

Isolement et caractérisation des souches de *Vibrio* par PCR multiplex

Laboratoire National de Référence des maladies des mollusques marins

Unité ASIM – IFREMER – La Tremblade

Suivi des modifications

Version	Modifications	Date
V1	Création	Janvier 2025

Sommaire

1. Objet et domaine d'application.....	5
2. Documents de référence.....	5
3. Equipements, réactifs et environnement.....	6
3.1. Equipements et consommables	6
3.1.1. Pour la mise en culture, l'isolement et la conservation des souches bactériennes.....	6
3.1.2. Pour l'identification des souches par PCR multiplex	6
3.2. Réactifs	7
3.2.1. Pour la mise en culture, l'isolement et la conservation des souches bactériennes.....	7
3.2.1.1. Milieux de culture.....	7
3.2.1.2. Contrôles	7
3.2.1.3. Conservation	7
3.2.2. Pour l'identification des souches par PCR multiplex	8
3.2.2.1. Eau et mastermix.....	8
3.2.2.2. Amorces et sondes	8
3.3. Environnement.....	8
4. Protocole.....	9
4.1. Réception et conservation des échantillons avant analyses	9
4.2. Prélèvement des tissus de mollusques	9
4.2.1. Larves ou individus inférieurs à 6mm (analyses en pool).....	9
4.2.2. Individus compris entre 6mm et 15mm (analyses individuelles).....	9
4.2.3. Individus > 15mm (analyses individuelles).....	10
4.3. Isolement des souches bactériennes majoritaires	10
4.3.1. Dilutions	10
4.3.2. Étalement sur gélose.....	10
4.3.3. Témoins	11
4.3.4. Lecture des étalements	11
4.3.5. Isolement des souches bactériennes majoritaires	12
4.3.6. Conservation des souches bactériennes isolées	12
4.3.6.1. Ensemencement des souches bactériennes en milieu liquide.....	12
4.3.6.2. Congélation des souches bactériennes	13
4.4. Identification des souches majoritaires par PCR multiplex	13
4.4.1. Témoins	13
4.4.2. Extraction d'ADN	13

4.4.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel	14
4.4.3.1. Mix de PCR	14
4.4.3.2. Amplification	15
4.4.4. Résultats	15
4.4.4.1. Traitement des données de fluorescence	15
4.4.4.2. Validation de l'essai	16
4.4.4.3. Interprétation des résultats des échantillons	16
4.5. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	17
4.6. Gestion des déchets	17
5. Caractéristiques de performance de la méthode	17
5.1. Isolement des souches majoritaires	17
5.2. PCR multiplex pour l'identification des souches isolées	17
Annexe 1 : Composition des milieux bactériologiques	21
Annexe 2 : Photographies de milieux gélosés (Marine Agar) présentant différents types bactériens majoritaires	23
Annexe 3 : Photographies de souches de <i>Vibrio aestuarianus</i> et de souches du groupe <i>Splendidus</i>	24
Annexe 4 : Interprétation des résultats des témoins	25

1. Objet et domaine d'application

Ce document décrit un protocole standard d'isolement de souches bactériennes majoritaires à partir de tissus de mollusques marins suivi d'une identification des souches isolées par PCR multiplex ciblant l'espèce *Vibrio aestuarianus* et les bactéries du groupe *Splendidus*.

La PCR multiplex permet la détection de :

- toutes les souches connues à ce jour de *Vibrio aestuarianus* grâce à l'amplification du gène DNAj codant pour une protéine de choc thermique
- la majorité des souches appartenant au groupe *Splendidus* grâce à l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S des bactéries de ce groupe.

Elle ne permet pas de distinguer les sous-espèces de *Vibrio aestuarianus* ni les différentes espèces au sein du groupe *Splendidus*. Ce groupe regroupe, à ce jour, 21 espèces bactériennes différentes (Kudo et al. 2024).

2. Documents de référence

- Stanier RY, Doudoroff M, Adelberg A, 1966. Microbiologie générale. Ed Masson, Paris, 638p.
- Saulnier D., De Decker S., Tourbiez D., Travers M.A., 2017. Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus*-related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. J Microbiol Methods.140:67-69.
- Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas J-L, 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microbial ecology 53 : 187-196.
- Jiang C, Tanaka M, Nishikawa S, Mino S, Romalde JL, Thompson FL, Gomez-Gil B, Sawabe T, 2021. *Vibrio* Clade 3.0: New Vibrionaceae Evolutionary Units Using Genome-Based Approach. Curr Microbiol. 79(1):10.
- Kudo R, Yamano R, Yu J, Hatakeyama S, Jiang C, Mino S, Yamaki S, Ando Y, Sakai Y, Sawabe T. The Description of *Pseudoalteromonas apostichopi* sp. nov., *Vibrio apostichopi* sp. nov., and *Marinobacter apostichopi* sp. nov. from the Fertilized Eggs and Larvae of *Apostichopus japonicus*, 2024. Curr Microbiol. 81(8):246.
- Mesnil, A., Jacquot, M., Garcia, C., Tourbiez, D., Canier, L., Bidois, A., Dégremont, L., Cheslett, D., Geary, M., Vetri, A., Roque, A., Furones, D., Garden, A., Orozova, P., Arzul, I., Sicard, M., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzón, D., & Travers, M.-A. (2023). Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oysters in Europe. Molecular Ecology, 32, 2869–2883.

