



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

PARTIE 1 : DÉTECTION DES ESPÈCES DE VIBRIO HALOPHILES DANS LES FRUITS DE MER

Le Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : Don_Warburton@sc-hc.gc.ca

1. APPLICATION

La méthode peut être utilisée pour l'isolement et le dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et autres espèces de *Vibrio* halophiles dans les fruits de mer pour déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-15 datée d'avril 1997 et la méthode MFLP-57 datée de septembre 1996.

2. DESCRIPTION

Le genre *Vibrio* est composé d'anaérobies facultatifs Gram négatif en forme de bâtonnet ou de bâtonnet courbe. La plupart des espèces sont positives à l'oxydase et halophiles, c'est-à-dire qu'elles requièrent du chlorure de sodium supplémentaire dans le milieu de croissance. Les exceptions sont *V. cholerae* et *V. mimicus* (non halophile). De nombreux *Vibrio* spp., dont *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* sont des pathogènes humains.

3. PRINCIPE

La détection de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus*, ainsi que d'autres vibrios halophiles, se fait en trois étapes successives : i) enrichissement en milieu sélectif, ii) culture sur géloses d'isolement et identification présumptive et iii) confirmation par des tests biochimiques, sérologiques et de pathogénicité. Cette méthode s'inspire d'une procédure publiée dans le Bacteriological Analytical Manual (BAM) (8.8).

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

Les milieux et réactifs suivants (1 à 27) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 3 et la référence 8.1 pour la formulation des milieux individuels.

Note : Les milieux servant à l'isolement de *Vibrio* spp. demandent l'ajout de NaCl (concentration finale de 2 à 3 %). *V. cholerae* croît bien dans un milieu avec 0 à 3 % de NaCl. Ajouter du NaCl aux milieux décrits ci-dessous pour atteindre une concentration finale de 2 à 3 % de NaCl.

La teneur en sel du milieu suit entre crochets [NaCl %].

- (1) Bouillon peptone alcaline et sel (APS) [3 %]
- (2) Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) [0,85 %]
- (3) Eau peptonée alcaline (APW) [1 %]
- (4) Gélose au thiosulfate, au citrate et aux sels biliaires (TCBS) [1 %]
- (5) Gélose cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) [2 %]
- (6) Gélose au sang (optionnel) [0,5 %] - ajout optionnel de NaCl pour les halophiles
- (7) Gélose mannitol-maltose (optionnel) [2 %]
- (8) Gélose T₁N₂ (1 % de tryptone et 2 % de NaCl) (optionnel)
- (9) Bouillons tryptone 1 % contenant 0, 1, 3, 6, 8 et 10 % de NaCl (T₁N₀, T₁N₁, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀)
- (10) Gélose trypticase soya (TSA) [0,5 %] - ajout de 1,5 % de NaCl pour les halophiles
- (11) Gélose à l'arginine et au glucose en pente (AGS) [2 %]
- (12) Gélose gélatine (GA) [0 %]
- (13) Gélose gélatine avec 3 % de NaCl (GS)
- (14) Milieu de base pour la décarboxylase contenant de l'arginine, de la lysine, de l'ornithine - ajout optionnel de NaCl pour les halophiles
- (15) Bouillon MR-VP et réactifs pour V-P - ajout optionnel de NaCl au bouillon pour les halophiles
- (16) Hydrates de carbone dans un bouillon au violet de bromocrésol ou un bouillon OF, semi-solide : saccharose, lactose, D-mannitol, mannose, arabinose, cellobiose [0,5 %] - ajout optionnel de NaCl pour les halophiles
- (17) Gélose Wagatsuma [7 %]
- (18) Bouillon Hugh-Leifson glucosé [3 %] OU milieu OF glucosé, semi-solide [0,5 %]
- (19) Gélose à l'urée de Christensen en pente [0,5 %] - ajout optionnel de NaCl pour les halophiles

- (20) Solutions de coloration de Gram
- (21) Milieu pour test de mobilité [0,5 %] - ajout optionnel de NaCl pour les halophiles
- (22) Gélose aux trois sucres et au fer (TSI) [0,5 %] - ajout optionnel de 2,5 % de NaCl pour les halophiles
- (23) Galeries d'identification API 20E (bioMérieux Inc.) ou l'équivalent
- (24) Réactif pour l'épreuve de l'oxydase ou des bandelettes de test disponibles dans le commerce
- (25) Solution d'O-Nitrophényl-β-D-galactoside (ONPG) ou produit commercial
- (26) Huile minérale stérile
- (27) Cultures de contrôle positives et négatives (ATCC ou l'équivalent)
- (28) 2 % de NaCl dans de l'eau distillée (pour dilution et inoculation de l'API)
- (29) Incubateurs, 35°C, 40°C et 42°C
- (30) Mélangeur, stomacher ou équivalent

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs et les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur ou le bain-marie peut être à 35 ± 1,0 °C. De même, des températures plus basses à 30 ou à 25 °C peuvent être à ± 1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à ± 0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Composition des échantillons :

- a) Poissons: tissus de surface, intestins ou branchies
- b) Mollusques: tout le contenu intérieur de l'animal; prendre 10 à 12 animaux ou plus au besoin, passer au mélangeur, ne pas passer au stomacher, et prélever 50 g du composite pour l'échantillon d'essai
- c) Crustacés: animal entier, si possible ou la partie centrale de l'animal, y compris les branchies et les intestins

7.2 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.2.1 Au laboratoire, avant l'analyse, conserver les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (4 à 8 °C), à la température ambiante ou au congélateur, selon la nature du produit. Décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions (température et délai) où il n'y aura ni croissance, ni mort microbienne.
- 7.2.2 Analyser les échantillons décongelés le plus rapidement possible après leur réception au laboratoire afin de minimiser la prolifération et réduire le potentiel de vibrios viables, mais non cultivables (VBNC).

7.3 Préparation des dilutions

7.3.1 V. parahaemolyticus :

7.3.1.1 Préparer de façon aseptique une dilution 1:10 en combinant 50 g de fruits de mer avec 450 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), à pH de 7,2 à 7,5 ou avec 2 % de NaCl dans une jarre de mélangeur stérile ou dans un sac à stomacher. Mélanger au mélangeur les mollusques pendant deux minutes à grande vitesse. Mélanger ou passer au stomacher les autres échantillons pendant deux minutes.

Alternative : Mélanger 50 g de fruits de mer avec 50 ml du liquide de dilution (1:2) puis, faire une dilution 1:5 (20 g de la dilution 1:2 dans 80 ml du liquide de dilution) de l'homogénéat pour une dilution totale de 1:10.

7.3.1.2 Préparer des dilutions décimales (au 1/10) dans 2 % de NaCl ou du PBS à pH de 7,2 à 7,5. Ensemencer des séries de dilution multiple à 3 tubes servant à la détermination du NPP utilisant de l'eau peptonée alcaline (APW) ou de bouillon APS (c'est-à-dire, ajouter des portions de 1 ml pour chaque dilution 1:10 et dilutions plus élevées à des séries de trois tubes contenant 10 ml d'APW ou d'APS). Incuber les tubes de 16 à 18 heures à 35 °C. L'ensemencement des tubes NPP doit être complété en dedans de 15 à 20 minutes après la préparation de la dilution.

7.3.2 V. vulnificus.

7.3.2.1 Préparer la dilution initiale 1:10 dans de l'APW et les dilutions décimales subséquentes par multiple de 10 dans du PBS à pH de 7,2 à 7,5. Ensemencer les séries NPP de la façon décrite pour *V. parahaemolyticus* et incuber à 35 °C pendant 12 à 16 heures.

Note : Si l'enrichissement est à la fois pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, utiliser du PBS à pH de 7,2 à 7,5 et un bouillon d'enrichissement APW.

7.4 Ensemencement

7.4.1 Après l'incubation, **ne pas agiter** les tubes de culture.

7.4.2 Pour l'isolement de *V. parahaemolyticus*, examiner les tubes pour la présence de turbidité. Ensemencer en stries toutes les dilutions qui présentent une turbidité visible ainsi que la dilution suivante la plus élevée (non turbide) en prenant une anse de culture dans la partie supérieure de 1 cm de chaque bouillon. Ensemencer en stries sur gélose au thiosulfate, au citrate et aux sels biliaires (TCBS).

7.4.3 Pour l'isolement de *V. vulnificus*, ensemencer en stries les bouillons sur la gélose cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) selon la technique décrite en 7.4.2.

7.4.4 Ensemencer en stries les cultures de contrôle APS/APW de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sur TCBS et mCPC.

