

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 04578

(54)

Milieu d'isolement sélectif de vibrions cholériques, à base de mannose.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 1/20.

(22)

Date de dépôt..... 29 février 1980.

(33)

(32)

(31)

Priorité revendiquée : Japon, 25 septembre 1979, n° 122 806/1979.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 13 du 27-3-1981.

(71)

Déposant : NISSUI SEIYAKU CO., LTD, société de droit japonais, résidant au Japon.

(72)

Invention de : Kiyoshi Niwano.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention concerne un nouveau milieu d'isolement sélectif pour les vibrions cholériques.

Les vibrions ou bactéries cholériques appartiennent au genre vibrion et quand ils sont infectés par le choléra, le malade souffre de troubles
5 accompagnés de diarrhée, de nausées et d'exsiccose. En raison du caractère épidémique de cette maladie, il est fréquemment nécessaire de détecter les vibrions cholériques sur les patients ou dans les environnements tels que les eaux, les aliments etc.

Jusqu'à présent on effectuait la détection des vibrions ou bactéries
10 cholériques dans divers milieux d'isolement sélectif tels que le thiosulfate-citrate de bile (qu'on abrège TCBS) et qui est un milieu d'agar-agar, dans le milieu d'agar-agar pour vibrions et analogues.

Cependant, étant donné qu'on connaît un nombre important de vibrions non agglutinables (vibrions NAG) appartenant au genre vibrion qui sont
15 similaires les uns aux autres en ce qui concerne les propriétés physiologiques et biochimiques, le milieu d'isolement doit pouvoir permettre la croissance sélective des seuls vibrions cholériques (ce qu'on appelle la sélectivité du milieu) et il doit également permettre la formation d'une colonie caractéristique de vibrions cholériques (ce que l'on
20 appelle la différenciabilité).

Les milieux connus dont il est question ci-dessus sont formés de manière à isoler et à différencier les bactéries appartenant au genre vibrion à partir des substances cliniques telles que les matières fécales des malades, avec utilisation du sucrose et d'un indicateur de pH pour
25 conférer à ce milieu la caractéristique de différenciabilité et on utilise les sels de bile à titre de constituants conférant la sélectivité.

Cependant, la détection des vibrions cholériques par de tels milieux présente les inconvénients suivants :

1) les vibrions NAG autres que les vibrions cholériques sont autorisés à se développer et la sélectivité est ainsi médiocre ;
30

2) de nombreux vibrions NAG sont capables de décomposer le sucrose de la même façon que le vibrion cholérique et, dans ces conditions, la différenciabilité devient médiocre ;

3) les milieux servent à inhiber plus ou moins la croissance des
35 bactéries de choléra et on se heurte ainsi à une difficulté dans la détection des bactéries de choléra, à partir de matières provenant des environnements ou de matières provenant des patients eux-mêmes qui sont en voie de guérison, c'est-à-dire des matières ne contenant qu'une faible quantité de bactéries de choléra, ou encore à une difficulté de la détection

des bactéries de choléra dont l'aptitude à la croissance a été affaiblie ;
et

- 4) la colonie en cours de croissance devient résistante par suite de la présence des sels biliaires ce qui peut conduire à l'obtention de
5 résultats erronés lors du test d'agglutination de sérum qu'on effectuera ultérieurement.

Ainsi on constate que l'inspection des bactéries de choléra à l'aide de milieux connus se révèle complexe et incorrecte ; en outre, on omet
parfois de se rendre compte de la contamination par les vibrions cholériques,
10 surtout lors d'une inspection de l'environnement.

En conséquence, l'invention a pour objet principal un milieu d'isolement sélectif pour les vibrions cholériques se caractérisant à la fois par une excellente différenciabilité et une excellente sélectivité.

- L'invention a également pour objet un milieu d'isolement sélectif
15 de vibrions cholériques, milieu qui est efficace pour détecter les bactéries de choléra à partir de substances provenant des environnements ou de substances de caractère clinique provenant de patients en cours de rétablissement ; c'est-à-dire contenant un faible nombre de bactéries de choléra.

On réalise les objectifs indiqués en mélangeant du mannose et un
20 colorant de sulfonaphtaléine, en qualité de composants conférant la différenciabilité, ainsi que de la polymyxine B, un agent tensio-actif et du tellurite de potassium, en qualité de composants conférant de la sélectivité.

- Plus précisément, l'invention envisage de réaliser un milieu d'isolement sélectif pour les vibrions cholériques, qui comprend du mannose, un
25 colorant de sulfonaphtaléine, de la polymyxine B, un agent tensio-actif et du tellurite de potassium.