3. Equipements, réactifs et environnement

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits, matériels et appareils nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Ifremer recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

3.1. Equipements et consommables

3.1.1. Pour la mise en culture, l'isolement et la conservation des souches bactériennes

- PSM ou hotte stérile permettant d'assurer des conditions axéniques ou bec Bunsen
- Incubateur bactériologique assurant une température de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Réfrigérateur
- Congélateur
- Surgélateur
- Autoclave
- Mélangeur de type vortex
- pH-mètre
- Scalpels ou ciseaux
- Pincés
- Système de broyage (ex : piston pellet)
- Micropipettes et pointes à filtres pour des volumes compris entre $20\mu\text{L}$ et $1000\mu\text{L}$
- Pipette Pasteur stérilisée au bec Bunsen par exemple ou râteau plastique stérile
- Anse de platine stérilisé au bec Bunsen par exemple ou anse d'inoculation stérile
- Microtubes de 1,5 à 2 mL stériles
- Boîte de Pétri stérile
- Cryotube stérile

3.1.2. Pour l'identification des souches par PCR multiplex

- Hotte équipée d'un système UV
- Micropipettes et pointes à filtres pour des volumes compris entre $2\mu\text{L}$ et $1000\mu\text{L}$
- Thermocycleur pour PCR en temps réel
- Plaque de 96 puits pour PCR en temps réel
- Film autocollant ou barrettes et bouchons adaptés au thermocycleur
- Microtubes de 1,5 à 2 mL (exempt de RNase et DNase)
- PSM ou hotte stérile permettant d'assurer des conditions axéniques ou bec Bunsen
- Cure-dent stérile
- Bain Marie ou bain à sec ou thermocycleur à $98^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Centrifugeuse
- Réfrigérateur
- Congélateur

3.2. Réactifs

3.2.1. Pour la mise en culture, l'isolement et la conservation des souches bactériennes

3.2.1.1. Milieux de culture

Pour la mise en culture à partir des surnageants des broyats de tissus, plusieurs milieux peuvent être utilisés. Les milieux classiquement utilisés pour les bactéries marines du genre *Vibrio* sont le Marine Agar, le Zobell Agar ou le LB Agar additionné de NaCl.

Pour la conservation des souches, le bouillon Zobell additionné de glycérol peut être utilisé.

La composition de tous ces milieux figure en annexe 1 ainsi que celle de l'eau de mer artificielle.

3.2.1.2. Contrôles

Les milieux de culture sont des réactifs critiques pour la réalisation des isollements. En conséquence, chaque lot doit être contrôlé avant ou au moment de sa première utilisation. Ces contrôles portent sur la qualité physique et microbiologique. Il faudra vérifier a minima la bonne croissance des souches témoins (1 souche de *Vibrio aestuarianus* et une souche du clade *Splendidus*) et l'absence de contaminants.

3.2.1.3. Conservation

Les milieux de culture commerciaux doivent être stockés et conservés selon les recommandations du fournisseur.

Dans le cas de milieux fabriqués au sein du laboratoire, ils doivent être utilisés dans un délai de trois mois après fabrication. En cas de non utilisation dans les trois mois, un nouveau contrôle de conformité du milieu peut être réalisé permettant de prolonger son utilisation d'un mois. Le stockage des milieux doit être préférentiellement réalisé au réfrigérateur.

Quelle que soit l'origine du milieu (commerciale ou interne au laboratoire), en cas de changement de couleur, de signe d'évaporation/déshydratation ou de prolifération microbienne, il faudra éliminer les milieux concernés.

3.2.2. Pour l'identification des souches par PCR multiplex

3.2.2.1. Eau et mastermix

- Eau (H₂O) de qualité biologie moléculaire
- Master Mix TaqMan

Les références des mastermix utilisés au laboratoire sont précisées dans le tableau ci-dessous à titre indicatif :

Produit	Fabricant	Référence
SsoAdvanced Universal	Biorad	1725281
Master Mix TaqPath™ qPCR, CG	Applied Biosystems	A16245
Brilliant III Ultra-Fast QPCR	Agilent	600881

3.2.2.2. Amorces et sondes

Cible	Nom	Séquence (5'→3')	Longueur	Taille amplicon
<i>Vibrio aestuarianus</i>	DNAj-F	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	25	267 pb
	DNAj-R	TCAATTTCTTTTGAACAACCAC	22	
	DNAj-probe (HEX)	TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC	22	
Groupe <i>Splendidus</i>	16S SpF2	ATCATGGCTCAGATTGAACG	20	152 pb
	16S SpR2	CAATGGTTATCCCCACATC	20	
	16S probe (FAM)	CCCATTAACGCACCCGAAGGATTG	24	

3.3. Environnement

Le personnel doit porter une blouse de laboratoire et des gants durant toutes les étapes et doit connaître les pratiques courantes de laboratoire. Le personnel réalisant cette méthode doit également avoir reçu une formation appropriée.

La réalisation de ces analyses nécessite les conditions environnementales classiquement utilisées pour la bactériologie à savoir travailler dans des conditions garantissant la stérilité.

Les différentes étapes PCR sont réalisées dans des pièces séparées selon un principe de marche en avant.

4. Protocole

4.1. Réception et conservation des échantillons avant analyses

Une fois les échantillons reçus, ils doivent être conservés dans une enceinte réfrigérée et être analysés dans la journée dans le cas de la réception d'animaux moribonds. Ils peuvent éventuellement être conservés 24 à 48 heures dans une enceinte réfrigérée avant la réalisation de l'analyse dans le cas de la réception d'animaux vivants.