7.4.5 Incuber les géloses TCBS à 35 °C et les géloses mCPC à 40 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.6 Optionnel:

V. halles

Utiliser la gélose au sang ou la gélose mannitol-maltose, incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures, pour détecter *V. halles*.

7.5 Identification

- 7.5.1 Examiner les géloses TCBS et mCPC pour des colonies typiques de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, ainsi que pour des caractéristiques d'autres *VIBRIO* spp.

7.5.1.1 Gélose au thiosulfate, au citrate, aux sels biliaires et au saccharose (TCBS):

Sur la gélose TCBS, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, et *V. Hervé* sont des colonies rondes vertes ou bleuet d'un diamètre de 2 à 3 mm. Les colonies de *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae*, *V. metschnikovii*, et certains *V. vulnificus* sont plus larges et jaunes (acides suite à la fermentation du saccharose).

7.5.1.2 Gélose cellobiose-polymixine B-colistine modifiée (mCPC)

Sur la gélose mCPC, les colonies de *V. vulnificus* sont aplaties et jaunes (acides suite à la fermentation du cellobiose) avec des centres opaques et des pourtours transparents, d'un diamètre approximatif de 2 mm. Il s'agit d'une identification présomptive de *V. vulnificus*. Les non-fermenteurs de cellobiose, tels que *V. cholerae* El Tor, apparaissent comme des colonies surélevées violettes ou vertes. *V. parahaemolyticus* croît rarement sur la gélose mCPC. D'autres espèces de *Vibrio* ne croissent pas facilement sur la gélose mCPC. Des Pseudomonades produisent des colonies pourpres ou vertes et sont fréquemment observées à de faibles dilutions de l'échantillon.

7.5.1.3 Gélose au sang

Inonder la plaque incubée pendant 18 à 24 heures avec le réactif pour l'épreuve de l'oxydase et choisir les colonies positives à l'oxydase (bleu foncé) (8.15). Parce que *V. hollisae* ne croît pas sur les géloses TCBS et mCPC, cette méthode non sélective peut isoler l'organisme. Toutefois, la sur croissance par d'autres bactéries peut constituer un problème.

7.5.1.4 Gélose mannitol-maltose

Sur ce milieu non sélectif, les colonies de *V. hollisae* sont rondes, brillantes et violettes (ne fermentent pas le mannitol ni le maltose), alors que d'autres *Vibrio* spp. sont jaunes (acides suite à la fermentation du mannitol et/ou du maltose). La sur croissance par d'autres bactéries peut constituer un problème.

- 7.5.2 Prélever 3 colonies ou plus qui sont typiques ou suspectes à partir de chaque milieu et ensemer en stries une gélose T₁N₂ (1 % de tryptone et 2 % de NaCl) ou une gélose trypticase soya (TSA) + 1,5 % de NaCl (concentration finale de 2 % de NaCl) pour isolement. Incuber de 18 à 24 heures à 35 °C.

7.5.3 Tolérance au sel : gélose gélatine (GA) et gélose gélatine avec 3 % de NaCl (GS)

À partir des mêmes colonies, tester pour la tolérance au sel en divisant les plaques de GA et de GS en 8 secteurs. Ensemer une ligne droite au centre d'un secteur de chacune des plaques de GA et GS avec chaque isolat. Incuber de 18 à 24 heures à 35 °C. *V. cholerae* et *V. mimicus* croîtront sur les deux plaques parce qu'ils ne requièrent pas de sel. Les *Vibrio* spp. halophiles croîtront seulement sur la plaque de GS. Pour lire la réaction à la gélatinase, tenir la plaque au-dessus d'une surface noire. Un halo opaque sera présent autour de la croissance des organismes positifs à la gélatinase. La plupart des *Vibrio* spp. sont positifs à la gélatinase.

7.5.4 Identification biochimique préliminaire :

Note : Consulter le tableau 2 pour les caractéristiques biochimiques les plus connus des *Vibrio* spp. Pour des renseignements biochimiques sur d'autres espèces, voir BAM, chapitre 9, tableau 3 (8.8); Manual of Clinical Microbiology (8.30) ou autres références appropriées.

Note : Avant de commencer, s'assurer que la culture ne croît pas sur la gélose GA, qu'elle est positive à la gélatinase et qu'elle est pure. Les cultures de *Vibrio* spp. présentent souvent deux morphologies de colonies qui peuvent être stables ou non.

7.5.4.1 Tests d'identification rapide

Des galeries API 20E ou des trousse d'identification rapide équivalentes peuvent être utilisées comme solution de rechange aux milieux en tube traditionnel pour les tests biochimiques. Toutefois, certains *Vibrio* spp. ne croîtront pas dans les milieux des galeries de tests commerciales lorsque une solution physiologique saline (0,85 % de NaCl) est utilisée comme diluant. Utiliser 2 % de NaCl comme diluant. Si les galeries commerciales ne permettent pas l'identification, continuer avec des tests traditionnels.

7.5.4.2 Test de l'oxydase

Se servir de la croissance sur la plaque de GS (ou autre milieu sans hydrates de carbone fermentables) pour le test de l'oxydase. Placer 2 ou 3 gouttes du réactif de l'oxydase sur la croissance bactérienne ou transférer une petite quantité de la croissance avec un cure-dent stérile ou une anse de platine ou jetable sur un papier filtre imbibé avec le réactif de l'oxydase. (Ne pas utiliser des anses de nickel chrome.) Une couleur bleu foncé apparaîtra rapidement (en moins de 2 minutes), ce qui dénote une réaction positive. *V. metschnikovii* est le seul *Vibrio* spp. halophile pathogène négatif à l'oxydase.

7.5.4.3 À partir des colonies isolées, inoculer le milieu du test de mobilité, l'AGS, la gélose aux trois sucres et au fer en pente (TSI). Ensemencer également le bouillon trypticase soja (TSB), la gélose en pente TSA et la plaque TSA, tous avec une concentration finale de 2 % de NaCl, requis pour les tests supplémentaires. Incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Consulter les divers tests des tableaux 2 et 3 pour l'identification.

a) Milieu pour le test de mobilité

Ensemencer l'inoculum en piqûre au centre et aux 2/3 de la profondeur du milieu du test de mobilité. Incuber de 18 à 24 heures à 35 °C. Une croissance bactérienne circulaire diffuse à partir de la ligne de piqûre est un test positif. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et les *Vibrio* spp. connexes sont mobiles. Après 24 heures, bien fermer le tube et entreposer à 20 à 25 °C pour préserver la culture.

b) Gélose à l'arginine et au glucose en pente

Ensemencer la pente en stries et le culot par piqûre de l'AGS. Incuber les tubes faiblement bouchés ou fermés pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Les *Vibrio* spp. ne produisent pas de H₂S ou de gaz. Les réactions typiques de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont une pente alcaline (violette) et un culot acide (jaune). Consulter les tableaux 1 et 2 pour l'interprétation des résultats.

c) Gélose aux trois sucres et au fer en pente

Ensemencer la pente en stries et le culot par piqûre de la gélose TSI. Incuber les tubes faiblement bouchés ou fermés pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Les *Vibrio* spp.

produisent un culot acide (jaune), mais ne produisent pas de gaz ou de H₂S. *V. parahaemolyticus* produit une pente alcaline (rouge). *V. vulnificus* produit habituellement une pente alcaline (rouge). Consulter les tableaux 1 et 2 pour l'interprétation des résultats.

Utiliser ce milieu ou un autre contenant du lactose comme source d'inoculum pour le test de l'ONPG.

7.5.4.4 Sensibilité au vibriostat O/129

Placer les disques qui contiennent 10 et 150 µg du composé vibriostatique O/129 sur une zone striée très dense d'une gélose TSA avec une concentration finale de 2 % de NaCl. Inverser les plaques et incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Les *Vibrio* spp. sont sensibles à 150 µg du composé O/129, mais certains sont résistants à 10 µg du composé O/129. Consulter le tableau 2 pour l'interprétation des résultats.

7.5.5 Si des réactions typiques sont observées, continuer avec les tests d'identification. Calculer le NPP de *V. parahaemolyticus* (voir le tableau 4), basé sur le nombre de tubes contenant *V. parahaemolyticus*.

7.5.6 Autres tests biochimiques

7.5.6.1 Test de l'ONPG

Effectuer un test de l'ONPG en utilisant un inoculum de la culture TSI ou autre milieu qui contient du lactose. Utiliser un test traditionnel en éprouvette (préféré) dans une hotte chimique ou des disques vendus commercialement. *V. vulnificus* est positif à l'ONPG; *V. parahaemolyticus* est négatif à l'ONPG.

