



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

ISOLEMENT DES *CAMPYLOBACTER* THERMOPHILES DANS LES ALIMENTS

D. Medeiros et L. Hofmann
Division de la recherche – Microbiologie
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Repère postal : 2204A2
Ottawa, K1A 0L2
Courriel : Lisa.Hofmann@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la détermination de la présence de bactéries thermotolérantes et microaérophiles du genre *Campylobacter* dans les aliments pour déterminer s'il y a conformité aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-46 datée de juillet 1998.

2. PRINCIPE

La méthode comporte quatre étapes. La manipulation initiale de l'aliment à l'étape de l'enrichissement varie selon le type d'aliment analysé.

2.1 Enrichissement en milieu sélectif

L'aliment est d'abordensemencé dans un milieu d'enrichissement sélectif conçu pour ralentir ou inhiber la multiplication de micro-organismes compétiteurs tout en favorisant la croissance des *Campylobacter*.

2.2 Formation de colonies sur des géloses sélectives

Les cultures enrichies de façon sélective sont ensemencées sur des géloses sélectives mises au point spécifiquement pour isoler et identifier les *Campylobacter*. Les colonies présumées sont identifiées avec plus de précision en examinant leur morphologie caractéristique et leur motilité au moyen d'un microscope à contraste de phase.

2.3 Purification

Les isolats sont purifiés sur une gélose sélective appropriée au sang ou au charbon.

2.4 Identification

Les *Campylobacter* présumés sont identifiés au moyen de réactions biochimiques, d'après leur tolérance à certains produits chimiques et antibiotiques et en fonction de leur plage de températures de croissance. Des réactions biochimiques permettent de déterminer plusieurs biotypes. Des méthodes de sérotypage qui permettent d'identifier les antigènes thermolabiles (méthode de Lior) et les antigènes thermostables (méthode de Penner) ont été mis au point, mais les antisérums nécessaires ne sont pas facilement disponibles. Lorsqu'il faut effectuer des sérotypages, les cultures peuvent être envoyées au Laboratoire de lutte contre la maladie de Santé Canada à Winnipeg (Manitoba). Diverses méthodes rapides d'identification de *Campylobacter* à base d'acide nucléique et d'anticorps sont disponibles dans le commerce (9.1, 9.2, 9.4).

3. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

4.1 Échantillonnage

Voir l'annexe B du volume 3.

4.1.1 Conservation et expédition

Il faut déposer les unités d'échantillonnage à conserver et à expédier dans des contenants hermétiques à 4 °C jusqu'au moment de l'analyse. Pour les échantillons de lait cru, ajouter a) de la cystéine à 5% ou b) du bisulfite de sodium à 0,01% et soit du thioglycolate de sodium à 0,15%, soit une atmosphère d'azote à 100%. Il faut garder congelées les unités d'échantillonnage de produits congelés.

4.1.2 Pour les échantillons environnementaux, suivre la méthode MFLP-41.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux et les réactifs suivants (1 à 10) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 et la référence 9.1 pour la formulation de chaque milieu.

- 1) Bouillon pour Brucella
- 2) Gélose semi-solide pour Brucella
- 3) Gélose de Preston (aussi appelée Base de gélose pour *Campylobacter*)
- 4) Gélose de Mueller-Hinton
- 5) Gélose au sang de Mueller-Hinton
- 6) Gélose au sang anaérobie de Wilkins-Chalgrén
- 7) Bouillon anaérobie de Wilkins-Chalgrén
- 8) Gélose pour *Campylobacter* avec charbon de bois, désoxycholate et supplément (CCDA) (Oxoid)
- 9) Milieu SIM
- 10) Réactifs pour nitrate [N(1-naphthyl)-éthylènediamine.2 HCl et acide sulfanilique]