Note : Les échantillons ne doivent en aucun cas être congelés.

4.2. Prélèvement des tissus de mollusques

Les prélèvements ne seront pas stériles mais seront réalisés dans la mesure du possible le plus stérilement possible et en limitant au maximum les risques de contamination (ex : prélèvements réalisés à proximité d'un bec bunsen à l'aide d'instruments stériles).

Entre chaque prise d'essai, l'opérateur veillera à désinfecter le matériel utilisé pour les prélèvements.

Selon le stade de développement ou la taille des mollusques, différents protocoles de traitement des animaux sont à mettre en œuvre.

4.2.1. Larves ou individus inférieurs à 6mm (analyses en pool)

Prélever environ 50mg d'animaux (sans retirer les coquilles) et les mettre dans un tube stérile de 1,5 mL avec 200 µL d'eau de mer stérile. Les broyer à l'aide par exemple d'un piston pellet stérile.

4.2.2. Individus compris entre 6mm et 15mm (analyses individuelles)

Décoquiller individuellement les animaux à l'aide de lames de scalpel stériles par exemple. Prélever tout ou une fraction de l'animal (la moitié par exemple) et les mettre dans un tube stérile de 1,5 mL avec 200 µL d'eau de mer stérile. Les broyer par exemple à l'aide d'un piston pellet stérile.

4.2.3. Individus > 15mm (analyses individuelles)

Ouvrir l'animal à l'aide d'un scalpel ou couteau stérile par exemple. Prélever a minima un morceau de branchies, de glande digestive et de manteau pour un individu et les mettre dans un tube stérile de 1,5 mL avec 200 µL d'eau de mer stérile. Les broyer par exemple à l'aide d'un piston pellet stérile.

4.3. Isolement des souches bactériennes majoritaires

4.3.1. Dilutions

Prélever le surnageant du broyat de chaque échantillon de manière à réaliser une dilution au dixième en tube stérile de 1,5 ou 2 mL dans de l'eau de mer stérile (généralement 100µL de surnageant dans 900µL d'eau de mer). Homogénéiser la solution par aspirations et refoulement successifs à l'aide de la pipette ou en vortexant légèrement.

Si les prélèvements à analyser correspondent à des **animaux moribonds**, préparer des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} en tubes stériles de 1,5 ou 2 mL à partir de la dilution au dixième (généralement 100µl de la dilution précédente dans 900µl d'eau de mer filtrée stérile). Bien homogénéiser chaque dilution par aspiration et refoulement successifs à l'aide de la pipette ou en vortexant légèrement.

Si les prélèvements à analyser correspondent à des **animaux vivants**, préparer uniquement une dilution à 10^{-2} en tube stérile de 1,5 ou 2 mL à partir de la dilution au dixième (généralement 100µl de la dilution précédente dans 900µl d'eau de mer filtrée stérile). Bien homogénéiser la dilution par aspiration et refoulement successifs à l'aide de la pipette ou en vortexant légèrement.

4.3.2. Etalement sur gélose

Vortexer les tubes légèrement avant prélèvement.

Pour chaque échantillon,

- déposer 50µL de la dilution 10^{-2} et 10^{-4} sur des milieux gélosés lorsqu'il s'agit d'animaux moribonds,
- **ou** déposer 50µL de la dilution 10^{-1} et 10^{-2} sur des milieux gélosés lorsqu'il s'agit d'animaux vivants.

Réaliser un étalement des dépôts à l'aide de râteaux pour chaque boîte.

Incuber les boîtes de Pétri dans une étuve à 20°C pendant 48 heures minimum (et plus si nécessaire).

4.3.3. Témoins

Lors de la recherche de souches bactériennes majoritaires par isolement, il est nécessaire de prévoir a minima :

- un témoin négatif qui peut correspondre à l'étalement de 50µL d'eau de mer stérile (par exemple, celle utilisée pour la réalisation des dilutions),
- deux témoins positifs : un correspondant à l'étalement d'une souche de *Vibrio aestuarianus* et l'autre correspondant à l'étalement d'une souche du groupe *Splendidus*.

Remarque : Pour la souche du groupe Splendidus, il est nécessaire de prendre une des espèces pouvant être amplifiées par cette PCR multiplex (cf. paragraphe 5).

4.3.4. Lecture des étalements

La lecture se fait après 48 heures d'incubation voire 72 heures si nécessaire.

1 - Pour chaque dilution, compter approximativement le nombre de colonies présentes sur les boîtes de Pétri. Si ce nombre est supérieur à 200, noter > 200.

2 - Différencier ensuite les types de colonies bactériennes (taille, forme, couleur...) présents sur les boites des différentes dilutions (un type bactérien peut être présent sur les deux dilutions).

3 – Compter approximativement le nombre de colonies par type et par dilution. Si pour un type donné, le nombre de colonies est supérieur, noter > 200.

4 - Préciser ensuite les types de colonies majoritaires par dilution. Plusieurs types peuvent être majoritaires pour une même dilution mais **il est à noter que généralement au maximum deux ou trois types sont considérés comme majoritaires pour une dilution donnée.**

Note : On entend par colonie majoritaire, une colonie présente sur les 2 dilutions (10^{-2} et 10^{-4} par exemple) et présentant au minimum 50 colonies à la plus faible des dilutions (10^{-2} par exemple).

5 - Décrire les colonies majoritaires : taille moyenne en mm (mesurée sur au moins 5 colonies), couleur, forme (plate, ronde, invaginée), contour (régulier ou irrégulier), surface (lisse ou rugueuse) et aspect (opaque, translucide, muqueuse).

