

Chapitre 6

Isolement et identification de *V. cholerae* O1 et O139

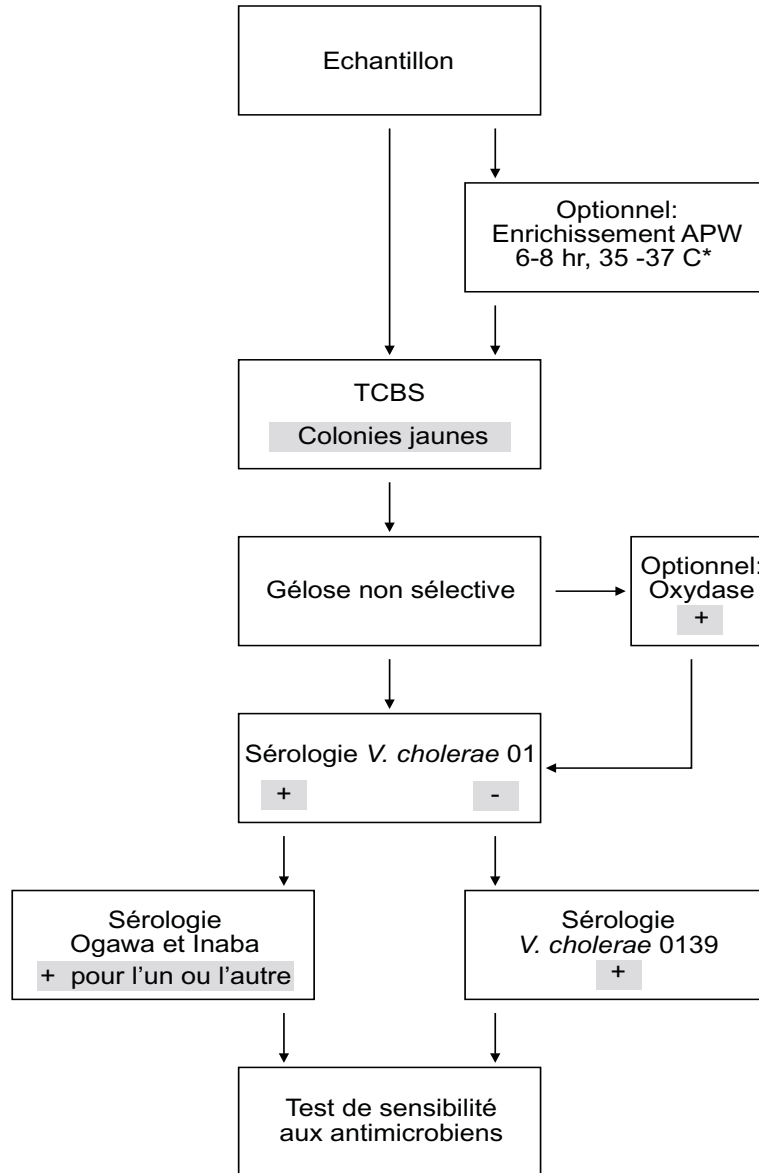
L'isolement et l'identification de *V. cholerae* O1 et O139 peuvent être améliorés si on dispose de laboratoires et de techniques de pointe. Les méthodes présentées ici sont de nature à économiser les ressources et permettent aux techniciens de laboratoire de choisir dans une certaine mesure le protocole et les milieux. Les laboratoires qui ne disposent pas de ressources suffisantes pour adopter les méthodes décrites ici et dans les chapitres suivants ne doivent pas essayer d'isoler et d'identifier ces pathogènes. Ils doivent envoyer les échantillons ou les souches à d'autres laboratoires qui ont l'habitude de réaliser les procédures en question.

A. Méthodes d'isolement

Avant 1992, sur les quelques 150 sérogroupes de *V. cholerae* qui ont été identifiés, seul le sérotype O1 était associé au choléra épidémique et pandémique. Mais à la fin de 1992 et au début de 1993, on signalait des flambées de cas de choléra imputables à un sérotype nouvellement décrit, O139, en Inde et au Bangladesh. Cette souche, de même que celles du sérotype O1 de *V. cholerae*, produit de la toxine cholérique. Les caractéristiques culturales et biochimiques de ces deux sérogroupes sont identiques. Les deux doivent être identifiés par un antiserum spécifique. L'Annexe A donne une liste du matériel et des réactifs nécessaires pour la confirmation en laboratoire et le test de la sensibilité aux agents antimicrobiens de *V. cholerae*.