7.5.6.2 Test d'oxydation/fermentation

Ensemencer 2 tubes du bouillon Hugh-Leifson glucosé ou un milieu OF glucosé, semi-solide avec la croissance à partir d'une colonie isolée. Couvrir le milieu dans un tube avec de l'huile minérale stérile ou du Vaspar (50 % de gel de paraffine, 50 % de paraffine) à une profondeur de 1 à 2 cm et incuber 1 à 2 jours ou plus à 35 °C. L'acidité amène le colorant à changer du violet au jaune dans un bouillon Hugh-Leifson et de vert à jaune dans un milieu OF semi-solide. Les *Vibrio* spp. fermentent le glucose et produisent de l'acide oxydativement à partir du glucose. Les *Pseudomonas* spp., communément isolés à partir des fruits de mer par les méthodes d'enrichissement utilisées pour *Vibrio* spp., utilisent le glucose de façon oxydative seulement.

7.5.6.3 Arginine-dihydrolase, lysine-décarboxylase et ornithine-décarboxylase

Ensemencer 1 tube de chacun des 3 milieux d'acides aminés et 1 tube témoin sans acide aminé. (La réaction de l'arginine peut également être lue à partir du tube d'AGS : un culot acide (jaune) à partir de la fermentation du glucose signifie que l'isolat est négatif pour l'arginine-dihydrolase). Couvrir chaque tube avec 1 à 2 cm d'huile minérale stérile et incuber 4 jours à 35 °C. Examiner les tubes tous les jours. Une décarboxylation des acides aminés produit un pH alcalin et le milieu devient violet (positif). Une couleur jaune est causée par un produit acide de la fermentation du glucose (négatif). Les tubes témoins ne contenant aucun acide aminé devraient être jaunes. Un milieu d'une couleur violette dans les tubes témoins indique qu'il n'y a pas de croissance. La plupart des souches de *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont négatives à l'arginine-dihydrolase, positives à lysine-décarboxylase et positives à l'ornithine-décarboxylase. Certains *V.*

vulnificus et *V. parahaemolyticus* sont négatifs à l'ornithine-décarboxylase. De rares souches de *V. vulnificus* sont négatives à la lysine-décarboxylase.

7.5.6.4 Tolérance au sel

À partir de la culture de TSB, ensemer un tube de chacun des bouillons de tryptone 1 % qui contient 0, 1, 3, 6, 8 ou 10 % de NaCl (T₁N₀, T₁N₁, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀) et incubé pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Considérer seulement la croissance profuse comme positive. Les *Vibrio* spp. halophiles ne croissent pas dans un bouillon qui ne contient pas de NaCl, mais tous les *Vibrio* spp. croissent dans un bouillon à 3 % de NaCl. Diverses espèces possèdent différentes tolérances au sel qui peuvent être utilisées pour l'identification (voir tableau 2).

7.5.6.5 Croissance à 42 °C

Ensemencer un tube préchauffé de TSB qui contient 2 % de NaCl avec une petite anse d'une culture de 24 heures de TSB-2 % de NaCl. Incuber dans un bain-marie ou un incubateur à 42 °C pendant 24 heures. Considérer seulement la croissance profuse comme positive. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. vulnificus* croissent à 42 °C.

7.5.6.6 Test de Voges-Proskauer (VP)

Ensemencer un bouillon MR-VP qui contient du NaCl avec la croissance d'une gélose TSA en pente et incubé pendant 2 jours à 35 °C. Effectuer le test VP. *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. fluvialis* sont négatifs au VP.

7.5.6.7 Fermentation des hydrates de carbone

À partir de la croissance sur la gélose TSA en pente, ensemer un tube de chacun des hydrates de carbone suivants : saccharose, lactose, D-mannitol, mannose, arabinose et cellobiose. Préparer le milieu dans un bouillon de bromocrésol violet ou un milieu OF semi-solide, avec NaCl. Recouvrir le milieu avec de l'huile minérale stérile à une profondeur de 1 à 2 cm et incubé à 35 °C pendant 4 à 5 jours. La fermentation acide fait tourner le milieu au jaune. Vérifier les tubes tous les jours. Des souches occasionnelles de *V. vulnificus* sont négatives au mannitol. Consulter le tableau 2 pour l'interprétation des résultats.

7.5.6.8 Hydrolyse de l'urée

Tester l'hydrolyse présomptive de l'urée de *V. parahaemolyticus* en ensemençant les tubes ou les plaques de gélose d'urée de Christensen et en incubant à 35 °C pendant 18 heures. Les souches de *V. parahaemolyticus* varient dans leur capacité d'hydrolyser l'urée. On peut établir une corrélation entre l'hydrolyse de l'urée et certains groupes somatiques (O-antigène).

7.6 Caractéristiques de l'identification biochimique de *V. parahaemolyticus* et de *V. vulnificus*.

Les caractéristiques suivantes sont les caractéristiques présomptives de *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus*.

- a) Morphologie : Bâtonnet asporogène Gram négatif
- b) Apparence du TSI : *V. parahaemolyticus*, pente alcaline/culot acide, production de gaz négative, H₂S négatif;
V. vulnificus, pente alcaline (rarement acide)/culot acide, production de gaz négative, H₂S négatif

- c) Oxydation-fermentation : Oxydation et fermentation du glucose positives
- d) Cytochrome oxydase : réaction positive
- e) Test à l'arginine dihydrolase : réaction négative
- f) Test à la lysine décarboxylase : réaction positive (de rares *V. vulnificus* sont négatifs à la lysine-décarboxylase)
- g) Test de Voges-Proskauer : réaction négative
- h) Croissance à 42 °C : réaction positive
- i) Test d'halophilie : *V. parahaemolyticus*, 0 % de NaCl négatif; 3, 6 et 8 % de NaCl positif; 10 % de NaCl négatif ou faible;
V. vulnificus, 0 % de NaCl négatif; 3 et 6 % de NaCl positif; 8 % de NaCl négatif
- j) Fermentation du saccharose : réaction négative (de rares *V. vulnificus* sont positifs)
- k) Test de l'ONPG : *V. parahaemolyticus* négatif; *V. vulnificus* positif
- l) Fermentation de l'arabinose : *V. parahaemolyticus*, habituellement positif (variable); *V. vulnificus* négatif
- m) Sensibilité au composé O/129 : *V. parahaemolyticus* : sensible à 150 µg, résistant à 10 µg;
V. vulnificus : sensible à 10 et à 150 µg.

7.7 **Dénombrement**

Après l'identification des colonies suspectes, appliquer les tableaux NPP (voir tableau 4) pour le dénombrement final des espèces.

7.8 **Test de pathogénicité**

7.8.1 Le phénomène Kanagawa (optionel)

La réaction de Kanagawa démontre la présence d'une hémolysine directe thermostable spécifique (TDH) sur la gélose de Wagatsuma. Une réaction positive correspond étroitement avec le pouvoir pathogénique des isolats de *V. parahaemolyticus*. Les souches isolées à partir des fruits de mer sont habituellement négatives au Kanagawa.

Des globules rouges frais (moins de 24 h après le prélèvement), d'être humain ou de lapin, sont requis pour la préparation de la gélose de Wagatsuma.

Transférer une gouttelette d'une culture de TSB-3 % de NaCl de 18 heures sur des plaques en double de gélose de Wagatsuma bien séchée. Ensemencer ainsi plusieurs cultures, y compris des contrôles positifs et négatifs, selon un modèle circulaire sur la plaque. Incuber à 35 °C et observer les résultats en 24 heures.

Un test positif est une zone de bêta-hémolyse, c'est-à-dire, une zone transparente très bien définie sans globules rouges autour de la colonie, sans anneaux concentriques multiples ou verdissement.

Mesurer la zone d'hémolyse à partir du côté de la colonie jusqu'au côté extérieur de la zone. Des isolats qui produisent une zone claire d'hémolyse de 3 mm ou plus sont considérés comme phénomènes de Kanagawa positifs et sont présumés être pathogéniques. Des isolats qui

produisent des zones claires d'hémolyses inférieures à 3 mm peuvent être faiblement pathogéniques et devraient être testés dans des essais à l'anse iléale de lapin (8.32).

Note : Les résultats doivent être lus dans les 24 heures, autrement ils ne sont pas valides.

