou par des profils inhabituels. Lorsqu'on ne retrouve pas dans le tableau un profil de tubes positif, il faut apporter des corrections. Ces corrections sont basées sur l'hypothèse que si *V. vulnificus* se trouve dans les tubes à faible concentration, il doit également être présent dans les tubes à concentrations plus élevées. La raison exacte de ces tubes négatifs est inconnue, mais on l'a observé également avec *Vibrio parahaemolyticus* (9.8).

7.10 **Test de pathogénicité**

7.10.1 Les souches confirmées comme étant *V. vulnificus* peuvent faire l'objet d'un test de pathogénicité au moyen du bioessai sur la souris en présence de fer (9.2). Pour des raisons de sécurité, les tests de pathogénicité doivent être exécutés dans des installations de confinement de niveau 2 à tout le moins. Prélever des colonies opaques plutôt que translucides dans les boîtes de TSA (9.6). Ensemencer les isolats dans des erlenmeyers de 250 mL renfermant 50 mL de HIB additionné de NaCl 1 % et incuber pendant 8 à 12 heures dans un incubateur à 35 °C avec agitation. Une bonne aération est nécessaire. Centrifuger les cultures (9 000 X g pendant 10 min) et laver le culot deux fois avec 10 mL de PBS. Remettre les cellules lavées en suspension dans du PBS et faire des dilutions en série jusqu'à 10⁻⁸. Ensemencer chacune des dilutions qui seront données aux souris, et déterminer le nombre de bactéries viables par dénombrement sur plaque. Idéalement, le nombre de bactéries viables de la suspension non diluée devrait être de 10⁹ cellules/mL. Environ 2 h avant de les inoculer, on administre par voie intramusculaire du fer dextran à cinq groupes de cinq souris de 20 g à raison de 250 µg/g de poids corporel. Deux heures après l'administration du fer, quatre groupes de souris reçoivent chacune par voie intrapéritonéale des volumes de 0,5 mL renfermant 10⁰, 10¹, 10² ou 10³ cellules souches indéterminées pluripotentiellles (CFU)/mL. Inoculer le cinquième groupe (souris témoins) avec 0,5 mL de PBS stérile. Observer les souris pendant 48 h et compter le nombre de décès dans chaque groupe. Un isolat est considéré comme virulent lorsque l'une ou l'autre des souris ayant reçu 10³ cellules ou moins de cette souche meurt, alors qu'aucun décès n'est enregistré dans le groupe témoin. Les souches non virulentes nécessitent au moins 10⁶ CFU/souris pour entraîner un décès.

8. **CONSERVATION**

V. vulnificus ne survit pas longtemps sur des milieux en boîte de Petri; il faut donc repiquer les souches sur un milieu de conservation le plus tôt possible. On a déjà traité de la conservation à court terme dans la section 7.5.6. Le milieu utilisé pour le test de mobilité est excellent pour conserver une culture pendant 2 à 3 mois à la température de la pièce. Recouvrir le milieu de glycérol ou de paraffine stérile. Pour une conservation à plus long terme, on doit faire croître des cultures pures dans des boîtes de Petri renfermant un milieu servant à établir la pureté (TSA-2 % ou T₁N₁), puis les mettre en suspension dans de l'eau peptonée alcaline renfermant au moins 10 % de glycérol. Ces cultures se gardent indéfiniment à -70 °C.

9. **RÉFÉRENCES**

- 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 Determinative Bacteriology, Vol. 1. (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, Food and Drug Administration, 7th edition. AOAC International, Arlington VA. pp. 111-141.
- 9.3 Hill, W.E., Datta, A.R., Feng, P., Lampel, K.A. and Payne, W.L. 1992. Identification of food borne bacterial pathogens by gene probes. In: Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration, 7th Edition. AOAC International, Arlington VA. pp. 383-419.