Parmi les agents tensio-actifs qui doivent constituer l'un des ingrédients du milieu selon l'invention, il convient de citer les
30 agents tensio-actifs ampholytiques tels que, par exemple, le laurylsulfate de sodium, l'heptadécylsulfate de sodium et similaires. On incorpore cet agent dans le milieu principalement pour inhiber positivement la croissance de bactéries gram-positives. La polymyxine B sert à inhiber la croissance des bactéries vibronnaires autres que les bactéries de
35 choléra et les bactéries gram-négatives. D'autre part, le tellurite de potassium sert à inhiber la croissance des bactéries qui résistent aux inhibiteurs de croissance cités plus haut.

De préférence, on détermine les concentrations de tous ces ingrédients comme suit : la polymyxine B est présente à raison de 100 000 à 200 000

U/litre ; l'agent tensio-actif est présent à raison de 0,009 à 0,25 % pds/vol ; et le tellurite de potassium est présent à raison de 0,00008 à 0,00015 % pds/vol. Le milieu qui contient la polymyxine B, l'agent tensio-actif et le tellurite de potassium dans les concentrations indiquées ci-dessus n'exerce aucun effet fâcheux sur la croissance des bactéries de choléra mais il empêche la croissance de pratiquement toutes les autres bactéries, ce qui revient à dire que sa sélectivité est de tout premier ordre.

Quelques types seulement de microorganismes peuvent se développer dans le milieu contenant les ingrédients cités et parmi eux, on ne relève pratiquement aucune bactérie, sauf les bactéries de choléra, capable de décomposer le mannose en un acide. En conséquence, il est facile de constater la présence des bactéries de choléra par le changement de couleur du milieu lors de l'incorporation dans celui-ci du colorant de sulfonaphtaléine, dont la couleur change lors d'un changement du pH. De préférence les concentrations de ces ingrédients dans le milieu sont déterminées de façon que le mannose représente plus de 1,5 % et, de préférence de 1,5 à 2,5 % pds/vol et le colorant de sulfonaphtaléine représente 0,002 à 0,008 % pds/vol.

Parmi les colorants de sulfonaphtaléine utilisables dans le milieu selon l'invention, on peut citer le bleu de prométhymol, le bleu de thymol, le rouge de crésol, le rouge de phénol et similaires.

Le milieu selon l'invention contient également, en plus des ingrédients qui ont été étudiés ci-dessus, des sources nutritives du type habituellement utilisé, comme la peptone, les extraits de viande, le chlorure de sodium etc., ainsi qu'une poudre d'agar-agar.

Pour préparer le milieu selon l'invention, on dissout les ingrédients indiqués, dans de l'eau avec chauffage, on verse la solution ainsi préparée dans un récipient et on refroidit jusqu'à un état solide. Dans un mode de réalisation préféré, on mélange tous les ingrédients autres que le tellurite de potassium et on sèche pour obtenir une poudre séchée, alors qu'on place le tellurite de potassium dans un autre récipient. Lors de l'utilisation, la poudre sèche est dissoute dans de l'eau purifiée avec chauffage et on ajoute ensuite une solution aqueuse diluée de tellurite de potassium (de préférence en une concentration d'environ 0,1 %) ; puis on transvase le tout dans un récipient approprié et on refroidit jusqu'à solidification.

Pour détecter les bactéries de choléra à l'aide du milieu de l'invention, on applique un échantillon à tester sur la surface du milieu,

on cultive pendant seize heures à 37°C et on observe visuellement ; si les bactéries de choléra sont présentes, elles apparaissent sous forme de colonies jaunes.

Les exemples suivants servent à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

EXEMPLE 1

Tableau I : Composition du milieu d'isolement sélectif selon l'invention

10	Extrait de viande en poudre :	5,0 g
	Polypeptone :	10,0 g
	Chlorure de sodium :	10,0 g
	D-mannose :	20,0 g
	Poudre d'agar-agar :	15,0 g
15	Polymyxine B :	180 000 U
	Heptadécylsulfate de sodium :	0,1 g
	Rouge de crésol :	0,04 g
	Bleu de bromothymol :	0,04 g
	Tellurite de potassium :	1,0 mg
20	Eau purifiée :	1 000 ml

On dissout tous ces ingrédients dans l'eau purifiée avec chauffage et on place chaque portion de 20 ml de la solution ainsi préparée dans une boîte de Pétri, on refroidit et on soléfie pour préparer un milieu.

EXEMPLE 2

Aussi bien au milieu préparé dans l'exemple 1, qu'à un milieu d'agar-agar TCBS (thiosulfate-citrate de bile) et à un agar-agar vibrionnaire, on additionne de l'eau d'égout renfermant des bactéries de choléra (environ jusqu'à 1 000 bactéries de choléra par millilitre de l'eau d'égout), on cultive à 37°C pendant seize heures et ensuite on observe visuellement. Les compositions du milieu TCBS et du milieu d'agar-agar vibrionnaire sont indiquées dans les tableaux II et III respectivement. Les résultats sont donnés dans le tableau IV.

