



HAL
open science

Annexe technique au diagnostic de laboratoire

Christian Michel, Jean-François Bernardet, Marc Morand

► **To cite this version:**

Christian Michel, Jean-François Bernardet, Marc Morand. Annexe technique au diagnostic de laboratoire. Santé des poissons, 2018, 10.15454/1.5332134223616055E12 . hal-02790141

HAL Id: hal-02790141

<https://hal.inrae.fr/hal-02790141>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

9

Annexes techniques au diagnostic de laboratoire

ANNEXE 1. Diagnostic des principales bactéries ichthyopathogènes

Outre que la méthodologie moléculaire s'est développée à point pour remédier, souvent par substitution, aux difficultés croissantes rencontrées dans l'application des outils traditionnels à l'étude phénotypique des bactéries, il n'était plus question de fournir dans le cadre d'un ouvrage comme *Gestion de la santé des poissons*¹ et ses compléments, ne serait-ce qu'en raison de leur foisonnement, les clés de détermination permettant d'aboutir à l'identification précise des espèces ichthyopathogènes. Toutefois, au fur et à mesure que se développaient les outils modernes de détection et d'identification, la plupart des auteurs ont insisté sur l'importance de procéder à la vérification des caractères phénotypiques, au moins au niveau générique, avant de statuer sur la nature d'une souche au seul vu de résultats génomiques. De même, la démarche de validation d'une nouvelle espèce impose d'en établir le descriptif. Nous présentons donc à la fin de cette annexe quelques tableaux relatifs aux caractéristiques des groupes ou de certaines espèces pouvant être utiles à considérer dans le cas des bactéries rencontrés en aquaculture et plus généralement chez les poissons. Dans de nombreux cas la consultation régulière d'ouvrages techniques, ou mieux encore, la recherche sur Internet de données et d'articles intégrant les développements les plus récents de la taxonomie microbienne sont quasiment requises. Il n'est pas rare, en fait, que la distinction précise des espèces nouvelles échappe aux moyens fondés sur la détermination de critères phénotypiques ou que l'extrême spécialisation des caractères retenus soit incompatibles avec les activités d'un laboratoire classique. Il faut bien dans de tels cas se contenter d'un diagnostic de genre.

Un bref formulaire des techniques milieux et réactifs couramment employés en laboratoire car bien adaptés à la microbiologie, à la mycologie, voire à l'observation de certains microparasites des poissons, fait l'objet d'une seconde annexe (Annexe 2). Dans le présent texte, les termes marqués d'un astérisque (*) renvoient à ce formulaire.

¹ Michel C. (coord.), 2018. *Gestion de la santé des poissons*. Editions Quae, coll. Savoir faire, 480 p.

1. L'identification des principaux groupes de bactéries pathogènes

Entérobactéries (tableau 1)

La variété des systèmes de diagnostic commerciaux (galeries API 20 E en particulier) et l'abondance de la documentation accessible, relayée par les bases de données développées en appui aux analyses MALDI-TOF, compensent la complexité taxonomique de ce groupe bactérien et suffisent à distinguer les espèces ichtyopathogènes des autres formes communément isolées de l'eau. Une difficulté particulière est venue de la description d'*Edwardsiella piscicida* (Abeyneth *et al.* 2013), qui fait partie des espèces autrefois confondue avec *E. tarda*, et qui phénotypiquement ne s'en distingue que par très peu de caractères vraiment fiables (tableau 1).

On peut admettre qu'à l'exception des *Edwardsiella* et de *Yersinia ruckeri*, toutes les entérobactéries isolées de poissons sont des agents opportunistes occasionnels dont l'impact reste mineur. Les genres *Citrobacter*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Yersinia*, et à moindre degré *Proteus/Providencia* et *Klebsiella* sont bien représentés dans les eaux libres. Dans les régions urbanisées ou à forte densité de cheptel, les rejets d'eaux usées et les effets de ruissellement peuvent localement modifier la charge organique et accroître la diversité des souches rencontrées.

L'identification de formes hautement pathogènes, souvent dites « hypervirulentes » (voir Compléments, chapitre 7²), peut être un enjeu important. C'est le cas du biotype 2 de *Y. ruckeri*, dont les représentants appartiennent au sérotype O1 mais sont immobiles et négatifs pour l'hydrolyse du Tween 80.

Vibrionacées et aéromonadacées (tableaux 2 à 6)

Les anciennes vibrionacées (tableau 2), ont éclaté en plusieurs familles qui se distinguent des entérobactéries par la présence d'une oxydase. Bien que *Plesiomonas* soit génétiquement apparenté aux entérobactéries, son oxydase l'a longtemps fait inclure dans les ex-vibrionacées, dont il se différencie par ses décarboxylases positives, l'absence de fermentation du mannitol et de la plupart des sucres en galerie API 20 E, la formation d'indole, l'absence d'uréase et de gélatinase. *Plesiomonas* est un composant commun de la flore des poissons, surtout en eaux chaudes, où il peut transitoirement exprimer des propriétés opportunistes. Parmi les autres genres, *Aeromonas*, *Photobacterium* et *Vibrio* renferment des espèces ichtyopathogènes dont certaines ont un impact économique considérable.