Remarque : Au sein du laboratoire, lorsqu'un type de colonie majoritaire se retrouve sur différents individus (ex : le type T1 de l'individu 1 ressemble au type T3 de l'individu 4), on note cette information afin de savoir si des colonies majoritaires ayant des morphotypes similaires se retrouvent sur la majorité des échantillons analysés.

6 - En parallèle, vérifier si :

- le témoin négatif ne présente aucun développement bactérien,
- les témoins positifs présentent une croissance bactérienne et sont purs.

Note : Si les colonies bactériennes majoritaires sont suffisamment isolées, elles peuvent être identifiées par la PCR multiplex à partir de cette étape.

Des photographies présentant des exemples de gélose avec des colonies majoritaires figurent en annexe 2.

4.3.5. Isolement des souches bactériennes majoritaires

Réaliser un isolement sur un milieu gélosé adéquat des différents types de colonies majoritaires observés.

Prélever à la pipette Pasteur ou avec une anse stérile une colonie type représentative et étaler-la sur le milieu. Incuber les boîtes de Pétri dans une étuve à 20°C pendant 48 heures voire 72 heures selon la croissance de la souche.

Au bout de 48 heures, vérifier la croissance des colonies isolées et leur pureté. Si une ou plusieurs colonies ne sont pas pures ou n'ont pas crû, refaire un isolement à partir des boîtes d'origine conservées au réfrigérateur.

Remarque : Les boîtes de gélose des différentes dilutions sont gardées au réfrigérateur tant que l'étape d'isolement n'est pas achevée.

Des photos de souches du groupe *Splendidus* et de *Vibrio aestuarianus* isolées sur différents milieux bactériologiques sont présentées en annexe 3.

4.3.6. Conservation des souches bactériennes isolées

4.3.6.1. Ensemencement des souches bactériennes en milieu liquide

Prélever à la pipette Pasteur ou avec une anse stérile quelques colonies précédemment isolées. Les resuspendre dans un cryotube contenant 800µL de milieu liquide (ex : bouillon Zobell).

Incuber les tubes 24 à 48 heures dans une étuve à 20°C afin d'obtenir une croissance des souches bactériennes. Cette incubation peut se réaliser sous agitation.

Remarque : Les boîtes de gélose des souches bactériennes pures sont gardées au réfrigérateur ou à l'étuve tant que l'étape d'ensemencement n'est pas achevée.

Si aucune croissance n'est observée dans le milieu liquide, refaire un ensemencement à partir des boîtes de souches bactériennes pures conservées.

4.3.6.2. Congélation des souches bactériennes

Ajouter 200µL de milieu de conservation dans chacun des tubes de bouillon présentant une croissance bactérienne. Vortexer les. Attendre 15 à 30 minutes environ avant de placer les souches dans le surgélateur.

4.4. Identification des souches majoritaires par PCR multiplex

4.4.1. Témoins

Les témoins négatifs visent à détecter une éventuelle contamination croisée de l'environnement de travail pendant l'extraction de l'ADN et la PCR. Les contrôles positifs permettent de vérifier que l'extraction d'ADN et la réaction de PCR se sont déroulées correctement.

Il est conseillé d'inclure pour l'identification des souches isolées :

- au moins un témoin positif de processus pour chacune des cibles : ils sont réalisés à partir d'une colonie de *Vibrio aestuarianus* et d'une colonie d'une bactérie du groupe *Splendidus* contenant la séquence cible. Ces témoins sont traités dans des conditions similaires aux colonies bactériennes à analyser,
- au moins un témoin positif d'amplification pour chacune des cibles (suspensions d'ADN plasmidiques ou d'ADN génomique),
- au moins un témoin négatif d'extraction correspondant à une extraction sans échantillon (ex : 200µl d'eau),
- au moins un témoin négatif PCR par série de PCR : ils contiennent tous les éléments du mélange réactionnel mais aucun extrait d'ADN n'est ajouté, uniquement de l'eau (par exemple : eau utilisée pour préparer le mélange PCR).

4.4.2. Extraction d'ADN

Une colonie bactérienne isolée sur une boîte de pétri de moins de deux semaines, est récupérée à l'aide d'un cure-dent stérile en piquant le cure-dent au centre de la colonie.

Remarque : Il ne faut pas prendre une grande quantité de la colonie bactérienne car une quantité trop importante de matériel peut inhiber la réaction de PCR par la suite.

Les bactéries de la colonie prélevée avec le cure-dent sont mises en suspension dans un tube contenant 200µL d'eau de qualité biologie moléculaire stérile en tournant le cure-dent sur lui-même.

L'ADN total est extrait en chauffant l'échantillon 10 minutes à 98°C.

Après un refroidissement rapide du tube à 4°C, 5µL de la suspension sont immédiatement prélevés pour la réalisation de la PCR en temps réel ou la suspension est congelée jusqu'à l'analyse par PCR en temps réel.

4.4.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

4.4.3.1. Mix de PCR

- Décongeler les amorces et sondes.
- Calculer le nombre de puits nécessaire pour faire l'analyse et ajouter au moins 2 puits supplémentaires.