- 9.4 Hunt, D.A., Miescier, J., Redman, J., Salinger, A. and Lucas, J.P. 1984. Molluscan shellfish, fresh or fresh frozen oysters, mussels, or clams. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd Edition (ed.) M.I. Speck. American Public Health Association, Washington D.C. pp. 590-610.
- 9.5 Miller, L. and Berger, T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. Gas Chromatog. Applic. Note 228-41.
- 9.6 Oliver, J.D. 1989. *Vibrio vulnificus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens (ed.) M. P. Doyle. Marcel Dekker Inc., New York NY. pp. 569-600.
- 9.7 Oliver, J.D., Nilsson, L. and Kjelleberg, S. 1991. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. Appl. Environ. Microbiol. 57:2640-2644.
- 9.8 Sakazaki, R., Pivnick, H., Jarvis, G., Goddard, M., Asakawa, Y., Barrow, G., Beuchat, L., Colwell, R., Gleeson, T., Gray, R., Nakanishi, H., Sakai, S., Stavric, S., Takizawa, K., Tamura, K., Twedt, R., Vanderzant, C. and West, P. 1986. ICMSF methods studies. XVI. Comparison of salt polymyxin broth and glucose salt teepol broth for enumerating *Vibrio parahaemolyticus* in naturally contaminated samples. J. Food Prot. 49:773-780.
- 9.9 Simonson, J.G. and Siebeling, R.J. 1986. Rapid serological identification of *Vibrio vulnificus* by anti-H coagglutination. Appl. Environ. Microbiol. 52:1299-1304.
- 9.10 Tamplin, M.L., Martin, A.L., Ruple, A.D., Cook, D.W. and Kaspar, C.W. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. Appl. Environ. Microbiol. 57:1235-1240.
- 9.11 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.
- 9.12 Wright, A.C., Morris Jr., J.G., Maneval Jr., D.R., Richardson, K. and Kaper, J.B. 1985. Cloning of the cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 50:922-924.

10. PRÉPARATION DES MILIEUX

10.1 Eau peptonée alcaline

| | |
|---------------|------|
| Peptone | 10 g |
| NaCl | 10 g |
| Eau distillée | 1 L |

Ajuster le pH à 8.5 ± 0.2 après dissolution des ingrédients. Répartir dans des tubes à raison de 10 mL par tube et autoclaver pendant 10 min à 121 °C.

10.2 Gélose inclinée arginine-glucose (AGS)

| | |
|-----------------------------|--------|
| Peptone | 5 g |
| Extrait de levure | 3 g |
| Tryptone | 10 g |
| NaCl | 20 g |
| Glucose | 1 g |
| L-arginine(chlorhydrate) | 5 g |
| Citrate d'ammonium ferrique | 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 porter à ébullition pour dissoudre la gélose. Ajuster le pH à 6,8-7,0. Répartir dans des tubes à bouchon à vis à raison de 8 mL par tube. Autoclaver pendant 10 min à 121 °C. En refroidissant, les tubes doivent être inclinés de façon à donner un culot de 3 cm.

10.3 Bouillon au bromocrésol pourpre

Milieu de base

| | |
|---------------------|--------|
| Peptone | 10 g |
| Extrait 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 dans des tubes à raison de 9 mL par tube. Autoclaver pendant 10 min à 121 °C. Lorsque les tubes sont refroidis, ajouter en asepsie une solution de sucre à 10 % stérilisée et filtrée.

10.4 Solution de blocage pour EIA

| | |
|-----------------------|--------|
| Albumine bovine (BSA) | 1 g |
| PBS | 100 mL |

Dissoudre la BSA dans du PBS. Ajuster le pH à 7,4. Répartir dans des flacons stériles à raison de 1 mL par flacon. Conserver à -20 °C

10.5 Solution de revêtement pour EIA

| | |
|--------------|--------|
| PBS | 100 mL |
| Triton X-100 | 20 µL |

Mélanger le PBS et le triton X-100. Ajuster le pH à 7,4.

10.6 Conjugat à la peroxydase pour EIA

Diluer l'IgG anti-souris de chèvre conjuguée à la peroxydase avec la solution de blocage (10.5) selon les instructions du fabricant.