7.9 Sérologie

Identification sérologique de *V. parahaemolyticus*

La détermination des sérotypes somatiques (O) et capsulaires (K) (voir tableau 3) de *V. parahaemolyticus* n'est pas requise pour l'identification. Les antisérums de sérotypie sont difficiles à obtenir.

Méthode :

7.9.1 Ensemencer 2 géloses en pente de TSA-2 % de NaCl; incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures.

7.9.2 Antigène somatique (O)

- a) Préparation : Laver la croissance d'une gélose en pente de TSA-2 % NaCl avec une solution qui contient 2 % de NaCl et 5 % de glycérol; transférer dans un tube à centrifuger autoclavable. Autoclaver la suspension à 121 °C pendant une heure. Centrifuger la suspension à 4000 tr/min pendant 15 minutes. Remettre en suspension les cellules concentrées dans une solution de 2 % de NaCl. Une suspension dense est meilleure pour le test d'agglutination sur lame.
- b) Avec un crayon gras, diviser une lame de microscope en 12 compartiments égaux. Placer une petite goutte de la suspension dense dans chaque compartiment. Ajouter une goutte des 11 antisérums du groupe O aux compartiments séparés. Ajouter une goutte de la solution de 2 % de NaCl au 12^e compartiment (contrôle d'autoagglutination). Pencher doucement la lame pour mélanger tous les composants et balancer la lame d'avant en arrière pendant une minute. Une agglutination positive peut être lue immédiatement.
- c) Si aucune agglutination ne se produit avec aucun des 11 antisérums O, autoclaver la suspension à 121 °C de nouveau pendant une heure et refaire le test. Si l'agglutination est encore négative, les antigènes O de la culture sont inconnus.

7.9.3 Antigène capsulaire (K)

- a) Laver la croissance d'une gélose en pente TSA-2 % de NaCl avec une solution de 2 % de NaCl pour produire une suspension dense et lisse de cellules.
- b) Tester en premier à l'aide d'un antisérum K combiné (I à IX) et ensuite avec chacun des antisérums K monovalents à l'intérieur du groupe qui présentent une agglutination. (Chaque groupe comprend de 8 à 10 agglutinines flagellaires.)
- c) Sur la lame, marquer le nombre approprié de compartiments en plus du compartiment de contrôle. Placer une petite goutte de la suspension dense de cellules et ajouter une goutte de l'antisérum K approprié aux compartiments individuels. Ajouter une goutte de la solution de 2 % de NaCl au contrôle d'autoagglutination. Pencher doucement la lame pour mélanger les composants et balancer la lame d'avant en arrière pendant une minute. Une agglutination positive peut être lue immédiatement.

7.10 Conservation de la culture

Ensemencer le milieu semi-solide de conservation à long terme ou le milieu d'essai de mobilité en piquant profondément dans la gélose. Incuber pendant 24 heures à 35 °C. Serrer fermement les bouchons après

24 heures pour éviter la déshydratation. Il est également possible d'ajouter une couche d'huile minérale stérile à des cultures de 24 heures dans le milieu d'essai de mobilité. Entreposer les cultures à la température ambiante après la croissance initiale. NE PAS RÉFRIGÉRER. Pour la conservation à long terme, placer 1 ml de culture de TSB-2 % de NaCl de 6 à 12 heures et 0,1 ml de glycérol stérile dans des cryotubes stériles. Congeler immédiatement à -70 °C ou dans de l'azote liquide.

8. BIBLIOGRAPHIE

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Baross, J., and J. Liston. 1968. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific. *Nature* **217**:1263-1264.
- 8.3 Baumann, P. and R.H.W. Schubert. 1984. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae, pp. 516-550. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. J.G. Holt and N.R. Krieg (eds). Williams & Wilkins, Baltimore.
- 8.4 Brayton, P.R., R.B. Bode, R.R. Colwell, M.T. MacDonell, H.L. Hall, D.J. Grimes, P.A. West and T.N. Bryant. 1986. *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov., a new human pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **23**:104-108.
- 8.5 Cholera Working Group. 1933. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* **342**:387-390.
- 8.6 Davis, B.R., G.R. Fanning, J.M. Madden, A.G. Steigerwalt, H.B. Bradford, Jr., H.L. Smith, Jr. and D.J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* **14**:631-639.
- 8.7 DePaola, A., C.A. Kaysner and R.M. McPhearson. 1987. Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1181-1182.
- 8.8 Elliot, E.L., C. A. Kaysner, L. Jackson and M. L. Tamplin. 1998. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. In: *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 9. Published by AOAC International, Gaithersburg. MD.
- 8.9 Ewing, W.H., K.M. Tomfohrde and P.J. Naudo. 1979. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and certain related vibrios: an outline of methods. *Species* **2**:10-22.
- 8.10 Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai, and T. Ueho. 1951. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **35**:11-12.
- 8.11 Furniss, A.L., J.V. Lee, and T.J. Donovan. 1978. The vibrios. Public Health Service Monograph Series No. 11, Her Majesty's Stationery Office, London.
- 8.12 Grimes, D.J., J. Stemmler, H. Hada, E.B. May, D. Maneval, F.M. Hetrick, R.T. Jones, M. Stoskopf, and R. R. Colwell. 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecol.* **10**:271-282.
- 8.13 Hagen, C.J., E.M. Sloan, G.A. Lancette, J.T. Peeler and J.N. Sofos. 1994. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various seafoods with two enrichment broths. *J. Food Prot.* **57**:403-409.
- 8.14 15. Hickman, F.S., J.J. Farmer, III, D.G. Hollis, G.R. Fanning, A.G. Steigerwalt, R.E. Weaver, and D.J. Brenner. 1982. Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **15**:395-401.

- 8.15 Honda, T., Y. Ni and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* **56**:961-965.
- 8.16 Kaper, J., E.F. Remmers and R.R. Colwell. 1980. A presumptive medium for identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* **43**:956-958.
- 8.17 MacDonell, M.T., F.L. Singleton and M.A. Hood. 1982. Diluent decomposition of use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:423-427.
- 8.18 Massad, G. and J.D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2262-2264.
- 8.19 Nishibuchi, M., S. Doke, S. Toizumi, T. Umeda, M. Yoh and T. Miwatani. 1988. Isolation from a coastal fish of *Vibrio hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2144-2146.
- 8.20 Oliver, J.D. 1989. *Vibrio vulnificus*, pp. 569-600. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. M.P. Doyle (ed). Marcel Dekker, New York.
- 8.21 Pavia, A.T., J.A. Bryan, K.L. Maher, T.R. Hester, Jr. and J.J. Farmer, III. 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann. Intern. Med.* **111**:85-86.
- 8.22 Sakazaki, R. 1979. *Vibrio infections*, pp. 173-209. In: *Foodborne Infections and Intoxications*, 2nd ed. H. Riemann and R. Bryan (eds). Academic Press, New York.
- 8.23 Sakazaki, R., and T. Shimada. 1986. *Vibrio* species as causative agents of foodborne infections, pp. 123-151. In: *Developments in Food Microbiology--2*. R.K. Robinson (ed). Elsevier Applied Science, New York.
- 8.24 Shantera, W.X., J.M. Johnston, B.R. Davis and P.A. Blake. 1983. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized *Vibrio* species. *Ann. Intern. Med.* **99**:169-171.
- 8.25 Shimada, T., R. Sakazaki and M. Oue. 1987. A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.* **62**:452-456.
- 8.26 Simpson, L.M., V.K. White, S.F. Zane and J.D. Oliver. 1987. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **55**:269-272.
- 8.27 Sloan, E.M., C.J. Hagen, G.A. Lancette, J.T. Peeler and J.N. Sofos. 1992. Comparison of five selective enrichment broths and two selective agars for recovery of *Vibrio vulnificus* from oysters. *J. Food. Prot.* **55**:356-359.
- 8.28 Smith, Jr., H.L. and K. Goodner. 1958. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J. Bacteriol.* **76**:662-665.
- 8.29 Tamplin, M.L., A.L. Martin, A.D. Ruple, D.W. Cook and C.W. Kaspar. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1235-1240.
- 8.30 Tisan, D.L. 1999. *Vibrio*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover (eds.), ASM Press, Washington, D.C.
- 8.31 Twedt, R.M. 1989. *Vibrio parahaemolyticus*, pp. 543-568. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. M.P. Doyle (ed). Marcel Dekker, New York.