- 11) Chacun des produits biochimiques suivants préparés dans une base de milieux semi-solides pour *Brucella* : 1 % de glucose, 1 % de nitrite, 1 % de glycine et 3,5% de chlorure de sodium
- 12) Bouillon d'enrichissement de Park et Sanders
- 13) Milieu pour la recherche rapide du H₂S (pour le biotypage)
- 14) Bandelettes d'essai pour l'oxydase ou réactif tétraméthylparaphénylènediamine·2 HCl
- 15) Mélange de gaz (10% de CO₂, 5% de O₂, 85% de N₂), sachet CampyPak 2 (BBL) ou trousse de production de gaz pour *Campylobacter* (Oxoid) ou Anaerocult C (Merck)
- 16) Disques d'acide nalidixique (30µg), disques de céfalotine (30µg) (Difco) ou bandelettes E-test (Oxoid)
- 17) Hippurate de sodium
- 18) Azote liquide
- 19) Diméthylsulfoxyde
- 20) Peroxyde d'hydrogène
- 21) Bandelettes à l'acétate de plomb
- 22) Détecteur de fuite sous vide (Electro-Technic Products)
- 23) Cryotubes
- 24) Témoin positif (ATCC ou l'équivalent)
- 25) Incubateur agitateur (37 °C et 42 °C)
- 26) Incubateur CO₂ (37 °C et 42 °C) (facultatif)

<p>NOTE: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être réglé à 35 +/-1,0 °C. De même, une température plus basse de 30 ou 25 °C peut-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 le micro-organisme que l'on cherche à isoler.</p>
--

- 27) Lames et lamelles de verre
- 28) Mélangeur, stomacher ou l'équivalent
- 29) Centrifugeuse réfrigérée de 16 000 X g.
- 30) Congélateur à basse température, -70 °C
- 31) Microscope à contraste de phase

6. MARCHE À SUIVRE

Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement.

Il faut exécuter l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

6.1 Manipulation des échantillons

6.1.1 Voir les points 4.1.1 et 4.1.2.

6.1.2 Analyser les échantillons le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire, parce que les souches de *Campylobacter* sont extrêmement sensibles à l'oxygène, en particulier à la température de la pièce. Les souches de *Campylobacter* sont également fragiles aux cycles gel-dégel et à la déshydratation.

6.2 Enrichissement

NOTE : Il faut toujours inclure une culture pure et un bouillon non ensemencé comme témoins positif et négatif respectivement afin d'assurer que l'on satisfait aux conditions appropriées d'incubation et que le bouillon n'est pas contaminé.

6.2.1 Échantillons frais de viande crue, de porc et de volaille : Découper l'échantillon en morceaux (0,3-0,5 cm³) et déposer 25 g d'échantillon dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon d'enrichissement sélectif de Park et Sanders. Incuber en microaérobiose (6.4) à 37 °C pendant 3 à 4 h. Transférer le flacon dans un incubateur à 42 °C en microaérobiose pendant 24 à 48 h. On peut aussi hausser la température de l'incubateur ou utiliser un incubateur programmable qui rajuste automatiquement la température après quatre heures. Agiter le contenu du flacon pendant toutes les étapes à une vitesse de 100 à 120 cycles/min. au moyen d'un incubateur agitateur (nécessaire à l'échange gazeux pendant l'enrichissement).

6.2.2 Lait : Verser 100 ml de lait dans une bouteille à centrifuger. Centrifuger à 16 000 x g pendant 20 min à 4 °C. Enlever la couche de matières grasses au moyen d'une spatule stérile et jeter les matières grasses et le liquide. Mettre le culot en suspension dans 100 ml de bouillon d'enrichissement sélectif de Park et Sanders et suivre la méthode d'incubation et d'ensemencement décrite en 6.2.1 et 6.3.

6.2.3 Coquillages et crustacés : Peser 25 g d'échantillon dans un bocal de mélangeur ou un sac de stomacher de 400 ml et passer au mélangeur ou au stomacher à faible vitesse pendant 30 sec. Transférer le contenu du bocal ou du sac dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon d'enrichissement de Park et Sanders et suivre la méthode d'incubation et d'ensemencement décrite en 6.2.1 et 6.3.

6.2.4 Aliments congelés : Après décongélation, découper l'échantillon en morceaux (0,3 à 0,5 cm³) et déposer 25 g dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon d'enrichissement de Park et Sanders et suivre la méthode d'incubation et d'enrichissement décrite en 6.2.1 et 6.3.