Bien que *V. cholerae* se développe dans beaucoup de milieux communs, l'isolement dans les échantillons de selles se fera plus facilement à l'aide de milieux spécifiques. L'eau peptonée alcaline (APW) est recommandée comme bouillon d'enrichissement et la gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS) est le milieu sélectif de choix (Figure 6-1). Dans certains cas (par exemple, quand le patient se trouve aux premiers stades de la maladie), il peut s'avérer nécessaire d'enrichir les échantillons et/ou d'utiliser des géloses sélectives. Mais le bouillon d'enrichissement et le milieu sélectif devront toujours être utilisés avec des patients convalescents, en cas d'infections asymptomatiques soupçonnées, avec des échantillons environnementaux et quand il existe un nombre élevé d'organismes compétitifs susceptibles de se trouver dans l'échantillon.

Veillez consulter la section C « Milieux et réactifs pour *V. cholerae* » avant de préparer ces milieux car des préparations incorrectes peuvent affecter les réactions des organismes. Le chapitre 11 traite des méthodes de contrôle de qualité des milieux de culture choisis et des antisérums.



* Si on ne peut étaler l'APW en stries après 6 à 8 heures d'incubation, repiquer après 18 heures dans un tube d'APW, incuber pendant 6 à 8 heures et repiquer ensuite en stries sur une gélose TCBS

Figure 6-1. Procédure d'identification de *V. cholerae* O1 et O139 dans les échantillons de selles

1. Enrichissement dans l'eau peptonée alcaline (APW)

L'enrichissement dans l'eau peptonée alcaline peut faciliter l'isolement de *V. cholerae* quand peu de micro-organismes sont présents, comme par exemple lors d'échantillons provenant de patients convalescents ou de porteurs asymptomatiques. *Vibrio* spp. se développe très rapidement dans APW et sera présent au bout de 6 à 8 heures en quantité plus importante que les organismes n'appartenant pas au genre *Vibrio*.

L'APW peut être ensemencée avec des selles liquides, une suspension fécale ou avec un écouvillon rectal. L'inoculum de selles ne doit pas représenter plus de 10% du volume du bouillon. Incuber le tube, bouchon dévissé, à une température comprise entre 35 et 37°C, pendant 6 à 8 heures. Après cette durée d'incubation, repiquer une ou plusieurs anses de l'APW sur une gélose TCBS en prélevant à la surface du milieu liquide car les vibrions ont tendance à se développer dans la partie supérieure du milieu. Ne pas mélanger ou agiter le tube avant de repiquer. Si le bouillon ne peut pas être repiqué sur gélose après 6 à 8 heures d'incubation, repiquer quelques gouttes après 18 heures dans un tube d'APW. Repiquer ce second tube sur un milieu solide au bout de 6 à 8 heures d'incubation (Figure 6-1).

2. Isolement avec la gélose sélective TCBS

La gélose TCBS est disponible dans le commerce. Elle est facile à préparer, ne demande pas de stérilisation à l'autoclave et elle est très différentielle et sélective (voir section C). La culture sur ce milieu ne convient pas pour la réaction d'agglutination avec les sérums anti-*V. cholerae* O1 et anti-*V. cholerae* O139.

Inoculation du TCBS

La Figure 6-1 présente la procédure d'isolement de *V. cholerae* dans les échantillons de selles. Inoculer la gélose TCBS comme décrit au chapitre 4 (Figure 4-2). Après 18 à 24 heures d'incubation à une température de 35 à 37°C, la quantité et le type de culture (fermentant le saccharose ou ne le fermentant pas) sur la gélose TCBS devront être notés sur les fiches de données (Figure 6-2). Les colonies soupçonnées d'appartenir à l'espèce *V. cholerae* apparaîtront sur la gélose TCBS sous la forme de petites colonies d'un diamètre de 2 à 4 mm (Figure 6-3). La couleur jaune provient de la fermentation du saccharose dans le milieu. Des organismes ne le fermentant pas tel que *V. parahaemolyticus* produisent des colonies vertes ou bleues-vertes.