10.7 Solution de substrat pour EIA

| | |
|---|--------|
| 2,2'-azino-di-[3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonate] | 0.01 g |
| Solution d'acide citrique (0.05M) | 10 mL |
| H ₂ O ₂ (30%) | 30 µL |

Mélanger les ingrédients pas plus de 5 min avant d'utiliser la solution. Cette quantité suffit pour une plaque de microtitrage de 96 puits

10.8 Solution de lavage pour EIA

| | |
|---------------|--------|
| NaCl | 8.76 g |
| Tween 20 | 0.5 mL |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée.

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

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 les ingrédients jusqu'à dissolution. Ajouter 10 g de L-lysine, de L-arginine ou de L-ornithine au milieu de base. Ajuster le pH à 6,5-6,8. Répartir dans des tubes à bouchon à vis à raison de 5 mL par tube et autoclaver (bouchons desserrés) pendant 15 min à 121 °C. Lorsque les tubes sont refroidis, serrer les bouchons.

10.10 Eau physiologique tamponnée aux phosphates avec formaldéhyde (FPBS)

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaH ₂ PO ₄ | 9.25 g |
| NaCl | 85 g |
| Formaldéhyde | 3 mL |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre tous les ingrédients. Conserver dans une bouteille en verre ambré à bouchon à vis.

10.11 Gélose à la 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 agitant constamment et porter à ébullition pour dissoudre la gélatine et la gélose. Ajuster le pH à 7,2 ± 0,2. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C. Refroidir à 50 °C et répartir dans des boîtes de Petri.

10.12 Gélose gélatine-sel (GSA)

Préparer la gélose à la gélatine (10.11) et ajouter 30 g de NaCl.

10.13 Bouillon infusion de coeur (HIB) (disponible dans le commerce)

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

Pour le test de pathogénicité de *V. vulnificus*, ajouter en plus 10 g de NaCl/L.

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

10.14 Bouillon glucosé de Hugh-Leifson

| | |
|---------------------|---------|
| 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 dans l'eau et porter à ébullition pour dissoudre. Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$. Répartir en aliquotes de 5 mL dans des tubes à bouchon à vis. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

10.15 Réactif de Kovacs

| | |
|-----------------------------|-------|
| p-Diméthylaminobenzaldéhyde | 5 g |
| Alcool n-amylque | 75 mL |
| HCl conc. | 25 mL |

Dissoudre le p-diméthylaminobenzaldéhyde dans l'alcool n-amylque (il faudra peut-être chauffer doucement entre 50 et 60 °C dans un bain-marie). Ajouter lentement le HCl. Conserver au réfrigérateur à 4 °C. Laisser la solution 15 min à la température de la pièce avant de l'utiliser.

10.16 Bouillon rouge de méthyle-Voges Proskauer (MR-VP)

| | |
|---------------------------------|-----|
| Peptone | 7 g |
| Glucose | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 5 g |
| Eau distillée | 1 L |

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

Réactifs de VP

Solution d' α -naphtol — Dissoudre 5 g d' α -naphtol dans 100 mL d'éthanol absolu. Préparer une solution fraîche le jour de l'analyse.

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

10.17 Gélose cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC)

Milieu de base :

| | |
|--|--------|
| Peptone | 10 g |
| Extrait de boeuf | 5 g |
| NaCl | 20 g |
| Solution mère de colorant 1000X (Solution 1) | 1 mL |
| Gélose | 15 g |
| Eau distillée | 900 mL |

Ajuster le pH à 7.6. Porter à ébullition pour dissoudre la gélose. Refroidir à 48-55 °C.

Solution 1 (solution mère de colorant 1000X)

| | |
|---------------------|--------|
| Bleu de bromothymol | 4.0 g |
| Rouge de crésol | 4.0 g |
| Éthanol à 95% | 100 mL |

Pour une coloration uniforme du milieu, utiliser la solution mère plutôt que de peser chaque fois les colorants individuels. Dissoudre les colorants dans l'éthanol de façon à obtenir une solution mère de 4 % (p/v). En utilisant 1mL de cette solution par L de gélose mCPC, on obtient 40 mg de bleu de bromothymol et 40 mg de rouge de crésol par L.