6.2.5 Échantillons d'écouvillonnage : Transférer chaque écouvillon dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de bouillon d'enrichissement de Park et Sanders et suivre la méthode d'incubation et d'enrichissement décrite en 6.2.1 et 6.3.

6.3 Ensemencement

Après 24 + 2 h et 48 + 2 h d'incubation, ensemencer deux anses de la culture sur une gélose CCDA et une gélose de Preston. Incuber les géloses à 37 °C jusqu'à 72 heures en microaérobiose.

6.4 Marche à suivre pour créer la microaérobiose

Les *Campylobacter* thermophiles sont des microaérophiles stricts et il faut en tenir compte dans les méthodes d'enrichissement et d'ensemencement. On utilise habituellement un mélange commercial de gaz comprenant 5% de O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂. Pour produire un milieu en microaérobiose, on peut suivre l'une des méthodes décrites ci-dessous, selon la disponibilité de l'équipement et du matériel.

6.4.1 Remplacement de l'air par un mélange de gaz comprenant 5% de O₂, 10% de CO₂ et 85% de N₂, ou utilisation d'enveloppes génératrices de gaz, comme la trousse GasPak (BBL) (disponible dans le commerce)

- 1) Déposer les flacons (jusqu'à trois) ou les sacs de stomacher contenant le bouillon d'enrichissement ou les plaques de gélose dans une jarre anaérobie ou une enceinte hermétique sans catalyseur. Évacuer l'air de la jarre ou de l'enceinte jusqu'à ce que la vide atteigne environ 610-635 mm ou 24-25 po de Hg. et remplir ensuite avec le mélange de gaz. Répéter toute l'opération au moins une fois. Les jarres ou enceintes peuvent ensuite être placées dans un incubateur agitateur afin de maximiser l'échange gazeux.
- 2) Si des jarres anaérobies et des enveloppes génératrices de gaz sont utilisées, il faut suivre les instructions du fabricant.
- 3) Les géloses peuvent être incubées dans un incubateur à CO₂ où le niveau de CO₂ est réglé à 10%.

6.5 Identification

Comme milieu de conservation pour les cultures ou comme milieu de base pour les analyses biochimiques, utiliser des tubes de bouillon pour *Brucella* supplémentés avec de la gélose à 0,15% à 0,2% et du rouge neutre à 0,002% (milieu semi-solide pour *Brucella*). Les tubes de ce milieu semi-solide peuvent être incubés en aérobiose. Ne pas serrer les bouchons de ces tubes pendant l'incubation en aérobiose. Puisque les *Campylobacter* se développent près de la surface du milieu (zone de 10 mm), ensemercer les cultures dans cette zone.

- 6.5.1 À partir de chacune des géloses sélectives, sélectionner une partie de trois colonies suspectes (lisses, convexes, translucides, incolores à couleur crème et très petites à 2-4 mm de diamètre ou souvent colonies étalées).
- 6.5.2 Examiner un montage humide de chaque colonie au moyen d'un microscope à contraste de phase. Les jeunes cellules de *Campylobacter* sont Gram-négatives, minuscules (0,2 à 0,8 µm de largeur sur 1,5 à 5 µm de longueur) et en forme de S. Leur motilité hélicoïdale est caractéristique. Les cellules de *C. jejuni* âgées de plus de 72 heures ou exposées à l'air prennent souvent la forme de coques. Pour la contre-coloration, le carbofuchsine est plus efficace que la safranine. Si l'on utilise ce dernier colorant, le temps d'exposition peut être prolongé à 3 minutes ou plus. On peut cependant omettre la coloration de Gram.

NOTE : L'aspect sur gélose, la morphologie cellulaire et la motilité sont des plus cruciaux dans l'identification de l'organisme.

- 6.5.3 Prélever une partie des mêmes colonies suspectes au moyen d'une anse ou d'une aiguille à inoculer et ensemercer sur plaque CCDA et une plaque de Mueller Hinton avec 5% de sang, avec chaque colonie occupant 1/5 des plaques. Incuber les plaques à 37 °C en microaérobiose pendant 1 à 2 jours et vérifier la pureté.