Isolement des colonies suspectes de V. cholerae

Choisir au minimum une colonie de chaque type fermentant le saccharose à partir de la gélose TCBS et l'ensemencer sur la pente de la gélose d'infusion de cœur (HIA) ou d'un autre milieu non sélectif. Ne pas utiliser de gélose nutritive car elle n'a pas de sel ajouté et ne favorise pas une croissance optimale de *V. cholerae*. À l'aide d'une aiguille d'inoculation, toucher légèrement le centre même de la colonie. Éviter de prendre entièrement la colonie et de toucher la

Fiche de travail pour *V. cholerae*

NUMÉRO DE SPÉCIMEN	MILIEU	SAC+ ^a	SAC- ^b	COLONIE	OPTIONNEL			SÉROLOGIE SUR LAME			IDENTIFICATION	
					TEST OXYDASE	TEST DU FIL	GRAM ou ED	O1	INABA	OGAWA		O139
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								

^a Sac + = colonies saccharose positives ^b Sac - = colonies saccharose négatives

Figure 6-2. Fiche de travail pour *V. cholerae*



Figure 6-3. Culture de *V. cholerae* sur un milieu d'isolement TCBS

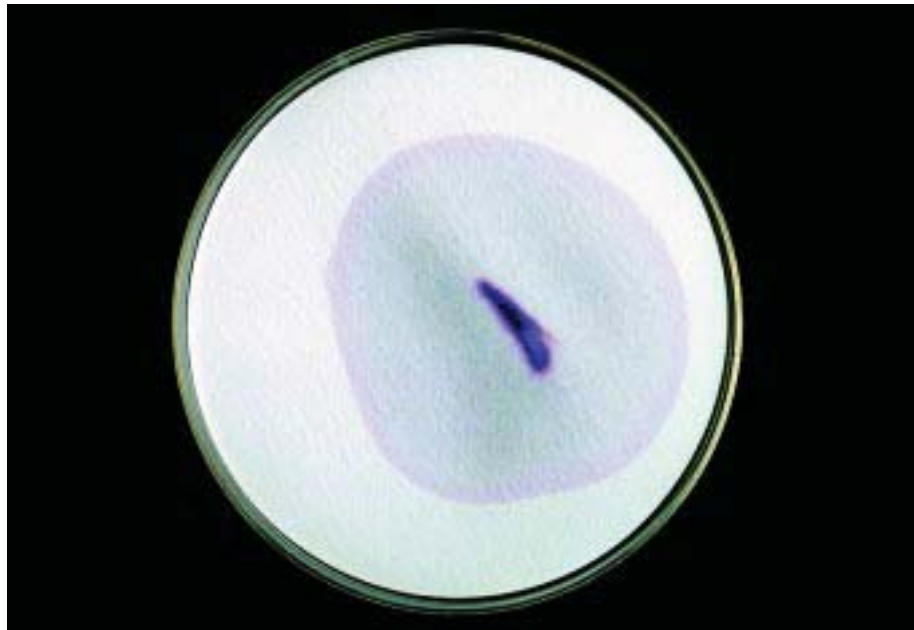


Figure 6-4 Test d'oxydase positif (voir ci-dessus) qui donne une couleur violette foncée en l'espace de 10 secondes. *V. cholerae* est positif à l'oxydase.

surface de la boîte. Cela évite de prendre des matières contaminantes pouvant se trouver sur la surface de la gélose. En cas de doute, ré-isoler la colonie suspecte en l'étalant par stries sur une autre gélose.

Incuber les géloses en pentes HIA à 35-37°C pendant une période maximum de 24 heures, cependant 6 heures peuvent suffire pour disposer d'une culture suffisante pour la réaction d'agglutination sur lame. Cette agglutination avec les sérums anti-O1 ou anti-O139 est suffisante pour l'identification présomptive. (Voir la section B ci-après pour une description de l'identification par séroagglutination.)

3. Tests de dépistage pour les isolements suspects de *V. cholerae*

Généralement, pour les isolements suspects de *V. cholerae* dans les échantillons de selles, il n'est pas nécessaire de procéder à des épreuves biochimiques avant de réaliser la réaction d'agglutination avec les sérums anti anti-O139. Mais si les réserves d'antisérums agglutinants sont limitées, le test de l'oxydase peut s'avérer utile pour une détection supplémentaire, avant l'agglutination des germes.