Prévoir :

- un puits pour chaque colonie à analyser,
- au moins six puits pour les témoins :
 - un témoin positif de processus pour chacune des cibles par plaque,
 - un témoin positif d'amplification pour chacune des cibles par plaque,
 - au moins un témoin négatif d'extraction,
 - au moins un témoin négatif par plaque.
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ou 2 mL afin d'obtenir les concentrations finales suivantes :

Réactifs Concentration initiale	Concentration Finale	Volume pour 1 puits (µL)
Mastermix (2X)	1X	10
DNAj-F (10µM)	0,3µM	0,6
DNAj-R (10µM)	0,3µM	0,6
DNAj probe HEX (10µM)	0,2µM	0,4
16S SpF2 (10µM)	0,3µM	0,6
16S SpR2 (10µM)	0,3µM	0,6
16S probe FAM (10µM)	0,2µM	0,4
H ₂ O	qsp 15µL	1,8

- Homogénéiser le mix réactionnel par pipetage (ou vortex).
- Centrifuger brièvement le tube.
- Distribuer 15µL de mélange réactionnel par puits.
- Ajouter 5µL d'eau dans le(s) puits correspondant(s) au(x) témoin(s) négatif(s) d'amplification.
- Ajouter 5µL d'ADN extrait de chaque colonie à analyser dans chaque puits.

- Ajouter 5µL d'ADN extrait de chaque colonie témoin dans les puits correspondants au(x) contrôle(s) positif(s) d'amplification PCR.
- Fermer les puits.

Le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de déposer les échantillons et témoins en simplicat ou duplicat.

4.4.3.2. Amplification

Les cycles d'amplification sont réalisés sur un thermocycleur pour PCR temps réel selon le protocole suivant :

<i>Etape préalable uniquement pour le mastermix TaqPath™ qPCR, CG (Applied Biosystems)</i>	2 minutes à 50°C
Dénaturation initiale	3 minutes à 95°C
Nombre de cycles (amplification)	40
Amplification	10 secondes à 95°C
	20 secondes à 60°C
	Mesure de la fluorescence avec les filtres FAM et HEX

Remarque : il faut adapter le thermoprofil selon le mix commercial et le thermocycleur utilisés (se conférer à la notice du kit).

4.4.4. Résultats

4.4.4.1. Traitement des données de fluorescence

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel associé au thermocycleur utilisé, selon les recommandations du fournisseur.

Les Ct pour "cycle seuil" sont définis comme le cycle à partir duquel une augmentation statistiquement significative de la fluorescence est détectée (différente du bruit de fond). Le Ct correspond à l'abscisse du point d'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne de seuil.

La ligne de seuil (ou « threshold line ») peut être définie par le logiciel du thermocycleur ou définie manuellement. Elle doit être placée au-dessus du bruit de fond, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique (par exemple, en utilisant la courbe du témoin positif d'amplification).

Vérifier toutes les courbes d'amplification afin d'identifier des résultats faux positifs causés par un bruit de fond élevé ou irrégulier. Les résultats issus de toutes réactions impactées de cette façon doivent être considérés comme négatifs.

Vérifier toutes les courbes d'amplification positives avec un profil atypique et ajuster la plage de Ct utilisée pour le calcul de la ligne de base. Si les valeurs Ct ont été impactées, enregistrer les Ct corrigés.

Le bruit de fond est parfois important sur les premiers cycles ; dans ce cas, il est possible de supprimer les premiers Ct de l'analyse afin de faciliter l'interprétation des courbes.

4.4.4.2. Validation de l'essai

Avant de conclure sur le statut des échantillons testés, il est nécessaire de valider les étapes d'extraction et de PCR en analysant les résultats obtenus avec les témoins :

- le témoins négatifs doivent produire un résultat négatif,
- **ET** les témoins positifs doivent présenter une amplification avec le filtre HEX pour le témoin *Vibrio aestuarianus* et avec le filtre FAM pour le témoin du groupe *Splendidus*.

L'essai est considéré valide lorsque tous les témoins présentent des résultats conformes.

Si un ou plusieurs témoins donnent des résultats non conformes, l'analyse peut être répétée à partir de l'extraction de l'ADN des colonies ou de la PCR comme signalé dans l'annexe 4.

4.4.4.3. Interprétation des résultats des échantillons

- L'ADN de *Vibrio aestuarianus* est considéré comme détecté dans un échantillon si la valeur de Ct obtenue avec le filtre HEX est comprise entre 14 et 30.
- L'ADN de *Vibrio aestuarianus* est considéré comme non détecté dans un échantillon si aucune valeur de Ct n'est obtenue avec le filtre HEX ou si la valeur de Ct est supérieure à 30.
- L'ADN de bactéries appartenant au groupe *Splendidus* est considéré comme détecté dans un échantillon si la valeur de Ct obtenue avec le filtre FAM est comprise entre 14 et 30.
- L'ADN de bactéries appartenant au groupe *Splendidus* est considéré comme non détecté dans un échantillon si aucune valeur de Ct avec le filtre FAM n'est obtenue ou si la valeur de Ct est supérieure à 30.

Note : Si un Ct inférieur à 14 est obtenu, l'ADN de *Vibrio aestuarianus* ou de bactéries appartenant au groupe *Splendidus* est considéré comme détecté dans l'échantillon mais il est conseillé de modifier sa procédure (dilution de l'extrait ou diminution de la quantité de bactéries prélevées) car il est probable qu'une trop grande quantité de bactéries aient été prélevées initialement et des inhibitions de réactions de PCR peuvent être constatées par la présence de protéines trop importantes dans l'extrait.

Remarque : Lors d'analyse d'un échantillon en duplicat, l'ensemble de ces conditions doivent être appliquées à chacun des duplicats. Le résultat d'analyse sera considéré comme douteux lors de différence de résultats entre les duplicats (par exemple, une amplification obtenue pour un seul des duplicats).