6.5.4 Épreuves d'identification

- a) Épreuve de la catalase : À l'aide d'une aiguille à inoculer, mélanger une partie d'une colonie de la plaque CCDA incubée récemment avec une goutte de peroxyde

d'hydrogène (H₂O₂) à 3 % sur une lame propre. (Ou déposer le H₂O₂ directement sur la culture, à condition d'avoir effectué d'abord tous les autres tests). L'apparition de bulles indique une réaction positive.

- b) Épreuve de l'oxydase : À l'aide d'une aiguille à inoculer, étaler une partie d'une colonie de la plaque CCDA incubée récemment sur une bandelette d'oxydase. L'épreuve de l'oxydase donne un résultat positif si la masse de cellules vire au violet foncé en 5 à 10 secondes.
- c) Résistance/sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine : Ensemencer une plaque de gélose au sang de Mueller-Hinton comme un tapis bactérien. Déposer sur la plaque un disque d'acide nalidixique (30 µg) et un autre de céfalotine (30 µg). Incuber les plaques en microaérobiose à 42 °C pendant 48 h. Après incubation, déterminer s'il y a une zone transparente (sans croissance) autour de l'un ou l'autre des deux disques. Une zone claire de ≤ 13 et 14 mm respectivement indique une résistance à l'acide nalidixique et à la céfalotine.

6.5.5 Épreuves additionnelles d'identification

- a) Utiliser la plaque de gélose au sang de Mueller-Hinton de l'étape 6.5.3 pour préparer une culture fraîche dans 50 ml de bouillon pour Brucella contenu dans un flacon de 250 ml. Incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h en microaérobiose. Cette culture sert à ensemencer les six tubes suivants pour les analyses biochimiques et les tests de croissance (6.5.6b).
- b) Pour chaque isolat, préparer un tube de chacun des six différents milieux semi-solides pour Brucella (glucose, nitrate, SIM, cystéine, glycine et NaCl) (voir section 10).
- c) Ensemencer tous les tubes avec une pipette Pasteur en déposant dans la partie supérieure du milieu (zone de 10 mm) plusieurs gouttes du bouillon de culture frais. Ne pas ensemencer le tube entier de haut en bas.
- d) Déposer une bandelette à l'acétate de plomb dans le tube de milieu à la cystéine. Replier le bout de la bandelette sur le col du tube et la maintenir en place avec le bouchon.
- e) Incuber tous les tubes en aérobiose ou en microaérobiose à 37 °C pendant 3 à 5 jours. Il ne faut pas serrer les bouchons pendant l'incubation.

6.5.5.1 Lecture des épreuves biochimiques

- a) Fermentation du glucose : Une réaction positive en milieu semi-solide au glucose pour Brucella se traduit par le jaunissement du milieu (acide avec l'indicateur au rouge de phénol).
- b) Épreuve de réduction du nitrate : Ajouter un volume égal (0,5 à 1,0 ml) des deux réactifs au nitrate dans un tube de milieu semi-solide au nitrate et mélanger. Le développement d'une couleur rouge en une minute indique une réaction positive pour la production de nitrite. Si aucune coloration ne se développe, ajouter une pincée de poudre de zinc. Le développement d'une coloration rouge avec la poudre de zinc indique une réaction négative. L'absence de couleur après l'ajout de poudre de zinc indique une réaction positive qui résulte de la réduction complète du nitrate en ammoniac.
[Note : a) La poudre de zinc peut devenir inactive avec le temps. Vérifier périodiquement l'activité au moyen d'un milieu au nitrate non ensemencé. Ajouter une pincée de poudre de zinc au milieu,

mélanger et incorporer les deux solutions de nitrate. Si la poudre est encore active, une coloration rouge se développera. b) Le nitrate peut être réduit chimiquement en nitrite dans un milieu pré-réduit sans qu'il y ait croissance microbienne. Vérifier chaque lot de milieu en ajoutant les deux réactifs d'essai au milieu non ensemencé. Éliminer le milieu si il y a une coloration rouge].

c) Épreuve du H₂S :

- 1) Milieu SIM : Le développement d'une coloration noire dans le milieu indique une forte production de H₂S.
- 2) Milieu semi-solide à la cystéine pour Brucella avec bandelette à l'acétate de plomb : Le noircissement de la bandelette à l'acétate de plomb indique qu'il y a production de H₂S. Les faibles producteurs de H₂S peuvent donner une réaction positive dans ce milieu sans qu'il en soit de même dans le milieu SIM, car ce dernier est moins sensible.

d) Épreuve de croissance en milieu semi-solide pour Brucella avec glycine à 1% et en milieu semi-solide pour Brucella avec NaCl à 3,5% : Examiner la croissance dans la partie supérieure du milieu (zone de 10 mm). Si la croissance n'est pas distinctive, rapporter comme "croissance négative".