Solution 2:

| | |
|---------------|----------------|
| Cellobiose | 10 g |
| Colistine | 400,000 unités |
| Polymyxine B | 100,000 unités |
| Eau distillée | 100 ml |

Dissoudre la cellobiose dans l'eau distillée en chauffant doucement. Laisser refroidir. Ajouter les antibiotiques. Ajouter la solution 2 au milieu de base refroidi, mélanger et répartir dans des boîtes de Petri. La coloration finale du milieu est vert foncé à vert brunâtre.

NOTE: Ce milieu, comme le milieu TBS, est très inhibiteur et n'a pas besoin d'être autoclavé.

10.18 Milieu pour le test de la mobilité (disponible dans le commerce)

| | |
|---------------------|------|
| Peptone ou gelysate | 10 g |
| Extrait de boeuf | 3 g |
| NaCl | 20 g |
| Gélose | 4 g |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre les ingrédients en chauffant et en agitant et faire bouillir pendant 1 à 2 min pour dissoudre la gélose. Répartir en portions de 8 mL dans des bouchons à vis. Autoclaver pendant 15 min à 121°C.

10.19 Réactif pour la recherche de l'ONPG

Solution 1 (phosphate de monosodium 1M, pH 7)

| | |
|--|-------|
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 6.9 g |
| Solution de NaOH (30%) | 3 mL |
| Eau distillée | 45 mL |

Dissoudre le NaH₂PO₄.H₂O dans l'eau distillée et ajuster le pH à 7,0 avec la solution de NaOH. Porter le volume à 50 mL avec l'eau distillée. Conserver à 4 °C.

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

| | |
|--|-------|
| ONPG | 80 mg |
| Solution 1 (phosphate de monosodium 1 M, pH 7) | 5 mL |
| Eau distillée | 15 mL |

Dissoudre l'ONPG dans l'eau distillée 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 requis pour le nombre de tests à effectuer. On peut également utiliser les disques pour la recherche de l'ONPG disponibles dans le commerce.

10.20 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 de sa préparation

10.21 Eau physiologique tamponnée aux phosphates

| | |
|--|---------|
| Na ₂ HPO ₄ (anhydre) | 0.724 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.210 g |
| NaCl | 7.65 g |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée et porter le volume à 1 L. Ajuster le pH à 7,4 avec du NaOH 1 N. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

10.22 Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-sucrose (TCBS) (disponible dans le commerce)

| | |
|---|--------|
| 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 |

Ajouter les ingrédients dans un flacon et ajuster le pH à 8,6. Faire bouillir pendant 1 à 2 min pour dissoudre les ingrédients complètement. NE PAS AUTOCLAVER. Refroidir à 50 °C. Répartir en portions de 20 mL dans des boîtes de Petri.

10.23 Gélose trois sucres-fer (TSI) (disponible dans le commerce)

| | |
|---|---------|
| Extrait 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 pendant 1 min pour dissoudre complètement les ingrédients. Ajuster le pH à $7,4 \pm 0,2$. Répartir en portions de 8 mL dans des tubes à bouchon à vis. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C. Laisser se solidifier le milieu dans les tubes inclinés de façon à donner un culot de 3 cm.

10.24 Tampon Tris-EDTA -triton X-100 (TET)

| | |
|---------------------------|--------|
| Tampon Tris 0,1 M, pH 7,8 | 12.1 g |
| EDTA 0,1 mM | 0.03 g |
| Triton X-100 1,0 % | 10 mL |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre tous les ingrédients et vérifier le pH. Conserver à la température de la pièce.

10.25 Gélose trypticase-soja (TSA) (disponible dans le commerce)

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

Faire bouillir pendant 1 min pour dissoudre complètement les ingrédients. Ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$. Répartir le milieu dans des tubes à bouchon à vis à raison de 8 mL par tube et autoclaver pendant 15 min à 121 °C. Incliner les tubes pour obtenir une longue pente. On peut également, après que le milieu a été autoclavé et refroidi, le couler en aliquotes de 20 mL dans des boîtes de Petri.