4.5. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les souches bactériennes majoritaires isolées peuvent être conservées par les laboratoires agréés. Dans tous les cas, les laboratoires doivent conserver ces souches pendant au minimum 2 mois au cas où l'analyse devrait être reconduite ou si des analyses confirmatoires sont nécessaires.

Les laboratoires peuvent également transmettre au LNR les souches isolées afin que le LNR procède à une identification plus précise des isolats bactériens.

4.6. Gestion des déchets

Les déchets doivent être traités selon les conditions autorisées par la réglementation. Le laboratoire doit également mettre en œuvre des mesures pour garantir la non-dissémination des organismes pathogènes dans l'environnement.

5. Caractéristiques de performance de la méthode

5.1. Isolement des souches majoritaires

Les milieux conseillés tels le Marine Agar, le Zobell Agar ou le LB Agar additionné de NaCl permettent la croissance des différentes espèces de *Vibrio* affectant les coquillages mais ils permettent également la croissance d'autres bactéries marines appartenant à d'autres genres tels que les genres *Shewanella*, *Acinetobacter*.

Le milieu TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose) est déconseillé car bien que favorisant la croissance des *Vibrio*, certaines espèces de *Vibrio* pathogènes de coquillages croissent difficilement sur ce milieu. C'est le cas notamment de la sous espèce *Vibrio aestuarianus francensis* pathogène des huîtres creuses *Magallana gigas*.

5.2. PCR multiplex pour l'identification des souches isolées

La PCR en temps réel multiplex a été évaluée en termes d'inclusivité, d'exclusivité et de répétabilité. La plupart de ces résultats a été publiée par Saulnier et al. 2017.

La sensibilité analytique n'a pas été déterminée car elle ne présente pas d'intérêt dans le cas d'un test utilisé uniquement en identification de souches bactériennes.

Critère de performance	Résultats obtenus
Type de méthode	Méthode qualitative
Inclusivité	
- <i>Vibrio aestuarianus</i>	<p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : toutes les souches et sous espèces connues de la bactérie <i>Vibrio aestuarianus</i> semblent être détectés par cette PCR (100% d'identité).</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 115 souches (confirmation par séquençage) issus de différents hôtes (<i>Magallana gigas</i>, <i>Ostrea edulis</i>, <i>Ruditapes philippinarum</i>, <i>Cerastoderma edule</i>, <i>Mytilus edulis</i>, zooplancton) ou environnements (eau de mer, sédiments), de différents pays (Italie, USA, Irlande, Espagne, Royaume Uni, Bulgarie) et de différentes régions de France (Hauts-de-France, Normandie, Bretagne, Vendée, Charente Maritime, Gironde, Hérault). 100% des souches ont été détectés.</p> <p>En revanche, il n'est pas possible de discriminer les sous-espèces entre elles via cette PCR temps réel multiplex.</p>
- Bactérie du groupe <i>Splendidus</i>	<p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : sur les 21 espèces présentes au sein du groupe <i>Splendidus</i>, 17 semblent être détectées par cette PCR (81% d'identité). Les 4 espèces non reconnues sont <i>Vibrio apostichopi</i>, <i>V. bathopelagicus</i>, <i>V. gallaecicus</i> et <i>V. pelagius</i>. Cependant, toutes les souches des espèces <i>V. chagasii</i> et <i>V. fortis</i> ne sont pas reconnues par cette PCR multiplex.</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 333 souches appartenant à 17 espèces du groupe <i>Splendidus</i> (confirmation par séquençage) issus de différents hôtes (<i>Magallana gigas</i>, <i>Ostrea edulis</i>, <i>Ruditapes philippinarum</i>, <i>Cerastoderma edule</i>, <i>Mytilus edulis</i>, poisson), de différents pays (Australie, USA, Espagne, Italie, Brésil) et de différentes régions de France (Hauts-de-France, Normandie, Bretagne, Vendée, Charente Maritime, Gironde, Hérault) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2 souches de <i>V. artabrorum</i> : 100% des souches ont été détectés, - 3 souches de <i>V. atlanticus</i> : 100% des souches ont été détectés, - 1 souche de <i>V. celticus</i> : 100% des souches ont été détectés - 18 souches de <i>V. chagasii</i> : 78% des souches ont été détectés, - 3 souches de <i>V. coralliirubri</i> : 100% des souches ont été détectés,