Test de l'oxydase

Faire le test de l'oxydase à partir d'une culture fraîche issue d'une gélose en pente HIA ou de toute autre milieu de culture ne contenant pas d'hydrate de carbone. Ne pas utiliser de culture provenant d'une gélose TCBS car des résultats faussement négatifs ou positifs peuvent être obtenus. Mettre 2 à 3 gouttes de réactif d'oxydase (1% de tétraméthyl-p-phénylénédiamine) sur un morceau de papier filtre placé dans une boîte de pétri. Étaler la culture sur le papier filtre imbibé avec une anse en platine (pas de nichrome), un applicateur en bois ou un cure-dent stérile. Dans le cas d'une réaction positive, la culture bactérienne devient immédiatement violet foncé (Figure 6-4). Les organismes négatifs à l'oxydase resteront incolores ou deviendront violets après 10 secondes. Il ne faut pas tenir compte des colorations apparaissant au-delà de ce temps. Les témoins positifs et négatifs seront testés en même temps. Des organismes du genre *Vibrio* (y compris *V. cholerae*, Tableau 6-1), *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes* sont tous positifs à l'oxydase. Toutes les *Enterobacteriaceae* sont négatives à l'oxydase.

Tableau 6-1 Réaction de *V. cholerae* dans les tests de détection

Test de détection	Réactions de <i>V. cholerae</i>
Test de l'oxydase	Positive
String Test (fil)	Positive
KIA	K/A ^a (pente rouge/culot jaune)
TSI	A/A ^a (pente jaune/culot jaune)
LIA	K/K ^{a,b} (pente violette/culot violet)
Coloration de Gram	Petits bâtonnets recourbés à Gram négatif
Préparation à l'état frais	Petits bâtonnets recourbés avec mobilité en flèche

^a K = alcaline, A = acide

^b Réaction alcaline (violette) dans le culot du milieu indique une décarboxylation de lysine. Une réaction acide (jaune) dans le culot du milieu indique qu'il n'y a pas eu de décarboxylation de lysine.

Autres tests biochimiques de détection

La réaction du string test ou « fil », la gélose en pente au fer de Kligler (KIA) ou le milieu TSI (Triple sugar/iron/agar), la coloration de Gram ou l'examen à l'état frais sont des tests possibles pour un dépistage supplémentaire des souches avant l'agglutination avec les antisérums (Tableau 6.1). La valeur de ces tests doit être mesurée pour déterminer leur utilité avant de les appliquer régulièrement. Voir section C pour des instructions sur la préparation de ces milieux de culture et les souches adéquates de contrôle de la qualité.

String test ou test du fil

Le string test, avec une culture fraîche à partir d'une gélose non sélective, est utile pour éliminer la présence de microorganismes n'appartenant pas au genre *Vibrio*, surtout *Aeromonas* spp. Le string test peut être réalisé sur une lame de microscope en verre ou dans une boîte de pétri en plastique avec une suspension bactérienne mélangée dans une goutte de solution aqueuse à 0,5% de désoxycholate de sodium. Si le résultat est positif, les cellules bactériennes sont lysées par le désoxycholate de sodium, la suspension perd immédiatement son aspect trouble et l'ADN est libérée par les cellules lysées causant un aspect visqueux au mélange. Il se forme un « fil » mucoïde quand l'anse d'inoculation est retirée lentement de la suspension (Figure 6-5). La plupart des *Vibrio* (y compris *V. cholerae*, Tableau 6-1) sont positifs alors que les souches d'*Aeromonas* sont généralement négatives. D'autres *Vibrio* spp. peuvent avoir une réaction positive ou faible au string test.