Les *Aeromonas* (tableau 3) se rencontrent principalement dans les eaux douces. A vrai dire, leur cas n'est pas sans équivoque si l'on cherche à intégrer les connaissances systématiques issues tout d'abord du milieu médical (Abbott *et al.* 2003), *a fortiori* si l'on prend en compte la diversité bien supérieure des germes de l'environnement. La distinction traditionnelle avec les vibrions a dû être révisée et ne repose plus guère que sur la résistance au composé vibriostatique O/129 (encore cette dernière souffre-t-elle

² Michel C., Bernardet J-P., 2018. Bactéries et bactérioses des poissons. INRA, [en ligne], doi : 10.15454/1.5332142567947024E12

des exceptions) et sur une aptitude générale à croître en absence de sel qui peut aisément être évaluée en eau peptonée. Les hybridations ADN/ADN laissent soupçonner depuis longtemps l'existence de 14 groupes génomiques au moins, qui pour la plupart ont maintenant reçu des noms et ne devraient plus être sensiblement modifiés. On distinguait jusque là deux grands types d'*Aeromonas*, opposant des mésophiles actifs à 37 °C, généralement mobiles et non pigmentés, à des psychrophiles ne supportant pas 35 °C, immobiles, souvent producteurs de pigment mélanique soluble et présentant presque constamment une tendance marquée à l'autoagglutination et à la sédimentation en milieu liquide. En fait, les résultats du diagnostic moléculaire, contredisant régulièrement ceux des méthodes microbiologiques (Borrell *et al.* 1997 ; Castro-Escarpulli *et al.* 2003), ont mis en évidence chez les poissons la dominance jusque là insoupçonnée de souches mobiles de *A. salmonicida* (déjà signalées par Janda *et al.* 1996) et de *A. bestiarum*, qui sur le plan phénotypique se rapprochent nettement du complexe *A. hydrophila*. Une grande incertitude plane donc sur le diagnostic de ces agents et sur la nature réelle de nombreuses souches ichtyopathogènes que l'on identifiait, jusqu'à l'approche des années 2010, comme des *A. hydrophila*.

Parmi les autres formes mobiles, il n'est pas rare que *A. veronii* biovar *veronii* (dont la similitude avec *A. ichthyosmia* reste contestée) soit responsable d'infections opportunistes chez les poissons d'étang, de même que *A. jandaei* chez l'anguille. *Aeromonas eucrenophila*, *A. encheleia*, *A. allosaccharophila*, sont plus vraisemblablement de simples commensaux. Rappelons enfin que des aéromonades sans incidence clinique notable (*A. sobria*) ou causant des infections chez l'homme et les mammifères, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. enteropelogenes* (= *A. trota*), se rencontrent fréquemment dans les eaux. La plupart des formes immobiles appartiennent aux sous-espèces d'*A. salmonicida* (tableau 4), les mieux définies étant *A. salmonicida salmonicida*, surtout isolée de salmonidés, et *A. salmonicida smithia* (anciennement *nova*), agent de l'érythrodermatite de la carpe et de l'*ulcer disease* du carassin. La nature des souches responsables de l'*ulcer disease* de la truite (anciennement *Haemophilus piscium*) et de nombreuses souches isolées de poissons variés est beaucoup moins évidente. Des caractères inattendus sont exceptionnellement relevés : oxydase négative, croissance à 37 °C ou aspect aérobique strict en gélose VF (cas des souches isolées des perches du lac d'Annecy en 1979).

Bien que Borrell *et al.* (1997) et Figueras *et al.* (2000) aient recouru à la RFLP pour établir des schémas d'identification, ceux-ci restent assez compliqués et aucune des techniques moléculaires mises en œuvre, pas plus que la spectrométrie de masse, n'ont réussi jusqu'ici à lever toutes les incertitudes du diagnostic des *Aeromonas*, tant la distinction entre certaines espèces apparaît ténue. De même, l'immunologie est peu utilisée car les nombreux sérogroupes reconnus ne recourent pas le découpage en espèces. Leur intérêt est surtout épidémiologique, certains paraissant plus fréquemment associés aux propriétés infectieuses (Janda *et al.* 1996). Les tableaux 3 et 4 visent donc surtout à donner un aperçu des principales espèces actuellement reconnues, dont certaines pourraient bientôt devenir des références dans le domaine de l'ichtyopathologie.