6.5.6 **Autres épreuves pour différencier *C. jejuni* de *C. coli* et de *C. lari***

a) Hydrolyse de l'hippurate :

- 1) Déposer une anse d'une culture de 24 h prélevée sur une gélose au sang de Mueller Hinton dans une petite éprouvette à bouchon qui visse ou à bouchon de liège contenant 0,5 ml de solution stérile d'hippurate de sodium.
- 2) Incuber les tubes en aérobiose pendant au moins 3 heures à 37 °C, y compris un témoin non ensemencé.
- 3) Recouvrir de 0,2 ml d'une solution de ninhydrine. (Ne pas mélanger.)
- 4) Le développement d'une coloration violet foncé en dedans de 5 minutes indique une réaction positive. Si la coloration est légèrement bleuâtre, la réaction est considérée comme négative.

b) Épreuve au N-Oxyde de triméthylamine (TMAO) :

Tester les souches résistantes à l'acide nalidixique (*C. lari* présumé) dans le milieu de TMAO de la façon suivante :

- 1) Ajouter deux ou trois gouttes de culture en milieu semi-solide à la surface d'une éprouvette d'un milieu de TMAO et incuber en microaérobiose à 37 °C pendant 3 à 7 jours.
- 2) Observer pour une croissance qui se propage sous la surface du milieu de TMAO. Seul *C. lari* se développera en présence de TMAO.

6.5.7 Critères d'identification

Les cultures pures de *Campylobacter* présumées sont Gram-négatives et constituées de bâtonnets incurvés ou en forme de « S » (parfois spiralés). Ils sont motiles et se déplacent en un mouvement hélicoïdal caractéristique. Ils portent un seul flagelle polaire à l'une des extrémités ou aux deux. Les cellules de *C. jejuni* qui ont plus de 72 heures ou sont exposées à l'air prennent souvent une forme sphérique. Tous les *Campylobacters sp.* sont oxydase-positifs, non fermentaires et n'oxydent pas les glucides.

Voici les principales étapes à exécuter pour différencier *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* des autres espèces de *Campylobacter* (voir le tableau 1).

- a) On peut diviser les *Campylobacter* en deux groupes selon les résultats de l'épreuve de la catalase. Éliminer les cultures catalase-négatives car il s'agit de *C. sputorum* (*ss. sputorum*, *ss. bubulus* ou *ss. mucosalis*).
- b) Les *Campylobacter* catalase-positifs peuvent être subdivisés en deux groupes d'après la température de croissance et la sensibilité aux antibiotiques (acide nalidixique et céfalotine). (1) Les espèces catalase-positives thermotolérantes (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) se reproduisent à 42 °C, mais non à 25 °C. *C. jejuni* et *C. coli* sont sensibles à l'acide nalidixique, mais résistants à la céfalotine, tandis que *C. lari* est résistant aux deux antibiotiques. *C. lari* peut se développer dans le milieu TMAO (6.5.7), mais non *C. jejuni* et *C. coli*. (2) Les espèces catalase-positives non thermotolérantes (*C. fetus ss. fetus* et *C. fetus ss. venerialis*) se reproduisent à 25 °C, mais non à 42 °C. Elles sont résistantes à l'acide nalidixique et sensibles à la céfalotine.

6.5.8 Biotypage de C. jejuni, C. coli et C. lari

Le tableau suivant est provisoire :

Test	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>		<i>C. lari</i>	
	Biotype							
	I	II	III	IV	I	II	I	II
Hydrolyse de l'hippurate	+	+	+	+	-	-	-	-
Épreuve rapide du H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+	+
Hydrolyse de l'ADN	-	+	-	+	-	+	-	+

- a) Hydrolyse de l'hippurate :
Voir 6.5.6
- b) Épreuve rapide du H₂S :
 - 1) Mettre doucement en suspension, dans le tiers supérieur du milieu pour l'épreuve rapide de H₂S, une masse importante d'inoculum (anse de 5 mm) provenant d'une culture de 24 h.
 - 2) Ne pas mélanger.
 - 3) Incuber à 37 °C pendant 2 h dans un bain-marie.