La gélose en pente au fer de Kligler (KIA) et le milieu TSI (triple sugar/iron/agar)

La gélose en pente au fer de Kligler (KIA) et le milieu TSI (triple sugar/iron/agar) peuvent être utilisés pour éliminer *Pseudomonas* spp. et certaines *Enterobacteri-*

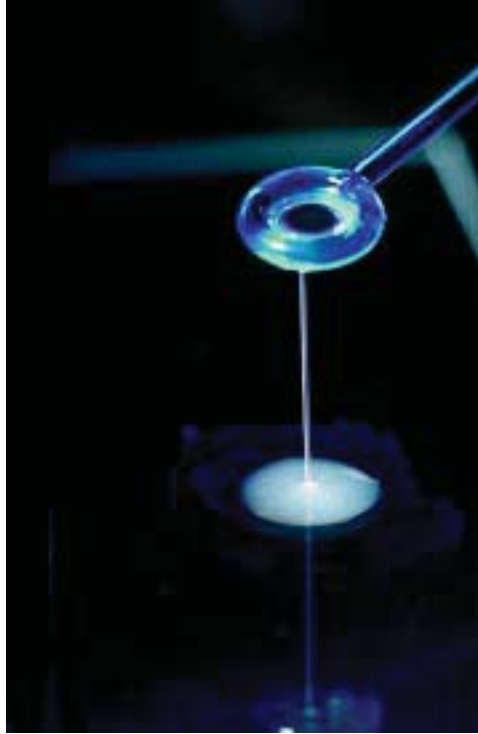


Figure 6-5. String test positif avec *V. cholerae*

aceae. Les réactions de *V. cholerae* sur KIA qui contient du glucose et du lactose sont identiques à celles des *Enterobacteriaceae* ne fermentant pas le lactose (pente alcaline (rouge), culot acide (jaune), pas de gaz, pas de H₂S) (voir Tableau 6-1 et Figure 6-6). Le milieu TSI qui contient du saccharose en plus du glucose et du lactose donne des réactions de type A/A (pente alcaline, culot acide), sans gaz, ni H₂S.

Inoculer les pentes des géloses KIA ou TSI en piquant le culot et en ensemençant en stries la surface du milieu. Incuber à une température comprise entre 35 et 37°C et les examiner après 18-24 heures. Les bouchons de chaque tube ne doivent pas être serrés à fond pendant l'incubation, et cela est particulièrement important pour les pentes KIA ou TSI. Lorsque les bouchons sont trop serrés, des conditions anaérobies apparaissent dans le tube de KIA ou TSI, et les réactions caractéristiques de *V. cholerae* risquent de ne pas se produire. Il en résultera alors une réaction inexacte.

Gélose de lysine au fer (LIA)

La gélose de lysine au fer (LIA) est utile pour détecter *Aeromonas* et certains *Vibrio* spp. qui, contrairement à *V. cholerae*, ne provoquent pas de décarboxylation de la lysine. Ensemencer la gélose LIA en piquant le culot puis

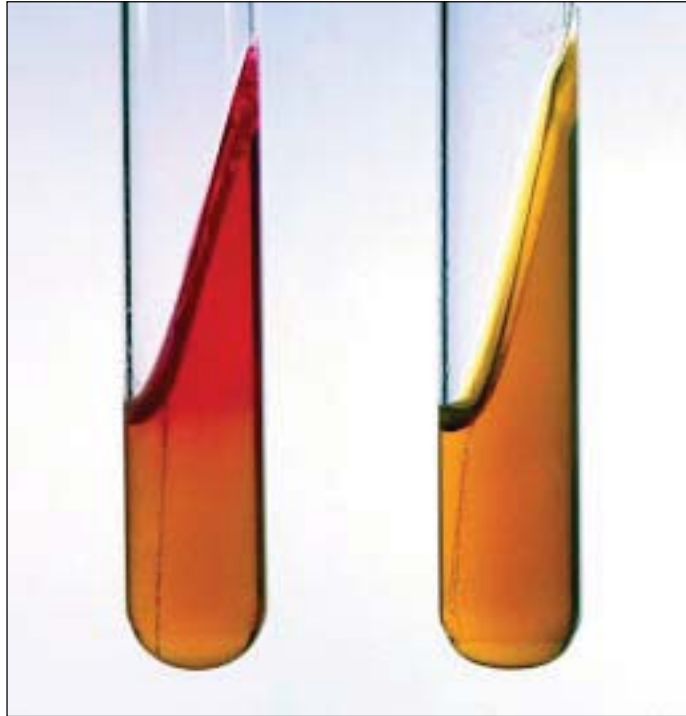


Figure 6-6. Réactions de *V. cholerae* dans une gélose en pente au fer de Kligler (gauche) et dans un milieu TSI ou triple sugar/iron/agar (droite)