- 8.32 Twedt, R.M., J.T. Peeler and P.L. Spaulding. 1980. Effective ileal loop dose of Kanagawa-positive *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. Environ. Microbiol. **40**:1012-1016.
- 8.33 West, P.A. and R.R. Colwell. 1984. *Identification and classification of Vibrionaceae--an overview*, pp. 285-363. In: *Vibrios in the environment*. R.R. Colwell (ed). John Wiley & Sons, New York.
- 8.34 West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant and R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environment. Int. J. Syst. Bacteriol. **36**:531-543.

Tableau 1. Réactions^a de certains *Vibrio* spp. et microorganismes connexes dans des milieux gélosés de différenciation en tube

Microorganisme	KIA ^b		TSI ^b		AGS ^b	
	Pente	Culot	Pente	Culot	Pente	Culot
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K rare)	A	K	a
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A rare)	A	K	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A	K	
<i>V. vulnificus</i>	K ou A	A	K (A rare)		K	A
<i>A. hydrophila</i> ^c	K ou A	A	K ou A	A	K	K
<i>P. shigelloides</i>	K ou A	A	K ou A	A	ND	ND

^a K = alcalin A = acide a = légèrement acide; ND = non déterminé.

^b Aucun des *Vibrio* spp. énumérés ne produit de sulfure d'hydrogène dans les milieux KIA, TSI ou AGS, ou de gaz à partir du glucose en quantités détectables dans les milieux KIA, TSI ou AGS.

^c Certains *Aeromonas* spp. peuvent produire du gaz à partir du glucose dans ces milieux.

Tableau 2. Caractéristiques biochimiques des *Vibrionaceae* choisis

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
*Gélose TCBS	J	AC	G	G	G
Gélose mCPC	P	AC	AC	AC	J
Milieu AGS	Ka	Ka	KA	KA	KA
Croissance dans :					
NaCl 0 %	+	-	+	-	-
NaCl 3 %	+	+	+	+	+
NaCl 6 %	-	+	-	+	+
NaCl 8 %	-	-	-	+	-
NaCl 10 %	-	-	-	-	-
Croissance à 42 °C	+	nd	+	+	+
Acide provenant de :					
Saccharose	+	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	V	+
Lactose	-	-	-	-	+
Arabinose	-	+	-	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	-	+	+	V
Oxydase	+	+	+	+	+
ONPG	+	-	+	-	+
Voges-Proskauer	V	-	-	-	-
Arginine-dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine-décarboxylase	+	-	+	+	+
Ornithine-	+	-	+	+	+
Sensibilité à :					
10 µg de O/129	S	nd	S	R	S
150 µg de O/129	S	nd	S	S	S
Gélatinase	+	-	+	+	+
Uréase	+	V	-	-	V

*Abréviations : TCBS = gélose au thiosulfate, au citrate, aux sels biliaires et au saccharose; mCPC = gélose de cellobiose-polymyxine B-colistine; AGS = gélose d'arginine-glucose en pente;

J = jaune; G = vert; P = violet; AC = aucune croissance; nd = pas fait; K = alcalin; A = acide; a = légèrement acide;

+ = 80 % ou plus de souches positives; - = 80 % ou plus de souches négatives (moins de 20 % de souches positives); V = réaction variable selon l'espèce ou la souche; S = sensible; R = résistant;

Réaction dans la gélose à l'arginine et au glucose en pente (AGS) : pente, culot; toutes les souches testées ont été négatives au sulfure d'hydrogène et au gaz. ONPG : hydrolyse de O-nitro-β-D-galactopyranoside par β-galactosidase.

Réactions biochimiques tirées du BAM (8.8).

Tableau 3. Schéma antigénique du *V. parahaemolyticus*^(a)

Groupe O	Antigène K
1	1, 25, 26, 32, 38, 41, 56, 58, 64, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 7, 29, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 59, 65
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67
5	15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	18, 46
7	19
8	20, 21, 22, 39, 70
9	23, 44
10	19, 24, 52, 66, 71
11	36, 40, 50, 51, 61

^a De R.M. Twedt (8.31)

Tableau 4. Pour 3 tubes chacun à 0,1, 0,01 et 0,001 g d'inoculat, les NPP par gramme et les intervalles de confiance de 95 %.

Tubes pos.			NPP/ g	Lim. conf.		Tubes pos.			NPP/g	Lim. conf.	
0,10	0,01	0,001		Bas	Haut	0,10	0,01	0,001		Bas	Haut
0	0	0	<3,0	--	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	--

Source : BAM (8.8)

PARTIE 2 : DÉTECTION DE *VIBRIO CHOLERAE*

1. APPLICATION

La méthode peut être utilisée pour la détection de *Vibrio* spp. dans les aliments afin de déterminer la conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la *Loi sur les aliments et drogues*.

2. DESCRIPTION

Vibrio cholerae est un anaérobie facultatif Gram négatif en forme de bâtonnet ou de bâtonnet courbe, positif à l'oxydase. Contrairement à la plupart des *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae* est un non-halophile, c'est-à-dire que le milieu de croissance ne requiert pas de chlorure de sodium additionnel. L'espèce est constituée de plusieurs groupes et sous-groupes somatiques (O) antigéniques.

3. PRINCIPE

La détection de *Vibrio cholerae* se fait en trois étapes successives : i) enrichissement en milieu sélectif, ii) cultures sur géloses d'isolement et identification présomptive et iii) confirmation par des tests biochimiques, sérologiques et de toxigénicité. Cette méthode s'inspire d'une procédure publiée dans le *Bacteriological Analytical Manual (BAM)* (8.7).

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT SPÉCIAL

Les milieux et réactifs suivants (1 à 24) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 3 et la référence 8.1 pour la formulation des milieux individuels.

La teneur en sel des milieux suit entre crochets [%].

- 1) Eau peptonée alcaline (APW) [1 %]
- 2) Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (optionnelle) [0,85 %]
- 3) Gélose au thiosulfate, au citrate et aux sels biliaries (TCBS) [1 %]
- 4) Gélose cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) (optionnelle) [2 %]
- 5) Gélose tryptone et sel (T₁N₁) (1 % de tryptone et 1 % de NaCl) OU gélose T₁N₂ (1 % de tryptone et 2 % de NaCl) OU gélose trypticase soja avec une concentration totale de 2 % de chlorure de sodium
- 6) Bouillon tryptone 1 % (aucun NaCl) (T₁N₀) et bouillon tryptone 1 % avec 3 % de NaCl (T₁N₃) OU gélose gélatine (GA) [0 %] et gélose gélatine avec 3 % de NaCl (GS)
- 7) Gélose aux trois sucres et au fer (TSI) OU gélose de Kligler au fer en pentes [0,5 %]

- 8) Bouillon de Hugh-Leifson glucosé [3 %] OU milieu OF glucosé (semi-solide) [0,5 %]
- 9) Bouillon d'infusion de coeur (HI) [0,5 %]
- 10) Gélose d'infusion de coeur (HI) [0,5 %] ou gélose d'infusion coeur-cerveille (BHI) [0,5 %] ou équivalent
- 11) Plaques de gélose Mueller-Hinton [0 %]
- 12) Gélose trypticase soja (TSA) [0,5 %]
- 13) Globules rouges de mouton
- 14) Globules rouges de poulet
- 15) Solutions de coloration de Gram
- 16) Solution saline physiologique
- 17) Réactif à l'oxydase ou des bandelettes de test vendues commercialement
- 18) Bouillon MR-VP [0 %] et réactifs VP
- 19) Galeries d'identification API 20E ou équivalent
- 20) Cultures témoins positives et négatives (ATCC ou équivalent)
- 21) Antisérums
- 22) Phage IV et phage V E1 Tor (optionnel)
- 23) Disques d'antibiotique polymyxine B, 50 unités
- 24) Disques du composé Vibriostat O/129, 10 et 150 µg
- 25) Stomacher, mélangeur ou équivalent
- 26) Bain-marie, 35° C
- 27) Incubateurs, 35 °C, 42 °C; 39-40 °C (optionnel)

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs et les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à $35 \pm 1,0$ °C. De même, des températures plus basses à 30 ou à 25 °C peuvent être à $\pm 1,0$ °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à $\pm 0,5$ °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les microorganismes qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, conserver les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (4 à 8 °C) ou au congélateur, selon la nature du produit. Laisser décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou dans des conditions (température et délai) où il n'y aura ni croissance, ni mort microbienne.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible après leur arrivée au laboratoire afin de minimiser la prolifération et de réduire le potentiel de vibrios viables, mais non cultivables (VBNC).

