



Isolement et Identification Présomptive de *Vibrio cholerae* O1/O139 à partir d'échantillons de selles

Contrôle qualité des milieux et réactifs

Les laboratoires doivent assurer un contrôle de qualité adéquat des milieux et des réactifs utilisés. Chaque lot de milieux préparés à partir d'ingrédients individuels doit être testé pour une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- Contrôle de stérilité/absence de contamination
- Capacité à permettre la croissance
- Capacité à produire une réaction biochimique appropriée (le cas échéant)

Enrichissement en Eau Peptonée Alcaline (EPA) :

L'EPA est le bouillon d'enrichissement recommandé pour *V. cholerae*. L'EPA améliore l'isolement de *V. cholerae* lorsque peu d'organismes sont présents (par exemple, chez les patients convalescents ou les porteurs asymptomatiques présumés), ou en cas de présence d'un grand nombre d'organismes concurrents. Les *Vibrio* spp. se développent rapidement dans l'EPA en raison du pH alcalin et de la salinité du milieu et au bout de 6 à 8 heures ils sont présents en plus grand nombre que les organismes autres que *Vibrio*.

L'inoculum doit être abondant mais ne pas dépasser 10% du volume du bouillon. Si possible, le milieu peut être réparti dans de petits tubes contenant de 2 à 5 ml d'EPA afin d'observer plus rapidement la croissance bactérienne.

Après 6 à 8 heures d'incubation, effectuer une sub-culture sur milieux solides, un sélectif et un non-sélectif, avec une ou deux anses d'EPA prélevées sous la surface du bouillon, car les vibrions se développent de préférence dans cette zone. Ne pas secouer ou mélanger le tube avant de faire cette mise en culture. S'il n'est pas possible de réaliser une sub-culture après 6 à 8 heures d'incubation, laisser pousser la nuit et ensemer un nouveau tube d'EPA avec une anse de 10 µL de cette culture. Faire un repiquage sur milieu solide de ce deuxième tube après 6 à 8 heures d'incubation.

Milieu d'isolement sélectif :

Le Thiosulfate Citrate Bile Saccharose agar (TCBS) est le milieu sélectif de choix pour isoler *V. cholerae* à partir d'échantillons de selles. Il différencie *V. cholerae* des autres bactéries par sa capacité à se développer sur ce milieu et à fermenter le saccharose, ce qui entraîne un virage de l'indicateur coloré du milieu du vert au jaune après 18 à 24 heures de croissance à 35±2°C. Les colonies suspectes sont larges (2 à 4 mm de diamètre), brillantes, légèrement aplaties et de couleur jaune. S'assurer que chaque nouveau lot de TCBS est testé avec des contrôles positifs et négatifs (c'est-à-dire avec des espèces bactériennes saccharose + et -) avant utilisation. Inoculer les milieux sélectifs avec un inoculum important provenant des selles liquides, d'une suspension fécale ou d'un écouvillon rectal.

Les colonies jaunes sur TCBS peuvent virer au vert si les boîtes ensemencées sont conservées plus de 24 heures. **La croissance doit être observée moins de 24h après ensemencement.**

La culture sur milieu TCBS ne convient pas pour réaliser le test de l'Oxydase ni pour la réaction d'agglutination avec les antisérums anti-*V. cholerae* O1 ou O139. Les colonies suspectes doivent être repiquées sur une gélose non sélective avant d'effectuer ces tests supplémentaires.

Gélose non sélective (GNS) :

Ces milieux incluent le Mueller Hinton (recommandé), la gélose cœur-cerveau (BHI Agar) et la gélose Trypticase Soja (TSA). Ces géloses peu sélectives doivent être ensemencées avec un inoculum plus léger que pour les milieux sélectifs. Après ensemencement direct à partir d'un échantillon, la croissance est susceptible de conduire à des cultures mixtes, de sorte qu'il est souvent nécessaire de ré-isoler les colonies suspectes sur une nouvelle boîte. Toutefois, si des colonies suspectes sont bien isolées sur la première boîte, il est possible d'effectuer directement le test de l'oxydase décrit ci-après. Les colonies suspectes isolées sur TCBS doivent être cultivées sur GNS avant tout autre test.

Test de l'Oxydase :

La détection de l'Oxydase doit être effectuée à partir d'une **culture fraîche (18-24h) sur gélose non sélective** ; elle ne doit pas être réalisée à partir d'une culture sur TCBS car la composition du milieu peut fausser les résultats. L'utilisation d'une anse métallique peut entraîner une réaction faussement positive au test de l'Oxydase. Utiliser une anse d'inoculation en verre ou en plastique jetable. Les **souches de *V. cholerae* sont positives pour le test de l'Oxydase** alors que les Entérobactéries sont négatives.

Agglutination :

C'est l'étape clé de l'identification présomptive du vibron cholérique. Les sérogroupes O1 et O139 doivent être identifiés à l'aide d'antisérums spécifiques du groupe O. L'agglutination doit être réalisée sur une **culture fraîche (18-24h) sur gélose non sélective**. Les cultures sur milieu TCBS peuvent donner des réactions d'auto-agglutination dans la solution saline, ce qui empêche l'interprétation de la réaction.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec une solution saline. S'il y a agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable et il est inutile d'effectuer d'autres tests d'agglutination avec les sérums anti-VcO1 ou anti-VcO139. Envoyer alors la souche à un laboratoire de référence.