	<ul style="list-style-type: none"> - 16 souches de <i>V. crassostreae</i> : 100% des souches ont été détectés, - 4 souches de <i>V. cyclitrophicus</i> : 100% des souches ont été détectés, - 7 souches de <i>V. fortis</i> : 86% des souches ont été détectés, - 1 souche de <i>V. gallaecicus</i> : 0% des souches ont été détectés, - 5 souches de <i>V. gigantis</i> : 100% des souches ont été détectés, - 12 souches de <i>V. lentus</i> : 100% des souches ont été détectés, - 8 souches de <i>V. kanaloae</i> : 100% des souches ont été détectés, - 1 souche de <i>V. pelagius</i> : 0% des souches ont été détectés, - 4 souches de <i>V. pomeroyi</i> : 100% des souches ont été détectés, - 238 souches de <i>V. splendidus</i> : 100% des souches ont été détectés, - 4 souches de <i>V. tasmaniensis</i> : 100% des souches ont été détectés, - 2 souches de <i>V. toranzoniae</i> : 100% des souches ont été détectés, <p>Les espèces <i>Vibrio apostichopi</i>, <i>V. bathopelagicus</i>, <i>V. syngnathi</i> et <i>V. echinoideorum</i> n'ont pas été testées.</p>
<p>Exclusivité</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Vibrio aestuarianus</i> - Bactérie du groupe <i>Splendidus</i> 	<p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : aucune autre bactérie ni aucun organisme pathogène pouvant infecter les mollusques marins n'ont été détectés.</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 42 espèces du genre <i>Vibrio</i> appartenant au clade <i>Anguillarum</i> (1 souche), <i>Coralliilyticus</i> (2 souches), <i>Halioticoli</i> (3 souches), <i>Harveyi</i> (5 souches), <i>Mediterranei</i> (4 souches), <i>Nereis</i> (1 souche), <i>Nigripulchritudo</i> (1 souche), <i>Orientalis</i> (5 souches), <i>Splendidus</i> (17 souches) et aux espèces <i>V. tapetis</i> (1 souche), <i>V. cortegadensis</i> (1 souche) et <i>V. pacini</i> (1 souche). Aucune souche n'a présenté d'amplification avec cette PCR temps réel.</p> <p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : aucune autre bactérie ni aucun organisme pathogène pouvant infecter les mollusques marins n'ont été détectés.</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 27 espèces du genre <i>Vibrio</i> appartenant au clade <i>Anguillarum</i> (3 souches), <i>Coralliilyticus</i> (2 souches), <i>Halioticoli</i> (3 souches), <i>Harveyi</i> (5 souches), <i>Mediterranei</i> (4 souches), <i>Nereis</i> (1 souche), <i>Nigripulchritudo</i> (1 souche), <i>Orientalis</i> (5 souches) et aux espèces <i>V. tapetis</i> (1 souche), <i>V. cortegadensis</i> (1 souche) et <i>V. pacini</i> (1 souche). Aucune souche n'a présenté d'amplification avec cette PCR temps réel.</p>

Répétabilité	<p>100% d'accord entre duplicat sur 115 souches de l'espèce <i>Vibrio aestuarianus</i>.</p> <p>100% d'accord entre duplicat sur 42 souches n'appartenant pas à l'espèce <i>Vibrio aestuarianus</i>.</p> <p>100% d'accord entre duplicat sur 119 souches appartenant au groupe <i>Splendidus</i>.</p> <p>100% d'accord entre duplicat sur 27 souches n'appartenant pas au groupe <i>Splendidus</i>.</p>
--------------	--

Annexe 1 : Composition des milieux bactériologiques

Les milieux donnés ici ne sont qu'à titre indicatif. Il est possible d'utiliser d'autres milieux tant qu'ils permettent la croissance des bactéries du genre *Vibrio*.

Milieu gélosé Marine Agar

Utilisation d'un milieu commercial

Produit	Quantité	Référence
Marine agar commercialisé (marque Condalab)	55,1 g	777309
Eau distillée	1 L	-
Porter le milieu à ébullition puis autoclaver.		

Milieu gélosé Zobell

Produit	Quantité
Peptone	4 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
<i>Phosphate ferrique (facultatif)</i>	100 mg
Eau de mer ou eau de mer artificielle	1 L qsp
Ajuster le pH à 7,4 avant autoclavage et autoclaver	

Milieu gélosé LB-agar 2% NaCl (MILLER)

Utilisation d'un milieu commercial

Produit	Quantité	Référence
LB-agar (MILLER) commercialisé (marque MERCK)	37 g	1.10283.0500
NaCl	10 g	
Eau distillée	1 L	-
Autoclaver		

Milieu Zobell liquide

Produit	Quantité
Peptone	2 g
Extrait de levure	0,5 g
Eau de mer ou eau de mer artificielle	500 mL qsp
Ajuster le pH à 7,4 avant autoclavage. Aliquoter dans des flacons de 10 ou 20 mL par exemple et autoclaver	