7.2 Préparation de l'analyse

- 7.2.1 Avoir en main de l'eau peptonée alcaline (APW) stérile aux bonnes concentrations.
- 7.2.2 Pour la préparation de l'échantillon, peser de façon aseptique 25 g de l'échantillon dans une jarre de mélangeur stérile tarée de 500 ml ou dans un sac à stomacher. Couper les échantillons volumineux

en plus petites pièces avant de mélanger. Ajouter 225 ml d'APW à la jarre ou au sac à stomacher et mélanger pendant 2 min à la vitesse maximale.

Pour les huîtres seulement, particulièrement celles fraîchement récoltées dans des eaux tempérées, préparer un composite de 10 à 12 animaux, incluant le jus; mélanger au mélangeur, non au stomacher. Mélanger 50 g de ce composite avec 450 ml d'APW. Verser 250 ml (g) de ce mélange dans un autre contenant stérile. Les replicats pour les échantillons d'huîtres sont incubés à différentes températures. (Voir 7.4 ci-dessous)

7.3 Préparation des dilutions

7.3.1 L'isolement de *Vibrio* spp. spécifiques à partir d'échantillons qui contiennent des concentrations élevées de bactéries entériques peut se révéler difficile à cause de la prolifération. Pour les légumes, les eaux d'estuaire ainsi que d'autres échantillons environnementaux pour lesquels on prévoit un nombre élevé de bactéries, diluer les échantillons mélangés à une dilution finale de 1:100 et procéder comme d'habitude. Par exemple, prendre 25 ml d'échantillon mélangé et ajouter à 225 ml d'APW.

7.3.2 Pour les échantillons de fruits de mer, particulièrement les huîtres, préparer également des dilutions par facteur de 10 de l'échantillon de fruits de mer mélangé dans 9 (ou 90) ml de blancs d'APW (dilutions 1:100 et 1:1000) et procéder comme d'habitude. Préparer 2 ensembles de tubes de dilutions pour les huîtres. Les dilutions sont réalisées pour réduire la compétition des autres vibrios.

7.3.3 Optionnel :

Des dilutions peuvent également être utilisées pour analyser *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Si l'échantillon doit être testé pour les trois espèces de *Vibrio* (et autres), utiliser un échantillon assez gros pour ensemercer tous les milieux requis et préparer l'homogénéat dans de l'APW ou une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,2 à 7,5. Par exemple, si l'échantillon doit être analysé pour *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, homogénéiser un échantillon de 50 g avec 450 ml d'APW. Placer 250 ml (g) de l'homogénéat d'APW dans un contenant stérile et suivre la méthode pour le *V. cholerae*. (Si du PBS est utilisé durant l'homogénéisation, transférer 250 ml (g) d'homogénéat de PBS dans 2250 ml d'APW.) Si un NPP doit être déterminé avec le reste de l'échantillon, préparer des dilutions dans du PBS, à pH de 7,2 à 7,5, ensemercer des tubes NPP d'APW et incuber les tubes à 35 °C. Ces tubes serviront de tubes d'enrichissement NPP pour *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, ainsi que pour *V. cholerae* dans des matériaux qui peuvent avoir une microflore naturelle élevée. À partir de l'APW, ensemercer des plaques de milieux sélectifs à 6 à 8 heures pour *V. cholerae* et à 18 à 24 heures pour *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. Voir la partie 1 pour l'identification des *Vibrio* spp. halophiles. Pour les échantillons d'huîtres à analyser pour les trois espèces de *Vibrio*, utiliser des échantillons d'au moins 75 g, car deux portions de 250 ml (g) de l'homogénéat d'APW sont incubées pour l'analyse de *V. cholerae* (une à 35 °C et une à 42 °C).

7.4 Ensemencement et incubation

7.4.1 Laisser les solutions d'échantillons, y compris des homogénats et des dilutions d'aliments congelés ou autrement traités, dans des jarres ou des sacs à stomacher ou verser dans des flacons Erlenmeyer stériles de 500 ml fermés sans serrage et incuber les jarres, sacs, flacons et dilutions pendant 6 à 8 heures à 35 °C. Ensemencer les inocula sur des géloses au thiosulfate, au citrate et aux sels biliaires (TCBS) et sur des géloses cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) (optionnel) (voir 7.4.2 ci-dessous) et réincuber les bouillons d'enrichissement pour un temps d'incubation total de 18 à 24 heures. Ensemencer les bouillons d'enrichissement de 18-24 heures sur des géloses d'isolement.

Exception : Incuber le second échantillon d'homogénat d'huîtres et un ensemble de dilutions à 42 °C pendant 6 à 8 heures.

Note : La gélose mCPC est optionnelle; elle peut être utilisée en plus de la gélose TCBS. Le biotype classique *V. cholerae* est inhibé sur la gélose mCPC par la polymyxine B.

7.4.2 Après incubation, et **sans agiter** le contenant d'échantillon, transférer une anse de 3 à 5 mm de l'inoculum de la pellicule (croissance de surface) sur la gélose TCBS et optionnellement sur la gélose mCPC. Incuber la gélose TCBS pendant 18 à 24 heures à 35 °C et la gélose mCPC pendant 18 à 24 heures à 40 °C.

7.5 Identification

7.5.1 Examiner les plaques pour les caractéristiques des colonies décrites ci-dessous. Prélever soigneusement 3 colonies suspectes ou plus de chaque plaque, strier chacune pour isolement sur T₁N₁, T₁N₂ ou sur la gélose trypticase soja (concentration totale de 2 % de NaCl), et incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Un ensemencement en stries pour isolement sur un milieu non sélectif peut être nécessaire pour s'assurer de la pureté des colonies avant d'effectuer des tests biochimiques. Les géloses gélatine (GA) et gélatine -sel (GS) peuvent également être inoculées avec le même inoculum (voir 7.5.2.2 b).

7.5.1.1 Gélose au thiosulfate, au citrate, aux sels biliaires et au saccharose (TCBS) :

Après incubation de 18 à 24 heures sur gélose TCBS, *V. cholerae* (E1 Tor et classique) (et autres vibrios fermentant le saccharose) présente des colonies jaunes, lisses, de dimension moyenne avec des centres opaques et des pourtours translucides. Les vibrios qui ne fermentent pas le saccharose sont d'une couleur verte.

7.5.1.2 Gélose cellobiose-polymyxine B-colistine modifiée (mCPC) :

Les colonies de *V. cholerae* E1 Tor sont de couleur verte à violette (non-fermenteur de cellobiose). *V. vulnificus* produit des colonies jaunes aplaties avec des centres opaques et des pourtours translucides. La plupart des autres *Vibrio* spp. ne croissent pas facilement sur la gélose CPC ou la gélose mCPC.

7.5.2 **Distinction entre les vibrios suspects et les non-vibrios :**

7.5.2.1 La gélose aux trois sucres et au fer en pente (TSI) ou la gélose de Kligler au fer en pente (KIA) et la gélose à l'arginine et au glucose en pente (AGS) :

Ensemencer les colonies individuelles sur un milieu AGS et soit sur un milieu TSI ou KIA en piquant le culot et en striant la pente. Incuber les géloses en pente faiblement bouchées ou fermées pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Ces milieux sont recommandés parce que les réactions permettent une différenciation présomptive précoce entre la plupart des *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* et autres bactéries (voir tableau 5).

7.5.2.2 **Tolérance au sel :**

a) Bouillon de 1 % de tryptone (tryptophane) (T₁N₀) et bouillon à 3 % de NaCl (T₁N₃) :

Ensemencer des colonies individuelles dans des bouillons T₁N₀ et T₁N₃ et incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Réincuber les tubes sans croissance pour un autre 18 à 24 heures. *V. cholerae* et *V. mimicus* croîtront dans T₁N₀ et T₁N₃. Certaines espèces bactériennes non-vibrio produisant des réactions semblables à celles de *V. cholerae* dans les milieux TSI et KIA ne croîtront pas dans T₁N₃. La plupart des *Vibrio* spp., y compris certains *V. cholerae* non O1, croîtront dans T₁N₃ seulement.

Alternativement :

b) Gélose gélatine (GA) et gélose gélatine avec 3 % de NaCl (GS) :

Les géloses GA et GS peuvent être utilisées pour tester les isolats pour la tolérance au sel. Diviser les plaques en huit secteurs. Ensemencer une ligne droite au centre d'un secteur de chacune des plaques de GA et de GS avec chaque isolat. Incuber à 35 °C pendant 18 à 24 heures. *V. cholerae* et *V. mimicus* croîtront sur les deux plaques parce qu'ils ne requièrent pas de sel. Les *Vibrio* spp. halophiles croîtront seulement sur la plaque de GS. Pour lire la réaction à la gélatinase, tenir la plaque au-dessus d'une surface noire. Un halo opaque sera présent autour de la croissance des organismes positifs à la gélatinase.