- 4) Le noircissement autour de la masse bactérienne indique une réaction positive et commence habituellement à apparaître en dedans de 30 à 45 min.

NOTE : Utiliser seulement des cultures de 24 h.

c) Épreuve de l'hydrolyse de l'ADN

- 1) Inoculer une surface circulaire (diamètre de 5 mm) sur la gélose à l'ADN et au bleu de toluidine avec une bouclée de 3mm d'une culture de 24-48 h en appuyant l'anse qui contient l'inoculum dans la gélose.
- 2) Incuber en microaérobiose à 42 °C pendant 24 à 48 h.
- 3) La formation d'une zone claire incolore ou rosâtre autour de l'inoculum indique que la réaction est positive.

6.5.9 Sérotypage

Voir la section 2.4

Épreuves rapides

Des épreuves immunologiques rapides ont été mis au point comme les épreuves d'agglutination au latex, les systèmes d'immunofluorescence enzymatique et l'hybridation de l'ADN (9.1, 9.2, 9.4).

7. CONSERVATION DES CULTURES

On peut préparer et conserver les cultures-mères par les méthodes suivantes :

7.1 Milieu semi-solide

- a) Ensemencer la couche supérieure (10 mm) d'un milieu semi-solide pour Brucella au moyen d'un inoculum épais et incuber à 37 °C en aérobiose.
- b) Garder dans l'incubateur à 37 °C et repiquer toutes les semaines ou lorsque le milieu a presque complètement jauni.

7.2 Conservation des cultures au congélateur

Milieu de glycérol-peptone à -70 °C :

- a) À partir d'une culture de 24 h, préparer une suspension dense de bactéries dans 1 à 2 ml de milieu au glycérol-peptone.
- b) Mélanger soigneusement et distribuer 0,3 à 0,5 ml dans des vials à cryogénie.
- c) Conserver la culture à -70 °C (la viabilité demeure excellente après plusieurs années d'entreposage).

7.3 Méthode à l'azote liquide :

- a) Préparer une suspension dense dans un bouillon pour Brucella à partir d'une culture de 24 à 48 h sur une gélose au sang de Mueller Hinton; déposer 0,5 ml de la suspension dans un tube (12,5 x 43 mm) conçu pour immersion dans l'azote liquide, comme un Cryotube* contenant

deux gouttes de diméthylsulfoxyde (DMSO). Mélanger et laisser reposer pendant 5 à 10 min. avant l'entreposage.

- b) Placer les cryotubes sur des supports en métal et immerger ceux-ci dans l'azote liquide.
- c) Ne pas sceller le couvercle du réservoir. Ajouter régulièrement de l'azote liquide pour que le réservoir soit toujours plein.

NOTE : Cette méthode présente surtout l'avantage d'éviter les accidents que peut entraîner une panne d'électricité.
--

7.4 Lyophilisation

- a) Préparer une suspension dense d'une culture de 24 h dans 1 à 2 ml de milieu de sérum-inositol et incuber en microaérophilie à 42 °C pendant 24 h.
- b) Déposer 0,2 ml dans des ampoules à lyophiliser et lyophiliser.
- c) Entreposer les ampoules lyophilisées à 4 °C.

NOTE : Il faut vérifier toutes les ampoules au moyen d'un détecteur de fuite sous vide (Modèle BD-10A disponible pour 120V ou 240V chez Electro-Technic Products, 4642 N. Ravenswood-Lo 1-2349, Chicago, Illinois, 60640, É.-U.). S'il ne passe pas de lumière bleue dans l'ampoule, il y a fuite. Il faut donc jeter de telles ampoules.
--

8. EXPÉDITION DE CULTURES PAR COURRIER

Il faut prendre des précautions spéciales pour expédier des souches de *Campylobacter* par courrier, car les cellules cultivées sur gélose en pente ou en boîte sont détruites en moins de 3 jours lorsqu'elles sont exposées à l'air à la température ambiante. On décrit ci-dessous comment préparer les cultures pour qu'elles se conservent environ 5 semaines à 4 °C ou 2 semaines à la température ambiante (récupération à 100%).