10.26 Gélose TSA supplémentée avec NaCl 1,5 % (TSA-2%)

Préparer la gélose TSA (10.25) et ajouter 15 g de NaCl (20 g de NaCl/L au total). Procéder comme ci-dessus.

10.27 Bouillon trypticase soja (TSB) (disponible dans le commerce)

| | |
|---------------------------------|-------|
| Trypticase peptone (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 |

Dissoudre les ingrédients et ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$. Répartir dans des tubes à raison de 10 mL par tube et autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

10.28 Bouillon TSB avec NaCl 1 % et glycérol 24 %

| | |
|---------------------------------|--------|
| Trypticase peptone (tryptone) | 17 g |
| Phytone peptone | 3 g |
| NaCl | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2.5 g |
| Glucose | 2.5 g |
| Glycérol | 240 mL |
| Eau distillée | 760 mL |

Mettre les ingrédients en suspension dans l'eau distillée et chauffer pour dissoudre. Ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$. Répartir dans des flacons ou des bouteilles. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

10.29 Bouillon tryptone 1 % (T₁N₁) et bouillons tryptone 1%-sel (T₁N₁; T₁N₃; T₁N₆; T₁N₈; T₁N₁₀)

| | |
|-------------------------------|----------------------------|
| Trypticase peptone (tryptone) | 10 g |
| NaCl | 0, 10, 30, 60, 80 or 100 g |
| Eau distillée | 1 L |

Dissoudre les ingrédients. Pour le milieu T₁N₀, ne pas ajouter de sel. Pour le milieu T₁N₁, ajouter 10 g de NaCl; pour le milieu T₁N₃, ajouter 30 g de NaCl; pour le milieu T₁N₆, ajouter 60 g de NaCl, etc. Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,2$. Répartir en aliquotes de 5 mL et autoclaver pendant 15 min à 121 °C.

10.30 Gélose tryptone-sel (T₁N₁)

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

Pour préparer la gélose T₁N₁, mettre les ingrédients en suspension et faire bouillir pendant 1 à 2 min. Autoclaver pendant 15 min à 121 °C. Laisser refroidir à 50 °C avant de couler des portions de 20 mL dans des boîtes de Petri.

TABLEAU 1. CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DE TROIS ESPÈCES DE VIBRIO^a

| | <i>Vibrio vulnificus</i> | <i>Vibrio cholerae</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> |
|--------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Milieu AGS | K/A ^b | K/a ^c | K/A |
| Milieu TSI | K (A rare)/A | A (K rare)/A | K/A |
| Production de H ₂ S | - | - | - |
| Mobilité | + | + | + |
| Croissance dans : | | | |
| NaCl 0 % | - | + | - |
| NaCl 3 % | + | + | + |
| NaCl 6 % | + | - | + |
| NaCl 8 % | - | - | + |
| NaCl 10 % | - | - | - |
| Acide à partir de : | | | |
| glucose | + | + | + |
| sucrose | - | + | - |
| cellobiose | + | - | V ^d |
| lactose | + | - | - |
| arabinose | - | - | + |
| mannose | + | V | + |
| Gaz à partir de glucose | - | - | - |
| Décarboxylase: | | | |
| lysine | + | + | + |
| arginine | - | - | - |
| ornithine | (+) ^e | + | (+) |
| Croissance à 42°C | + | + | + |
| Hugh Leifson: | | | |
| oxydation | + | + | + |
| fermentation | + | + | + |
| Indole | + | + | + |
| Oxydase | + | + | + |
| ONPG | + | + | - |
| Voges-Proskauer | - | V | - |
| Gélatinase | + | + | + |
| Sensibilité au 0/129:10 µg | S ^f | S | R ^g |
| 150 µg | S | S | S |

^a tiré en partie des réf. 9.1 et 9.2.^b K, réaction alcaline (pente); A, réaction acide (culot).^c a, culot légèrement acide^d V, résultats variables signalés^e (), faible réponse positive signalée^f S, sensible^g R, résistante

