

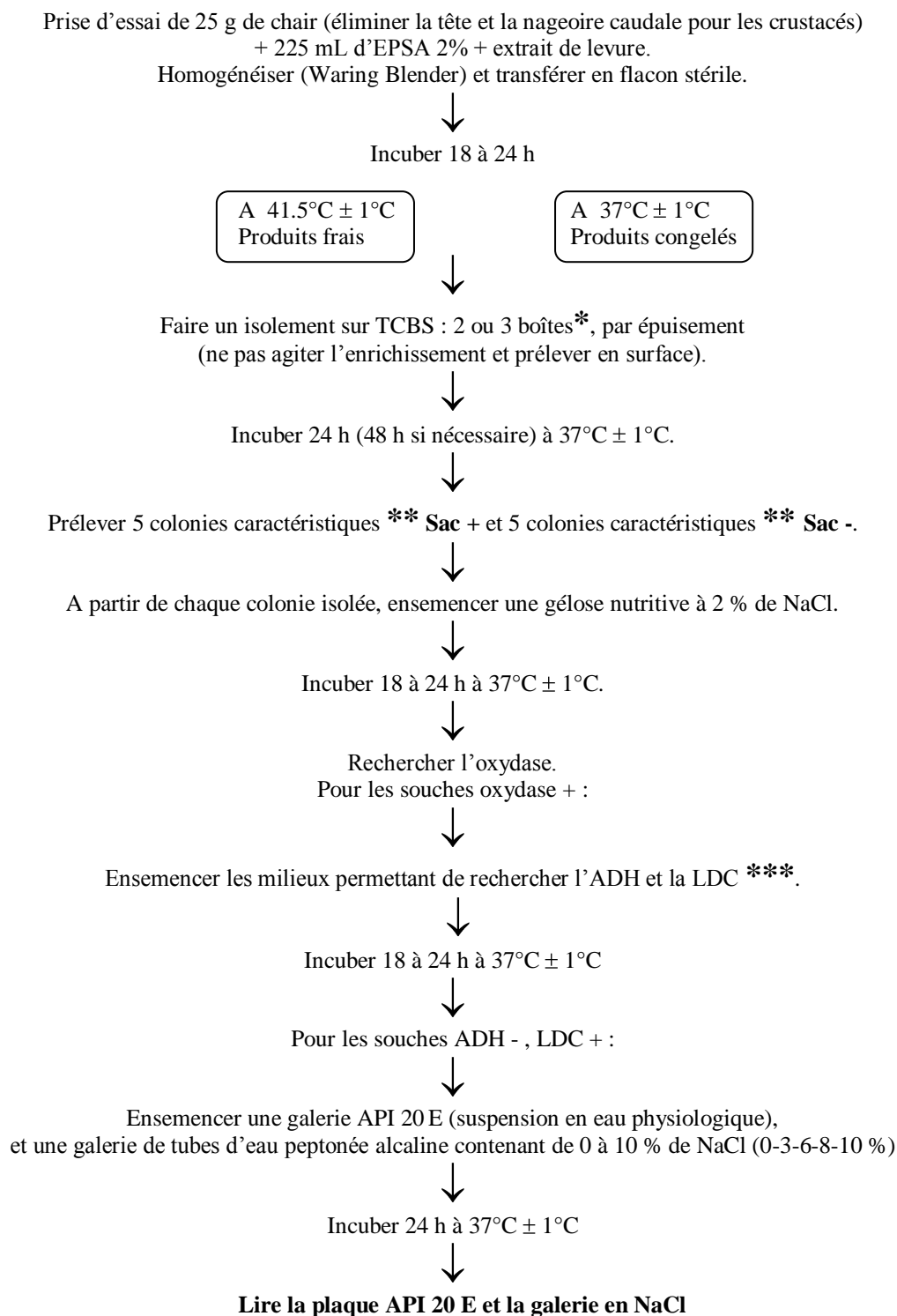
# **Protocole provisoire défini par l'AFSSA, le CNRVC et l'ENSP pour la détection de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer\***

AFSSA, Site de Boulogne-sur-Mer  
Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Produits de la Pêche,

Institut Pasteur, Paris  
Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra,

Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes  
Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé

\* Ce protocole est particulièrement adapté à l'analyse des crustacés et poissons frais ou congelés



\*L'épuisement peut être réalisé sur 5 boîtes de TCBS pour faciliter l'isolement des colonies caractéristiques si nécessaire

\*\* **Sur TCBS, les aspects caractéristiques sont pour les colonies :**

**Sac + :** colonies jaunes, planes,  $\phi$  2-3 mm (*V. cholerae*)

**Sac - :** colonies à centre vert ou bleu-vert, lisses, bombées, bords incolores,  $\phi$  2-3 mm  
(*V. parahaemolyticus*)

(l'ensemencement sur TCBS de souches témoins de *V. cholerae* et de *V. parahaemolyticus* facilitera la reconnaissance des colonies par comparaison)

\*\*\* Vérifier la concentration en NaCl des milieux commercialisés utilisés pour la recherche de l'ADH et de la LDC et, si nécessaire, l'ajuster à 1 % final.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

Confronter les résultats de l'identification donnés par le décodage de la galerie API 20 E (en tenant compte, pour l'ADH et la LDC, des résultats des cultures en tubes) à ceux donnés par la galerie en concentration croissante en NaCl (0-3-6-8-10%) interprétée selon le tableau suivant :