en réalisant des stries sur la pente. Après une incubation de 18 à 24 heures à une température entre 35 et 37°C, examiner les géloses LIA pour rechercher les réactions typiques de *V. cholerae*. Des organismes qui produisent une lysine-décarboxylase sur LIA entraînent une réaction alcaline (couleur violette) dans le culot du tube (Voir chapitre 4, Figure 4-11). Les organismes sans l'enzyme produisent souvent une couleur jaune (acide) dans le culot du tube. La production d'hydrogène sulfuré est indiquée par un noircissement du milieu. Avec *V. cholerae*, la gélose LIA présente en général une pente alcaline (violette), un culot alcalin (violet), une absence de gaz et d'H₂S (Tableau 6-1). *Proteus* et *Providencia* spp. produiront souvent une pente rouge causée par la désamination de la lysine.

Il est important que les milieux KIA, TSI et LIA soient préparés de sorte que les tubes aient un culot profond et une longue pente. En effet si le culot n'est pas assez profond, des réactions erronées seront obtenues dans ces milieux. Dans la gélose LIA, la décarboxylation de la lysine ne se fait que dans des conditions anaérobies et une réaction faussement négative peut survenir si le milieu est présent en quantité insuffisante dans le tube (section C).

Coloration de Gram

L'examen de la culture d'une pente HIA par la coloration de Gram montrera de petits bâtonnets recourbés à Gram négatif (Tableau 6-1). La coloration au cristal violet est une technique plus rapide et montrera quand même la morphologie des cellules qui sont très typiques de *Vibrio* spp.

Examen direct

La microscopie sur fond noir et la microscopie en contraste de phase sont utilisées pour détecter des colonies suspectes d'appartenir à l'espèce *V. cholerae*. En utilisant ces techniques, des suspensions salines sont examinées au microscope pour détecter la présence d'organismes en petits bâtonnets recourbés de mobilité de type polaire en flèche (« étoile filante ») (Tableau 6-1).

B. Identification sérologique de *V. cholerae* O1 et O139

1. Identification de présomption utilisant les sérums anti-O1 et anti-O139

Une culture fraîche suspecte de *V. cholerae* dans un milieu gélosé non sélectif peut être testée avec un anti-sérum polyvalent anti-O1 ou anti-O139. Il ne faut pas faire de réaction d'agglutination à partir de cultures sur gélose TCBS car des réactions faussement négatives pourraient résulter. Généralement, après 5 à 6 heures d'incubation, la culture sur la surface de la gélose est suffisante pour faire une agglutination sur lame avec les antisérums. Sinon il faut à nouveau incuber. Si la réaction est négative avec l'antisérum O1, il faut tester l'antisérum O139. S'il est positif avec l'antisérum polyvalent O1, il faut le tester avec les antisérums monovalents anti-Ogawa et anti-Inaba. Une fois qu'une colonie prélevée sur une boîte de Pétri a été identifiée comme *V. cholerae* O1 ou O139, il n'est plus nécessaire de faire un test avec d'autres colonies de la même boîte.

2. Confirmation de *V. cholerae* O1 en utilisant les antisérums Inaba et Ogawa

Le sérotype O1 de *V. cholerae* est encore une fois divisé en trois sérotypes : Inaba, Ogawa et Hikojima (très rare). L'identification des sérotypes se fonde sur l'agglutination avec les antisérums spécifiques du sérotype (voir Tableau 6-2). L'identification de ces sérotypes n'est valide qu'avec les souches du sérotype O1. C'est la raison pour laquelle il est déconseillé d'utiliser les antisérums Inaba et Ogawa avec des souches qui sont négatives avec les antisérums polyvalents O1.

