

Culture des Campylobacters et bactéries apparentées

Matériels nécessaires pour isoler et cultiver un *Campylobacter sp.*

- Milieux sélectifs pour *Campylobacter* : différents milieux ont été proposés, plusieurs sont disponibles auprès des fournisseurs français et sont satisfaisants notamment :
 - ✓ la gélose CASA (bioMérieux, ref AEB520270),
 - ✓ la gélose Karmali (Thermofisher, ref CM0935),
 - ✓ la gélose Campylosel (bioMérieux, ref 43361).
- Milieux enrichis au sang pour repiquage.
- Jarre + appareil type Anoxomat pour mise en culture microaérobie (6% O₂, 7% CO₂, 7%H₂, 78%N₂) ou sachets d'incubation individuels avec générateur de gaz pour bactéries microaérobies = CampyGen compact avec sachets plastiques (Oxoid, ref CN0020C).
- Etuve à 35°C : bien que la température optimale de croissance des Campylobacters les plus fréquemment isolés soit de 42°C (*C. jejuni* et *C. coli*), il est préférable d'incuber les géloses à 35°C afin de pouvoir cultiver toutes les espèces notamment *C. fetus* et les bactéries apparentées (*Arcobacter sp* et *Helicobacter sp*).

1. Mise en culture des selles

Choisir, si possible, un fragment purulent, muqueux ou sanglant et mettre en suspension une noix ou 1 mL de selles liquides dans 10 ml d'eau physiologique.

Prélever, à l'aide d'une pastette, un peu de cette suspension après l'avoir homogénéisée.

Ensemencer en quadrants le milieu choisi (voir liste Matériels ci-dessus) avec 1 goutte de la suspension préparée.

Pour les selles reçues en milieu de transport type Cary Blair, ensemencer en quadrants une goutte ou au minimum 20µL.

Mettre les géloses à incuber en atmosphère microaérobie (en jarre ou sachets) à 35°C sans attendre c'est-à-dire dès l'ensemencement.

La lecture après ensemencement des selles doit être réalisée après 18-24h puis à 48h et 72h, soit toutes les 24h.

Immédiatement après lecture, les ensemencements doivent être remis en atmosphère microaérobie. Au bout de 72h d'incubation, le résultat d'un ensemencement de selles peut être rendu négatif.

2. Isolement des souches

A l'aide d'une pastette, déposer sur une gélose au sang une goutte d'un bouillon ou de sérum physiologique, faire un isolement à partir des colonies isolées puis incuber la gélose 24h à 35°C en jarre et sous atmosphère microaérobie.

3. Identification des *Campylobacter sp* et bactéries apparentées

Matériels nécessaires pour effectuer les tests biochimiques

- Dispositif pour recherche d'oxydase
- Eau oxygénée

a) Tests biochimiques

OXYDASE A l'aide d'une oese stérile, prélever quelques colonies de l'isolat à tester et déposer les sur la membrane. Un virage coloré rapide au violet indique une réaction positive. Toutes les espèces du genre <i>Campylobacter</i> présentent une oxydase très rapide.	CATALASE Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame. A l'aide d'une oese stérile, prélever quelques colonies à tester. L'apparition de nombreuses bulles indique une réaction positive. La plupart des <i>Campylobacters</i> présentent une catalase très rapide (à l'exception de quelques espèces par exemple <i>C. upsaliensis</i> et des espèces anaérobies).
--	---

b) Caractérisation morphologique

ETAT FRAIS La préparation est examinée au grossissement 40×10, condensateur au minimum et diaphragme légèrement ouvert. <u>Lecture et interprétation :</u> Vérifier que la morphologie correspond à celle d'un <i>Campylobacter</i> : bacille spiralé ou incurvé avec une mobilité en vol de moucheron 	GRAM Déposer une goutte d'huile à immersion et observer au microscope grossissement 100×10, diaphragme ouvert et condensateur au maximum. <u>Lecture et interprétation :</u> Vérifier que la morphologie correspond à celle d'un <i>Campylobacter</i> à Gram négatif : bacille spiralé ou incurvé avec une coloration rose 
--	---

c) Identification des isolats

Réaliser au préalable une sélection des colonies suspectes

- ✓ sur milieu Campylosel : colonies grises à reflet métallique, plates ;
- ✓ sur milieu CASA : colonies rouges briques ;
- ✓ sur milieu Karmali : colonies grises, humides, plates et qui ont tendance à s'étaler.



Milieu Campylosel



Milieu CASA



Milieu Karmali

L'identification des colonies peut s'effectuer ensuite à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF. Les cultures doivent être fraîches (24h) et pures.

Les Campylobacters et bactéries apparentées sont très bien identifiés par cette technique. Les bases de données commerciales sont adaptées à l'identification des espèces les plus courantes en clinique humaine.

L'identification peut également être réalisée à l'aide de galerie API Campy (bioMérieux, ref 20800) ou du système automatisé VITEK-2 (bioMérieux).

d) Réalisation de l'antibiogramme

Matériels nécessaires pour effectuer l'antibiogramme

- Gélose MH au sang de cheval défibriné et additionnée de β -NAD (MH-F). (bioMérieux, Biorad ou BD) ;
- Lecteur de densité optique (type Densimat) ;
- Tubes contenant 4 mL d'eau physiologique ;
- Oeses stériles ;
- Disques d'antibiotiques : Ampicilline (10 μ g), Amoxicilline/Ac.clavulanique (20/10 μ g), Ciprofloxacine (5 μ g), Tétracycline (30 μ g), Erythromycine (15 μ g), Gentamicine (10 μ g)

Préparer une suspension bactérienne à 0,5 McF, à l'aide d'une oese stérile en vérifiant la densité optique avec un densimat. Ensemencer par écouvillonnage selon les recommandations du CA-SFM. Déposer sur la boîte les disques d'antibiotiques et incuber **48** heures en atmosphère microaérobie à 35°C.

Lecture :



La lecture des diamètres se fait à l'aide d'un automate ou d'un double décimètre.

Remarque : En cas de lecture manuelle, ne pas tenir compte de la zone « fantôme » au sein de la zone d'inhibition de certaines molécules.

4. Conservation des souches

Aliquoter 0,5 ml de Glycérol Peptoné (25% de Glycérol) dans des microtubes à congélation type Sardstedt. A l'aide d'un écouvillon, faire une suspension bactérienne très riche de la souche à conserver à partir d'une culture jeune (24h) dans les microtubes préparés précédemment. Stocker les tubes dans des boîtes de congélation à -80°C.

5. Rappel pour l'envoi des souches au CNRCH

La totalité de la souche en culture, préalablement isolée, sera introduite dans un milieu de conservation des souches bactériennes (BioRad) et adressée aussitôt **sans incubation** au Centre National de Référence des Campylobacters et Hélicobacters (www.cnrch.fr).

Attention : la viabilité des Campylobacters et des bactéries apparentées, notamment lors de la subculture, est limitée. Utiliser des cultures très jeunes pour l'envoi sinon les bactéries évoluent vers une forme coccoïde non viable.