Tableau II : Composition du milieu d'agar-agar TCBS par litre de milieu aqueux.

Extrait de levure :	5,0 g
Peptone :	10,0 g
Citrate de sodium :	10,0 g
Thiosulfate de sodium :	10,0 g

5

Bile de boeuf : 5,0 g
 Cholate de sodium : 3,0 g
 Saccharose : 20,0 g
 Chlorure de sodium : 10,0 g
 Citrate ferrique : 1,0 g
 Bleu de bromothymol : 0,04 g
 Bleu de thymol : 0,04 g
 Agar-agar : 15,0 g

5

pH : environ 8,6

10

Tableau III : Composition de milieu d'agar-agar vibronnaire par litre de milieu aqueux.

Extrait de levure : 5,0 g
 Peptone : 5,0 g
 Saccharose : 12,5 g
 Taurocholate de sodium : 5,0 g
 Laurylsulfate de sodium : 0,2 g
 Citrate de sodium : 8,0 g
 Thiosulfate de sodium : 8,5 g
 Phosphate disodique : 7,5 g
 Citrate ferrique : 3,0 g
 Chlorure de sodium : 10,0 g
 Rouge de crésol : 0,02 g
 Bleu d'eau : 0,2 g
 Agar-agar : 15,0 g

15

20

25

pH : 8,5 $\pm$ 0,1

Tableau IV : résultats des tests

30	Echantillon n°	Nombre de bactéries de choléra par ml d'eau d'égout	Milieu selon l'invention	Milieu d'agar-agar TCBS	Milieu d'agar-agar vibronnaire
35	1	Plusieurs	+ (-)	- (+)	- (++)
	2	légèrement plus de 10	++ (-)	- (+)	+ (++)
	3	100	+++ (-)	- (+)	+ (++)
	4	1 000	+++ (-)	+ (+)	++ (++)

Notes :

- : non observé

+ : 1 à 10 colonies observées

++ : 11 à 99 colonies observées

5 +++ : 100 colonies ou plus observées

Le signe entre parenthèse () indique les colonies de bactéries autres que les bactéries de choléra.

EXEMPLE 3

On inocule avec 1 ml de l'échantillon n° 2 de l'exemple 2, 10 ml de l'eau peptonique de Monsur (milieu d'enrichissement pour bactéries de choléra) dont la composition est indiquée dans le tableau V, puis on cultive pendant 8 heures à 37°C. On dilue ce milieu jusqu'à 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 et 10^6 fois en volume. On inocule une quantité prédéterminée de chaque dilution dans le milieu selon l'invention, le milieu TCBS et le milieu agar-agar vibronnaire, dont les compositions respectives ont été données dans les tableaux I, II et III et on cultive les bactéries à 37°C pendant seize heures pour détecter leur état de croissance de la même façon que dans l'exemple 2. Les résultats sont donnés dans le tableau VI.

20 Tableau V : Composition de l'eau peptonique de Monsur

Peptone : 10,0 g
 Chlorure de sodium : 10,0 g
 Taurocholate de sodium : 5,0 g
 Carbonate de sodium : 1,0 g
 25 Eau purifiée : 1000 ml

pH : 9,0 - 9,2

Tableau VI

30	Dilution	Milieu selon l'invention	Milieu d'agar-agar TCBS	Milieu d'agar-agar vibronnaire
	10^2	+++ (-)	++ (-)	++ (+)
	10^3	+++ (-)	+ (-)	+ (+)
	10^4	++ (-)	- (-)	+ (+)
35	10^5	+ (-)	- (-)	- (+)
	10^6	- (-)	- (-)	- (+)

Les signes +++ ... (+) ont la même signification que dans l'exemple 2.

REVENDEICATIONS

1. Milieu d'isolement sélectif pour les vibrions de choléra, caractérisé en ce qu'il comprend du mannose, un colorant de sulfonaphtaléine, la polymyxine B, un agent tensio-actif et du tellurite de potassium.
- 5 2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend par rapport à la quantité totale du milieu : 1,5 à 2,5 % pds/vol de mannose, 0,002 à 0,008 % pds/vol de colorant de sulfonaphtaléine, 100 000 à 200 000 U/litre de polymyxine B, 0,009 à 0,25 % pds/vol d'agent tensio-actif et 0,00008 à 0,00015 %/pds/vol de tellurite de
10 potassium.
3. Milieu selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le colorant de sulfonaphtaléine est le bleu de bromothymol, le bleu de thymol, le rouge de crésol ou le rouge de phénol.
4. Milieu selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que
15 l'agent tensio-actif est un agent tensio-actif ampholytique.
5. Milieu selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'agent tensio-actif est le laurylsulfate de sodium ou l'heptadécylsulfate de sodium.