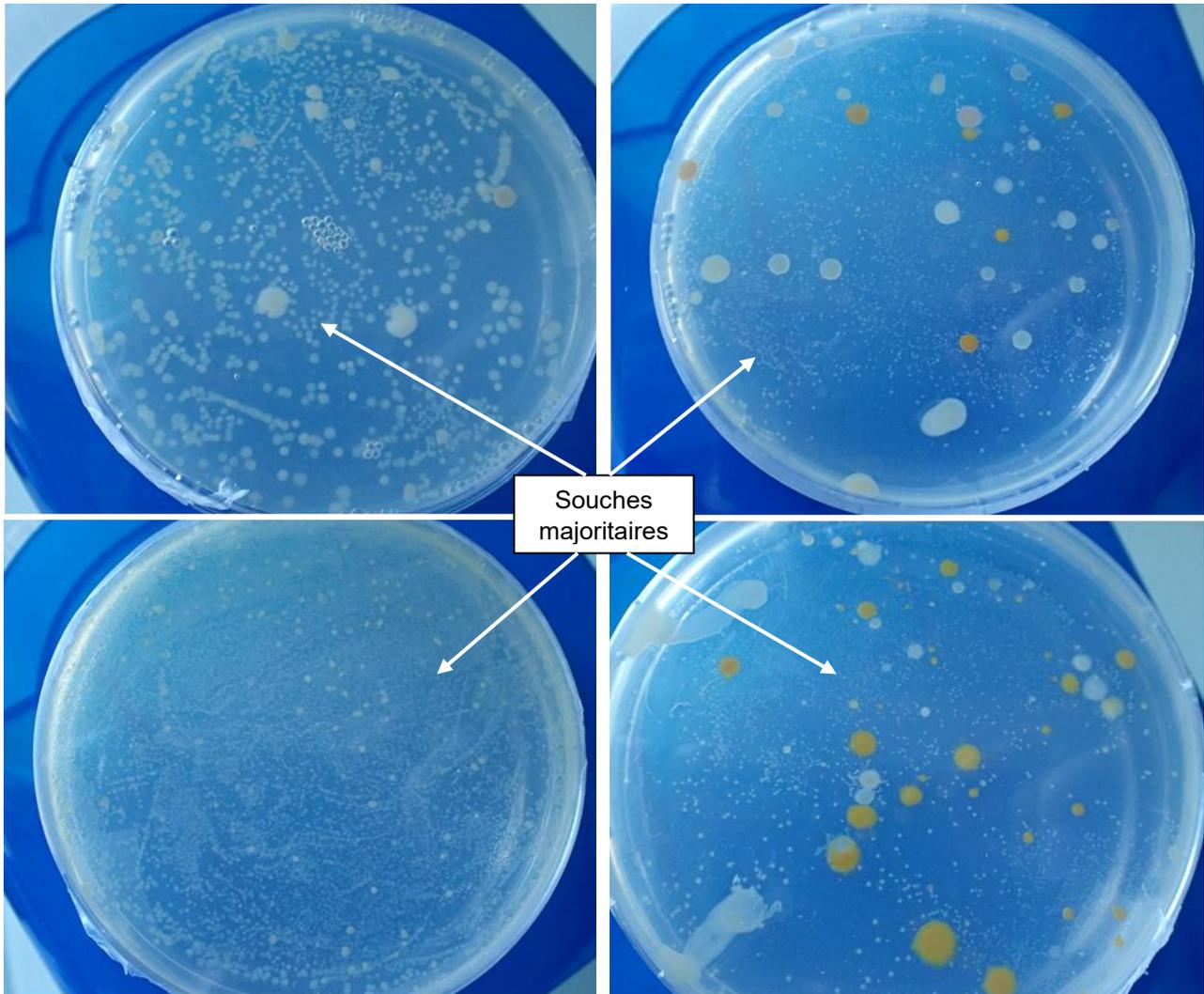
Milieu de conservation des souches bactériennes

Produit	Quantité
Glycérol	40 mL
Zobell liquide	10 mL
Aliquoter dans des flacons de 10 ou 20 mL par exemple et autoclaver	

Eau de mer artificielle

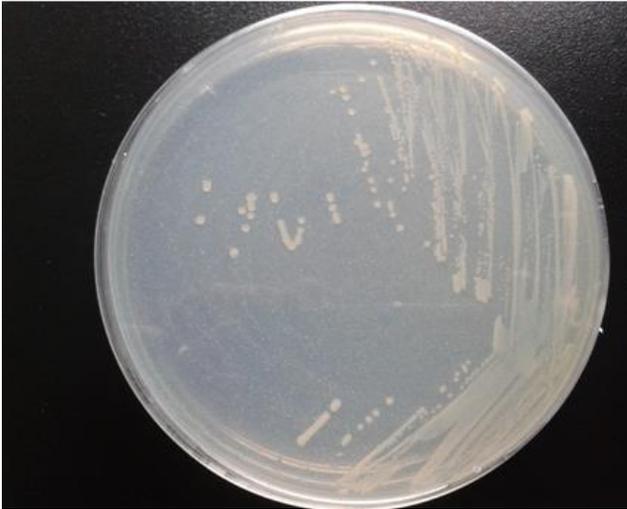
Produit	Quantité
NaCl	23 g (2,3%)
KCl	1,49 g (20 mM)
MgSO ₄	1,23 g (5 mM)
CaCl ₂	0,29 g (2 mM)
Eau distillée	qsp 1 L
Aliquoter dans des flacons de 10 ou 20 mL par exemple et autoclaver	

Annexe 2 : Photographies de milieux gélosés (Marine Agar) présentant différents types bactériens majoritaires



Annexe 3 : Photographies de souches de *Vibrio aestuarianus* et de souches du groupe *Splendidus*

Vibrio aestuarianus



Bactéries du groupe *Splendidus*



Annexe 4 : Interprétation des résultats des témoins

Témoins négatifs		Interprétation / Action
T- Ext	T- PCR	
-	-	Valide
+	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape d' extraction , a minima pour les échantillons ayant des résultats positifs .
-	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , a minima pour les échantillons ayant des résultats positifs .
+	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , et si cela ne résout pas le problème, répéter l'analyse à partir de l'étape d'extraction .

Témoins positifs		Interprétation / Action
T+ Ext	T+ PCR	
+	+	Valide
-	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape d' extraction , a minima pour les échantillons ayant des résultats négatifs .
+	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , a minima pour les échantillons ayant des résultats négatifs .
-	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , et si cela ne résout pas le problème, répéter l'analyse à partir de l'étape d'extraction .

Résultat obtenu avec les témoins : « - » = non détecté, « + » = détecté.
Les résultats conformes sont en noir, les résultats non conformes sont en rouge.

T- Ext : Témoin négatif d'extraction (absence d'échantillon)

T+ Ext : Témoin positif d'extraction (souches bactériennes de référence)

T- PCR : Témoin négatif d'amplification (par exemple, eau)

T+ PCR : Témoin positif d'amplification (par exemple, plasmides)

FIN DU DOCUMENT