TABLEAU 2. TABLEAU DES NPP POUR 3 TUBES PAR DILUTION

| Nombre de tubes positifs à la dilution (0.1, 0.01, 0.001 g) | Indice NPP par g | limite de confiance à 95 % | |
|---|------------------|----------------------------|------------|
| | | inférieure | supérieure |
| 0-0-0 | <3 | <0.5 | <9 |
| 0-0-1 | 3 | <0.5 | 9 |
| 0-1-0 | 3 | <0.5 | 13 |
| 0-2-0 | -- | -- | -- |
| 1-0-0 | 4 | <0.5 | 20 |
| 1-0-1 | 7 | 1 | 21 |
| 1-1-0 | 7 | 1 | 23 |
| 1-1-1 | 11 | 3 | 36 |
| 1-2-0 | 11 | 3 | 36 |
| 2-0-0 | 9 | 1 | 36 |
| 2-0-1 | 14 | 3 | 37 |
| 2-1-0 | 15 | 3 | 44 |
| 2-1-1 | 20 | 7 | 89 |
| 2-2-0 | 21 | 4 | 47 |
| 2-3-0 | -- | -- | -- |
| 3-0-0 | 23 | 4 | 120 |
| 3-0-1 | 39 | 7 | 130 |
| 3-0-2 | 64 | 15 | 380 |
| 3-1-0 | 43 | 7 | 210 |
| 3-1-1 | 75 | 14 | 230 |
| 3-1-2 | 120 | 30 | 380 |
| 3-2-0 | 93 | 15 | 380 |
| 3-2-1 | 150 | 30 | 440 |
| 3-2-2 | 210 | 35 | 470 |
| 3-3-0 | 240 | 36 | 1300 |
| 3-3-1 | 460 | 71 | 2400 |
| 3-3-2 | 1100 | 150 | 4800 |
| 3-3-3 | >1100 | >150 | >4800 |

Figure 1

Plan d'analyse des échantillons

- JOUR 1** **Préparation des échantillons :**
Préparer un homogénat à partir d'un échantillon de 50 g dans 450 mL de PBS et faire des dilutions décimales en série.
Enrichissement
Ensemencer les dilutions dans des tubes pour calcul du NPP contenant de l'eau peptonée alcaline. Incuber pendant 12 à 16 h à 35 °C.
- JOUR 2** **Milieux sélectifs :**
À partir du milieu d'enrichissement, ensemencer des inoculums dans des boîtes de TCBS et de mCPC. Incuber pendant 18 à 24 h à 35°C dans le cas du milieu TCBS et à 40°C dans le cas du milieu mCPC.
- JOUR 3** **Positifs présomptifs :**
Prélever des colonies typiques et ensemencer des boîtes de T₁N₁ et de TSA-2%. Ensemencer des colonies typiques sur des milieux GA and GSA. Optimal: Exécuter le test d'agglutination des flagelles au moyen d'isolats purs s'il est nécessaire de confirmer rapidement.
- JOUR 4** **Analyses biochimiques :**
Ensemencer des géloses inclinées AGS, TSI et TSA et celle pour le test de la mobilité (elles doivent toutes renfermer du NaCl à une concentration finale de 2 %). Exécuter les test de recherche de l'oxydase, de la sensibilité au composé O/129 et de la coloration de Gram.
- JOUR 5** **Suite des analyses biochimiques :**
Ensemencer des bouillons glucosés de Hugh Leifson, des tubes MR-VP, des bouillons de recherche de la décarboxylase de Falkow et des milieux renfermant des sucres. Exécuter le test de tolérance au sel, le test de thermotolérance, le test de l'indole et la recherche de l'ONPG.
- JOUR 6** **Confirmation (facultatif) :**
Exécuter le test d'agglutination des flagelles, l'immunodosage enzymatique (EIA), l'analyse par sonde génique ou l'analyse des acides gras

Détermination de la pathogénicité : Bioessai sur la souris en présence de fer.

Calcul des positifs confirmés : Tableau des NPP