7.5.2.3 Test d'oxydation/fermentation :

Ensemencer deux tubes de bouillon de Hugh-Leifson glucosé ou d'un milieu glucosé OF (semi-solide) avec la croissance à partir d'une colonie isolée. Recouvrir le milieu dans un tube avec de l'huile minérale stérile ou du Vaspar liquide (50 % de gel de paraffine, 50 % de paraffine) à une profondeur de 1 à 2 cm et incuber 1 à 2 journées ou plus à 35 °C. L'acidité amène le colorant à changer du violet au jaune dans le bouillon Hugh-Leifson et de vert à jaune dans le milieu OF semi-solide. Les *Vibrio* spp. fermentent le glucose et produisent de l'acide oxydativement à partir du glucose. Les *Pseudomonas* spp., communément isolé à partir des fruits de mer par les méthodes d'enrichissement utilisées pour *Vibrio* spp., utilisent le glucose de façon oxydative seulement.

7.5.2.4 Test de l'oxydase :

Réaliser le test de l'oxydase sur la croissance de 18 à 24 heures à partir de gélose trypticase soja (TSA) ou autres milieux sans hydrates de carbone fermentables, tels que GA ou GS. Une méthode rapide et facile pour tester un grand nombre d'isolats est de placer un cercle de papier filtre dans une boîte de Pétri et de mouiller le papier filtre au complet avec quelques gouttes d'un réactif d'oxydase. À l'aide d'un bâtonnet de bois, un cure-dent stérile ou une anse de platine, prélever la croissance à partir de la plaque et toucher le papier humide. Les organismes positifs à l'oxydase feront virer le papier au violet ou au bleu foncé en dix secondes. Les *Vibrio* spp. pathogéniques sont positifs à l'oxydase (excepté pour le *V. metschnikovii*).

7.6 Identification et confirmation du *V. cholerae* O1, du *V. cholerae* non O1 et du *V. mimicus*

7.6.1 Lire les résultats de la gélose TSI ou KIA, AGS et de l'oxydation-fermentation, ainsi que des géloses T₁N₀ et T₁N₃ ou GA et GS.

7.6.2 Effectuer une coloration de Gram sur une culture du bouillon ou de gélose de 18 à 24 heures.

- 7.6.3 Les résultats des tests sur les isolats, pour lesquels les tests *V. cholerae* restants sérologiques et biochimiques devront être effectués, sont les suivants :
- a) bâtonnets à Gram négatif ou bâtonnets courbes
 - b) positifs au saccharose (jaune) sur la gélose TCBS [négative au saccharose (vert) pour *V. mimicus*]
 - c) négatifs au cellobiose (vert-violet) sur la gélose mCPC
 - d) croissance dans les bouillons T₁N₀ et T₁N₃ ou sur les plaques GA et GS
 - e) présentent des réactions caractéristiques (voir tableau 5) dans les géloses TSI, KIA et AGS
 - f) positifs à la gélatinase et à l'oxydase
 - g) produisent de l'acide à partir du glucose de façon oxydative et fermentative dans le bouillon de Hugh-Leifson glucosé ou le milieu OF glucosé semi-solide

7.7 Agglutination sérologique

- 7.7.1 Utiliser les antisérums diagnostiques du groupe O1 et sous-groupes Inaba (facteurs AC) et Ogawa (facteurs AB) pour sérotyper l'antigène O1 et les antisérums ou les anticorps monoclonaux pour sérotyper l'antigène O139 pour identifier le sérotype O139. Utiliser des cultures de 16 à 24 heures à partir de la gélose TSA. Inclure les cultures positives et négatives et les contrôles salins pour chaque antisérum utilisé. Suivre les directives comprises avec les antisérums. Des gouttes de 10 µL suffisent pour le test. Parce que les antigènes de différentes espèces peuvent être reliés, les tests biochimiques doivent être complétés avant qu'un isolat puisse être confirmé comme étant *V. cholerae* O1 ou non O1.

Note : Des anticorps monoclonaux sont disponibles, mais il y a des réactions croisées avec les bactéries d'autres espèces pour les anti-B et les anti-C. Utiliser des sérums polyclonaux et/ou des anticorps monoclonaux à l'antigène A du complexe O1.

- 7.7.2 Les cultures qui agglutinent dans l'antisérum du groupe O1 et non dans la solution physiologique saline sont des *V. cholerae* groupe O1 si les réactions biochimiques confirment l'isolat comme du *V. cholerae*.
- 7.7.3 Les cultures qui agglutinent dans cet antisérum spécifique de groupe peuvent être sous-typées avec des anticorps Inaba et Ogawa.
- 7.7.4 Les cultures qui agglutinent dans l'antisérum poly (groupe O1) et dans les antisérums Inaba et Ogawa ont les trois facteurs (A, B et C) et sont du sérotype Hikojima.
- 7.7.5 Les cultures qui agglutinent dans l'antisérum poly mais non dans l'antisérum Inaba ou Ogawa ne peuvent pas être typées en utilisant ces antisérums.

7.7.6 Les cultures confirmées biochimiquement comme étant *V. cholerae* et qui n'agglutinent pas dans l'antisérum du groupe O1 sont des *V. cholerae* non O1. Tester de telles cultures avec l'antisérum O139.

7.7.7 Les cultures qui agglutinent dans l'antisérum du groupe O1 et dans les solutions salines ne peuvent pas être typées. Toutefois, l'utilisation d'un milieu de culture plus riche, tel qu'une gélose infusion de coeur (HI) ou une gélose BHI, peut éliminer cette autoagglutination.

7.8 Réactions biochimiques supplémentaires

Pour les autres tests biochimiques, les tests de sensibilité au composé O/129, de croissance à 42 °C et d'ONPG, ainsi que des directives spécifiques pour effectuer ces tests, voir la partie 1, section 7.5 et le tableau 3. Les formulations pour les milieux biochimiques devraient comprendre au moins 2 % de NaCl. Des galeries API peuvent être utilisées à la place de milieux traditionnels. Pour *V. cholerae*, utiliser une solution saline physiologique (0,85 % de NaCl) comme diluant.

7.9 Détermination du biotype classique et du biotype El Tor

On peut distinguer deux biotypes de *V. cholerae* du séro groupe O1 (classique et El Tor) à l'aide des méthodes suivantes (voir le tableau 6). Utiliser plus d'un test pour différencier les biotypes. Les méthodes les plus faciles sont la sensibilité à la polymyxine B, le test d'hémolysine et le test de Voges-Proskauer. Voir les descriptions ci-dessous.

7.9.1 Susceptibilité aux bactériophages

Cette méthode constitue une modification de celle décrite par Finkelseint et Mukerjee (8.9). Ensemencer le bouillon HI avec la souche à tester et incuber à 35 °C pendant 4 heures. À l'aide d'un écouvillon, étaler sur la surface d'une plaque de gélose de Muller-Hinton une culture du bouillon 4 heures afin d'obtenir une croissance bactérienne confluyente. Laisser les plaques absorber l'inoculum et placer une anse de la dilution appropriée du phage IV sur la surface de la gélose avec une anse de 3 mm. Observer la plaque après une nuit d'incubation à 35 °C. Les souches de biotype classique sont habituellement sensibles à ce bactériophage et vont lyser sur la plaque où le phage a été placé (indiqué par une zone claire). Les souches du biotype El Tor sont résistantes à ce bactériophage et ne seront pas lysées (indiqué par une croissance confluyente). Utiliser cette même méthode pour tester la sensibilité au phage V de El Tor.

7.9.2 Sensibilité à la polymyxine B :

Cette procédure est une modification d'une technique décrite par Han et Khie (8.11). À l'aide d'un écouvillon, étaler sur la surface d'une plaque de gélose de Mueller-Hinton une culture du bouillon HI 4 heures afin d'obtenir une croissance confluyente. Laisser les plaques absorber l'inoculum et placer un disque d'antibiotique de polymyxine B de 50 unités sur la surface du milieu. Inverser les plaques et incuber pendant 18 à 24 heures à 35 °C. Les souches de biotypes classiques présenteront une zone d'inhibition autour du disque (diamètre de 10 à 15 mm). Les souches du biotype El Tor croîtront jusqu'au bord du disque ou seront légèrement inhibées (diamètre de 7 à 8 mm).