- a) Ensemencer la culture sur une gélose au sang de Mueller-Hinton et incuber en microaérophilie à 42 °C pendant 24 h.
- b) prélever la culture de la gélose au moyen d'un écouvillon stérile, casser la tige de l'écouvillon avec des pinces stériles. Déposer l'écouvillon (inoculum épais) sur la couche supérieure du milieu de transport, de la gélose au sang pour anaérobiose de Wilkins-Chalgren dont on a distribué des volumes de 6 ml dans des bouteilles stériles.
- c) Laisser l'écouvillon dans la bouteille, visser le bouchon et incuber à l'air jusqu'au lendemain à 42 °C. La culture est alors prête pour l'expédition.

9. RÉFÉRENCES

- 9.1 American Association of Analytical Chemists (AOAC). 1998. *Bacteriological Analytical Manual*. Huitième édition. International, Gaithersburg, MD.
- 9.2 American Public Health Association. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Quatrième édition, F. P. Downes et K. Ito (éds.). America Public Health Association, Washington, D.C.
- 9.3 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Deuxième édition. L.C. Parks (rédacteur). CRC Press Inc.

- 9.4 Marshall, S.M., P.L. Melito, D.L. Woodward, W.M. Johnson, F.G. Rodgers et M.R. Mulvey. 1999. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J. Clin. Micro. **37**:4158-4160.
- 9.5 Post, D.E. 2000. *Food-borne pathogens monograph No. 3: Campylobacter*. Oxoid Technical Support Department, Hampshire, England.

10. MILIEUX SEMI-SOLIDES POUR LA CROISSANCE ET LES ÉPREUVES BIOCHIMIQUES (TUBES)

	<u>Milieux</u>	<u>Épreuves</u>
1.	Milieu de base* + glucose à 1% + rouge de phénol à 0,002%	Fermentation du glucose et recherche de la catalase
2.	Milieu de base + KNO ₃ à 1%	Nitrite
3.	Milieu de base + glycine à 1%	Croissance
4.	Milieu de base + NaCl à 3,5%	Croissance
5.	Milieu de base + cystéine-HCl à 0,02% avec bandelette à l'acétate de plomb	H ₂ S
6.	Milieu SIM**	H ₂ S

Distribuer de 5 à 7 ml de chaque milieu dans un tube à bouchon qui visse et autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes.

* Le milieu de base est constitué de bouillon pour Brucella contenant de la gélose à 0,16%.

** Le milieu commercial SIM contient de la gélose à 0,3% (utiliser tel quel).

Tableau 1.
Principales caractéristiques des *Campylobacter* catalase-positifs

	Oxydase	Fermentation	Réduction NO ₃	Réduction NO ₂	H ₂ S (SIM) ^a	H ₂ S (bandelette) ^b	Hippurate	Glycine à 1%	NaCl à 3,5%	25 °C	37 °C	42 °C	Aérobiose	5 % d'O ₂	Acide nalidixique(30 µg)	Céfaloine (30 µg)	TMAO ^f
<i>C. jejuni</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	S ^d	R ^e	-
<i>C. coli</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	S	R	-
<i>C. lari</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	R	R	+
<i>C. fetus</i> ss. <i>fetus</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	R	S	-
<i>C. fetus</i> ss. <i>venerialis</i>	+	-	+	-	-	V ^c	-	-	-	+	+	-	-	+	R	S	-

^a Milieu SIM pour les bactéries qui produisent beaucoup de H₂S.

^b Milieu de base (milieu semi-solide pour Brucella) avec de la cystéine pour détecter les organismes qui produisent peu de H₂S. Bandelettes de papier filtre imprégnées de plomb repliées sur le bord du tube.

^c V = résultats variables

^d S = sensible; à noter que certaines souches de *C. jejuni* sont résistantes.

^e R = résistant

^f TMAO = N-oxyde de triméthylamine