Les souches qui sont faiblement ou lentement agglutinés avec le sérum spécifique du sérotype O1 mais qui ne sont agglutinés ni avec le sérum anti-Inaba ni avec le sérum anti-Ogawa ne sont pas considérés comme appartenant au sérotype O1. Des souches d'un sérotype ont souvent une réaction croisée lente et faible avec le sérum spécifique de l'autre sérotype, suivant le degré d'absorption des antisérums spécifiques des sérotypes. Les réactions

d'agglutination avec les deux antisérums Inaba et Ogawa devront être examinés simultanément et la réaction la plus forte et la plus rapide indique le sérotype. Avec des antisérums pareillement absorbés, les souches qui sont agglutinées très fortement et de manière égale avec les deux antisérums Ogawa et Inaba sont extrêmement rares, tant est qu'elles soient jamais rencontrées. Si l'on soupçonne de telles réactions, il faut procéder à l'envoi de ces souches à un laboratoire de référence pour examen supplémentaire et seront appelés « sérotype possible Hikojima. »

Se référer au chapitre 11 pour une discussion sur le contrôle de qualité des antisérums.

Tableau 6-2. Sérotypes de *V. cholerae* séro groupe O1

Sérotypes	Agglutination par sérum absorbé	
	sérum anti-Ogawa	sérum anti-Inaba
Ogawa	+	-
Inaba	-	+
Hikojima	+	+

3. Réaction d'agglutination sur lame

Les tests d'agglutination pour les antigènes somatiques O de *V. cholerae* peuvent être réalisés dans une boîte de Pétri ou sur une lame propre. On utilise une anse ou une aiguille d'inoculation, un applicateur stérile ou encore un cure-dent stérile pour retirer une partie de la culture de la surface d'un KIA, TSI, de la gélose d'infusion de cœur (HIA) ou d'une autre gélose non sélective. Émulsionner la culture dans deux petites gouttes de sérum physiologique et bien mélanger. Ajouter une petite goutte d'antisérum à l'une des suspensions. Généralement, des volumes plus ou moins égaux d'antisérum et de suspension de la culture sont mélangés mais le volume de suspension peut être le double du volume de l'antisérum. Pour économiser l'antisérum, on peut utiliser des volumes aussi petits que 10 microlitres. Bien mélanger la suspension avec l'antisérum et incliner la lame alternativement d'un côté et de l'autre pour observer l'agglutination. Si la réaction est positive, des agglutinats vont apparaître dans un délai compris entre 30 secondes et une minute. Examiner attentivement la suspension saline pour vérifier qu'elle ne contient pas de grumeaux dus à un phénomène d'auto-agglutination. Si des grumeaux se forment, la culture est appelée rugueuse et il est impossible de la séro grouper.

4. Confirmation de *V. cholerae* O139

Un isolat suspecté *V. cholerae* qui réagit dans un sérum anti-O139 mais qui ne réagit pas avec un sérum anti-O1 polyvalent devra être envoyé à un laboratoire

de référence. La confirmation de *V. cholerae* O139 repose sur le test de production de l'entérotoxine cholérique et la vérification de l'antigène O139. Aucun sérotype n'a été identifié dans le séro groupe O139.

C. Milieux et réactifs pour *V. cholerae*

1. Eau peptonée alcaline (APW)

(Note : Il existe plusieurs formules publiées pour ce milieu.)

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Eau distillée	1 litre

Incorporer les ingrédients à l'eau et ajuster le pH à 8,5 avec une solution de NaOH 3N. Répartir en tube et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Conserver à 4°C pendant six mois en vérifiant que les bouchons sont serrés à fond pour éviter une baisse du pH.

Pour le contrôle de qualité, *V. cholerae* O1 devra fournir une bonne culture 6 à 8 heures après inoculation dans l'APW.

2. Gélose au fer de Kligler (KIA) et milieu TSI (Triple sugar/iron/agar)

(Note : Il existe plusieurs formulations déshydratées disponibles dans le commerce de KIA et de TSI. Ces milieux peuvent également être préparés à partir d'ingrédients séparés mais l'on risque d'avoir une variation entre les lots.)

Préparer selon les instructions du fabricant. Le volume de milieu doit être suffisant pour obtenir un culot profond et une pente longue. Mettre 6,5 ml de milieu dans des tubes de 16 x 125 mm possédant des bouchons hermétiquement fermés (les bouchons ne doivent pas être serrés à fond). Autoclaver. Les tubes doivent être préparés de façon à obtenir un culot de 3,5 cm et une pente de 2,5 cm. Serrer les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois.