Alternativement, utiliser une gélose TSA, GA ou GS à la place de la gélose de Mueller-Hinton.

Note : Si l'isolat a été prélevé à partir du milieu mCPC, il est résistant à la polymyxine B.
--

7.9.3 Test d'hémolysine :

Mélanger des volumes égaux (0,5 ou 1 ml) de culture de bouillon HI de 24 heures et une suspension saline de 5 % de globules rouges de mouton. Préparer des mélanges similaires avec une portion

de culture qui a été chauffée pendant 30 minutes à 56 °C. Utiliser des souches hémolytiques et non hémolytiques connues de *V. cholerae* comme témoins. Incuber les mélanges pendant 2 heures dans un bain-marie à 35 °C, puis réfrigérer pour la nuit à 4-5 °C. Examiner les tubes pour une hémolyse. Une centrifugation à faible vitesse peut aider à la détection de la lyse des cellules. La plupart des souches EI Tor lyseront les globules rouges. La portion chauffée de la culture ne devrait produire aucune hémolyse parce l'hémolyse est thermolabile. Les biotypes classiques de *V. cholerae* et certaines souches du biotype EI Tor ne lyseront pas les globules rouges.

Alternativement, ensemercer l'inoculum par piqûre sur des plaques de gélose au sang contenant 5 % de globules rouges de mouton. Incuber à 35 °C pendant 24 heures et vérifier pour la présence d'une bêta-hémolyse autour des colonies.

7.9.4 Agglutination de globules rouges de poulet :

Préparer une suspension bactérienne dense et laiteuse dans une solution saline physiologique à partir d'une culture TSA de 18 à 24 heures. Sur une lame de verre propre, mélanger une anse de globules rouges de poulet lavé (2,5 % dans une solution saline physiologique) avec une suspension de la culture bactérienne à tester. Une agglutination apparente des globules rouges indique la présence du biotype EI Tor. Habituellement, les souches classiques n'agglutinent pas les globules rouges. Effectuer des contrôles positifs et négatifs.

7.9.5 Test de Voges-Proskauer (VP) :

Effectuer le test dans le bouillon MR-VP après une incubation de 18 à 24 heures à 22 °C. Les souches du biotype EI Tor sont habituellement positives; les souches classiques sont négatives.

7.10 Caractéristiques minimales pour l'identification biochimique de *V. cholerae*

Les caractéristiques suivantes sont présomptives pour *V. cholerae* :

- a) Morphologie : bâtonnet ou bâtonnet courbe asporogène Gram négatif
- b) Apparence du TSI ou du KIA : pente acide/culot acide, production de gaz négative, H₂S négatif
- c) Test de fermentation : fermentation et oxydation du glucose positives
- d) Cytochrome-oxydase : réaction positive
- e) Test à l'arginine-dihydrolase : réaction négative
- f) Test à la lysine-décarboxylase : réaction positive
- g) Test de Voges-Proskauer : biotype EI Tor positif, biotype classique négatif; *V. mimicus* réaction négative
- h) Croissance à 42 °C : réaction positive
- i) Test d'halophilie : 0 % de NaCl positif; 3 % de NaCl positif; 6 % de NaCl habituellement négatif. Certaines souches de *V. cholerae* non O1 peuvent ne pas croître dans 0 % de NaCl.

- j) Fermentation du saccharose : réaction positive (négative pour *V. mimicus*)
- k) Test de l'ONPG : réaction positive
- l) Fermentation de l'arabinose : réaction négative
- m) Sensibilité au composé O/129 : sensible à 10 et à 150 µg du composé O/129.

8. BIBLIOGRAPHIE

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Baselski, V., R. Briggs and C. Parker. 1977. Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. *Infect. Immun.* **15**:704-712.
- 8.3 Baumann, P. and R.H.W. Schubert. 1984. Section 5. *Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae*, pp. 516-550. *In* : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. J.G. Holt and N.R. Krieg (eds). Williams & Wilkins, Baltimore.
- 8.4 Cholera Working Group. 1933. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* **342**:387-390.
- 8.5 Davis, B.R., G.R. Fanning, J.M. Madden, A.G. Steigerwalt, H.B. Bradford, Jr., H.L. Smith, Jr. and D.J. Brenner. 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* **14**:631-639.
- 8.6 DePaola, A., C.A. Kaysner and R.M. McPhearson. 1987. Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1181-1182.
- 8.7 Elliot, E.L., C. A. Kaysner, L. Jackson and M. L. Tamplin. 1998. *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. *In* : Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 9. Published by AOAC International, Gaithersburg. MD.
- 8.8 Ewing, W.H., K.M. Tomfohrde and P.J. Naudo. 1979. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and certain related vibrios : an outline of methods. *Species* **2**:10-22.
- 8.9 Finkelstein, R.A. and S. Mukerjee. 1963. Hemagglutination : a rapid method for differentiating *Vibrio cholerae* and El Tor vibrios. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **112**:355-359.
- 8.10 Fujino, T., Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai and T.Ueho. 1951. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **35**:11-12.
- 8.11 Han, G.K. and T.D. Khie. 1963. A new method for the differentiation of *Vibrio comma* and *Vibrio* El Tor. *Am. J. Hyg.* **77**:184-186.

- 8.12 Iwanaga, M. and K. Yamamoto. 1985. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J. Clin. Microbiol.* **22**:405-408.
- 8.13 MacDonell, M.T., F.L. Singleton and M.A. Hood. 1982. Diluent decomposition of use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:423-427.
- 8.14 Madden, J.M., B.A. McCardell and J.G. Morris, Jr. 1989. *Vibrio cholerae*, pp. 525-542. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. M.P. Doyle(ed). Marcel Dekker, New York.
- 8.15 Massad, G., and J.D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2262-2264.
- 8.16 Sakazaki, R. 1979. *Vibrio infections*, pp. 173-209. In: *Foodborne Infections and Intoxications*, 2nd ed. H. Riemann and R. Bryan (eds). Academic Press, New York.
- 8.17 Sakazaki, R. and T. Shimada. 1986. *Vibrio species as causative agents of foodborne infections*, pp. 123-151. In: *Developments in Food Microbiology - 2*. R.K. Robinson (ed). Elsevier Applied Science, New York.
- 8.18 Shimada, T., R. Sakazaki and M. Oue. 1987. A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* O1. *J. Appl. Bacteriol.* **62**:452-456.
- 8.19 Smith, Jr., H.L. and K. Goodner. 1958. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J. Bacteriol.* **76** :662-665.
- 8.20 West, P.A. and R.R. Colwell. 1984. *Identification and classification of Vibrionaceae--an overview*, pp. 285-363. In: *Vibrios in the Environment*. R.R. Colwell (ed). John Wiley & Sons, New York.
- 8.21 West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant and R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:531-543.
- 8.22 Yamamoto, K., Y. Takeda, T. Miwatani and J.P. Craig. 1983. Evidence that a non-O1 *Vibrio cholerae* produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* **41**:896-901.

Tableau 5. Réactions^a de certains *Vibrio* spp. et microorganismes connexes dans des milieux gélosés de différenciation en tube

Microorganisme	KIA ^b		TSI ^b		AGS ^b	
	Pente	Culot	Pente	Culot	Pente	Culot
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K rare)	A	K	a
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A rare)	A	K	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A	K	A
<i>V. vulnificus</i>	K ou A	A	K (A rare)	A	K	A
<i>A. hydrophila</i> ^c	K ou A	A	K ou A	A	K	K
<i>P. shigelloides</i>	K ou A	A	K ou A	A	ND	ND

^a K = alcalin; A = acide; a = légèrement acide; ND = non déterminé.

^b Aucun des *Vibrio* spp. énumérés ne produit de sulfure d'hydrogène dans les milieux KIA, TSI ou AGS, ou de gaz à partir du glucose en quantités détectables dans les milieux KIA, TSI ou AGS.

^c Certains *Aeromonas* spp. peuvent produire du gaz à partir de glucose dans ces milieux.

Tableau 6. Différenciation des biotypes de *V. cholerae* O1^{a,b}

Test	El Tor	Classique
Sensibilité au phage V du biotype El Tor	+	-
Sensibilité au phage IV classique	-	+
Sensibilité à la polymyxine B, 50 unités	-	+
Hémolyse (érythrocytes de mouton)	v	-
Hémagglutination (érythrocytes de poulet)	+	-
Voges-Proskauer	+	-

^a De Baumann et Schubert (8.3) et de Madden et al. (8.14)

^b + = positif; - = négatif; v = souches variables