Galerie en sel					Interprétation
0 %	3 %	6 %	8 %	10 %	
+	+	+/-	-	-	<i>Vibrio cholerae</i>
+/-*	+	+	+/-	+/-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
+/-*	+	+/-	-	-	<i>Vibrio vulnificus</i>
+/-*	+	+	+	+/-	<i>Vibrio alginolyticus</i>

\* Lorsqu'elle existe, la croissance est faible

**1. Lorsque les résultats sont compatibles et permettent l'identification de l'espèce :**

- repiquer sur gélose de conservation (18-24 h à 37°C) les souches de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ou *V. alginolyticus*.
- envoyer au Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra à l'Institut Pasteur à Paris toutes les souches de *V. cholerae* pour confirmation de l'identification, recherche des sérogroupes O1 et O139 par agglutination, et recherche des gènes de la toxine cholérique par PCR.
- envoyer au Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra à l'Institut Pasteur à Paris ou à l'AFSSA, site de Boulogne-sur-Mer toutes les souches de *V. parahaemolyticus* pour confirmation de l'identification et recherche de facteurs de pathogénicité (gènes des hémolysines TDH et TRH) par PCR.
- envoyer au Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra à l'Institut Pasteur à Paris ou à l'AFSSA, site de Boulogne-sur-Mer toutes les souches de *V. alginolyticus*

**2. Lorsque les résultats ne sont pas compatibles et ne permettent pas l'identification de l'espèce :**

- repiquer sur gélose de conservation (18-24 h à 37°C) les souches concernées.
- les envoyer au Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra à l'Institut Pasteur à Paris pour identification et, si nécessaire, recherche de facteurs de pathogénicité par des techniques moléculaires.

## EPSA 2 % + Extrait de Levure

Milieu d'enrichissement pour *Vibrio*

**ASPECT** : jaune clair

**COMPOSITION** : en g/L

Extrait de levure	3 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	20 g
Eau distillée	1 L

***pH après stérilisation :  $8,6 \pm 0,2$***

### ***PREPARATION***

Mettre en suspension les composants  
Porter à ébullition en agitant  
Ajuster le pH si nécessaire  
Répartir en flacons  
Stériliser 15 minutes à 121 °C

### **CONSERVATION**

3 mois à + 4°C à l'obscurité  
Vérifier le pH au moment de l'utilisation

## Eau Peptonée Alcaline (0-3-6-8-10 % NaCl)

Milieu permettant d'étudier la croissance bactérienne en absence ou en présence de NaCl à différentes concentrations.

**COMPOSITION** : en g/L

Peptone	20 g
Chlorure de sodium	0, 30, 60, 80 ou 100 g
Eau distillée	1 L

***pH après stérilisation :  $8,6 \pm 0,2$***

### **PREPARATION**

Mettre en suspension les composants  
Ajuster le pH si nécessaire  
Répartir en tubes  
Stériliser 15 minutes à 121 °C

### **UTILISATION**

- Suspension mère : dans 1 tube d'EPA à 0 % de NaCl, faire une suspension avec quelques colonies isolées.
- Galerie : ensemercer chaque tube d'eau peptonée alcaline contenant de 0 à 10 % de NaCl avec 1 goutte de la suspension mère.

Incuber 24 h à 37°C.

## ADH - LDC

### **COMPOSITION** : en g/L

Decarboxylase Base Moeller Dehydrated	10.5 g
Chlorure de sodium	10 g
Eau distillée	1 L

*pH après stérilisation :  $6 \pm 0,2$*

### **PREPARATION**

Mettre en suspension les composants

Porter à ébullition en agitant jusqu'à dissolution complète

Ajouter 10 g de L-Arginine ou de L-Lysine et agiter jusqu'à dissolution complète

Ajuster le pH du milieu refroidi si nécessaire

Répartir 5 mL en tubes à vis fins (diamètre 10 mm), dont la taille permette la culture bactérienne dans des conditions

d'anaérobiose convenable pour la recherche des décarboxylase et dihydrolase.

Stériliser 15 minutes à 121 °C

### **CARACTERISTIQUES DU MILIEU**

Solution violette

### **CONSERVATION**

3 mois à + 4°C à l'obscurité

### **Remarque :**

- s'il n'est pas possible de disposer de tubes de taille adéquate, recouvrir la surface des milieux avec de l'huile de vaseline stérile, après ensemencement.
- il est possible d'utiliser des milieux commercialisés prêt à l'emploi

## Gélose Nutritive à 2 %

### **COMPOSITION** : en g/L

Peptone	5 g
Extrait de viande	3 g
Chlorure de sodium	20 g
Agar	8 à 18 g (Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar)
Eau distillée	1 L

*pH après stérilisation :  $7.1 \pm 0,2$*

**Remarque** : Il est possible d'utiliser une gélose nutritive commerciale ; il convient de vérifier la concentration en NaCl du milieu et de l'ajuster à 2 % final.

### **PREPARATION**

Mettre en suspension les composants

Porter à ébullition en agitant jusqu'à dissolution complète

Ajuster le pH du milieu refroidi si nécessaire

Stériliser 15 minutes à 121 °C

### **CARACTERISTIQUES DU MILIEU**

Gélose ambre clair

### **CONSERVATION**

3 mois à + 4°C à l'obscurité