La qualité de chaque nouveau lot doit être contrôlé avant l'utilisation. *E. coli* doit avoir une pente et un culot acides avec production de gaz mais pas de H₂S. *S. flexneri* doit avoir une pente alcaline, un culot acide sans production de gaz ni de H₂S. (Note : Certaines souches de *S. flexneri* 6 produisent du gaz.)

3. Gélose de lysine au fer

(Il existe plusieurs sociétés qui vendent du LIA déshydraté. LIA peut également être préparé à partir d'ingrédients séparés mais on risque d'avoir des variations entre les lots).

Préparer le milieu selon les instructions du fabricant. Mettre une certaine quantité de milieu dans le tube afin d'avoir un culot profond et une longue pente. Mettre par exemple 6,5 ml de culture dans des tubes de 16 x 125 mm avec des bouchons pouvant être vissés à fond (laisser les bouchons desserrés) et, après la

stérilisation à l'autoclave, laisser le milieu gélosé se solidifier de manière à avoir un culot de 3 cm et une pente de 2 cm de long. Une fois le milieu refroidi et solidifié, serrer les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois maximum.

Chaque nouveau lot de culture déshydratée doit être contrôlé avant l'utilisation. *S. flexneri* doit donner une pente alcaline et un culot acide, sans production de H₂S. Les souches de *Salmonella* produisant de l'H₂S doivent donner une pente alcaline et un culot alcalin avec noircissement du milieu imputable à H₂S. Les souches de *V. cholerae* sont positives à la lysine et produisent une réaction alcaline dans le culot de LIA.

4. Réactif de l'oxydase

Dichlorhydrate de <i>N, N, N', N'</i> -tétraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine	0,05 g
Eau distillée	5,0 ml

Dissoudre le réactif dans de l'eau purifiée (ne pas chauffer pour dissoudre). Préparer une solution fraîche tous les jours.

Des contrôles positifs et négatifs devraient être testés chaque fois que le réactif est préparé. *V. cholerae* est positif à l'oxydase et *E. coli* est négatif à l'oxydase.

5. Réactif de désoxycholate de sodium (0,5 %) pour le string test

Désoxycholate de sodium	0,5 g
Eau stérile distillée	100,0 ml

Ajouter de l'eau stérile distillée au désoxycholate de sodium et bien mélanger. Conserver à température ambiante pendant un maximum de 6 mois.

Chaque nouveau lot doit être contrôlé avant utilisation. La souche *V. cholerae* O1 doit être utilisée comme témoin positif. *E. coli*, comme souche de référence négative.

6. Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS)

(Note : Il existe plusieurs marques différentes dans le commerce de gélose TCBS. Ce milieu peut être préparé avec des ingrédients séparés mais donnera des résultats bien plus variables qu'avec l'emploi d'une formulation déshydratée commerciale.)

Suivre les instructions du fabricant pour peser et réaliser la suspension du milieu déshydraté. Chauffer en agitant. Le milieu doit être entièrement dissous. Laisser refroidir la gélose dans un bain-marie réglé à 50-55°C avant de la couler dans des boîtes de Pétri. Laisser les couvercles ouverts pendant 20 minutes pour que la surface de la gélose puisse sécher. Fermer les couvercles et conserver les boîtes à 4°C pendant une semaine maximum.

Chaque nouveau lot devra être contrôlé avant utilisation car le TCBS a des variations de sélectivité en fonction du lot et de la marque. *V. cholerae* O1 donne

des colonies jaunes. *E. coli*, soit ne pousse pas, soit pousse faiblement en donnant de pauvres colonies translucides.

Références

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgie : CDC ; 1994.

Kay BA, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. Dans : Wachsmuth IK, Blake PA et Olsvik O, ed. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington, DC : ASM Press ; 1994 : 3-4. Worksheet.

McLaughlin JC. *Vibrio*. Dans : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC et Tenover RH, ed. Manual of clinical microbiology. Washington, DC : ASM Press ; 1995 : 465-476.

Organisation Mondiale de la Santé. Manuel pour l'étude au laboratoire des infections intestinales aiguës. Genève : Organisation Mondiale de la Santé ; 1987. Publication no. OMS/CDD/83.3 rev1.