La détermination des *Vibrio* est encore plus problématique si l'on considère que plus de 130 espèces sont présentement recensées, et qu'à la différence de celui des *Aeromonas* leur inventaire est probablement loin d'être clos. Là encore, les techniques d'identification classiques suffisent de moins en moins au diagnostic (Thompson *et al.* 2004). Des caractères autrefois considérés comme fondamentaux (forme en virgule, oxydase positive, sensibilité au composé O/129, absence d'ADH) sont devenus caducs ou sujets à exceptions, de sorte que des approches dichotomiques du type de celle

qu'avaient proposées Alsina et Blanch (1994a et b) ne sont plus applicables. Toutefois, une démarche raisonnée fondée sur la combinaison de quelques principes simples devrait permettre à un bactériologiste averti et disposant d'un peu de temps de s'orienter sans trop risquer l'erreur.

Les critères les plus sûrs pour distinguer les vibrions des aéromonadacées ou des entérobactéries demeurent en fait la morphologie (appréciable en microscopie), les types de mobilité et de flagellation (observée si possible après coloration spéciale*) et le comportement à différentes salinités (déterminé en eau peptonée enrichie à diverses concentrations de NaCl). Sans s'attarder sur les souches d'eau douce, généralement bien connues des laboratoires et parmi lesquelles des *V. cholerae* non agglutinogènes et apparemment dépourvus de pouvoir pathogène sont assez fréquemment trouvés sur poissons, on peut noter que d'autres propriétés, ainsi que l'origine du prélèvement (tableau 5), permettent de formuler des hypothèses simples ou de préciser le champ des interrogations avant de s'engager dans l'identification spécifique. Comme pour les *Aeromonas*, la contribution des techniques classiques, pour imparfaites qu'elles soient, peut apporter quelque commodité dans le diagnostic des vibrions.

Le tableau 6 dresse pour les espèces réputées ichtyopathogènes une liste de caractères utiles à leur détermination. Remarquons ici que les nombreux vibrions décrits en relation avec la flore normale des poissons marins n'ont pas été pris en compte dans cette présentation. De même, le catalogue des agents pathogènes d'invertébrés (mollusques et crustacés) ne cesse de s'étoffer. Pour ces raisons, des associations plus ou moins fortuites à des prélèvements de poissons ne peuvent jamais être exclues. Il appartiendra alors au diagnosticien de compléter sa documentation auprès des sources spécialisées.

Bactéries à Gram négatif aérobies strictes (tableau 7)

Les *Pseudomonas* sont abondants en milieu marin, mais certains fréquentent les eaux douces et leur association aux poissons est assez générale. Toutefois, ce sont des espèces appartenant, au moins sur le plan génétique, au groupe des *Pseudomonas* fluorescents qui sont les plus fréquemment isolées, et bien que la plupart ne soient probablement qu'opportunistes, c'est parmi elles que se rencontrent les formes les plus pathogènes. *Pseudomonas anguilliseptica* s'est acquise une fâcheuse réputation en aquaculture marine. Sa culture est laborieuse et certains caractères, comme la mobilité, sont difficiles à observer, le meilleur moyen étant de recourir à la coloration des flagelles* après culture à une température d'environ 15 °C. L'identification des représentants les plus classiques du groupe fluorescent ne présente pas de difficulté particulière pour un laboratoire de diagnostic vétérinaire (tableau 7) mais l'apparition régulière d'espèces créées sur la base de comparaisons génomiques est venue compliquer la situation. Le séquençage des gènes *gyrB* et *rpoD* s'est heureusement révélé très efficace pour statuer dans les cas douteux. Si la production de pigment n'est pas toujours évidente, toutes les souches possèdent une ADH et aucune n'accumule de β -polyhydroxybutyrates. Une espèce proche, *P. fragi*, qui se distingue par l'assimilation du maltose, est assez souvent signalée dans les chaînes de transformation alimentaire de poisson.

Parmi les autres groupes, *Stenotrophomonas maltophilia* et *P. stutzeri*, ce dernier généralement reconnaissable à la morphologie plissée radialement de ses colonies, se rencontrent occasionnellement sur des poissons d'eau douce. Il n'est pas non plus

exceptionnel d'isoler des *Pseudomonas* authentiques ou des organismes apparentés formant de maigres colonies pigmentées en jaune et difficiles à déterminer, qui devront en tout état de cause être différenciés des flavobactéries. Un exemple typique est *Brevundimonas paucimobilis*.

A mi-chemin des pseudomonadacées et des vibrionacées se trouvent diverses familles de création plus récente (Ivanova *et al.* 2004), dont certaines sont capables d'anaérobiose facultative, et dont les progrès de la microbiologie marine ont contribué à révéler l'abondance. Certains agents ichtyopathogènes mineurs y ont été tardivement renvoyés. Tel est le cas de *Moritella viscosa*, considérée encore récemment comme une vibrionacée et que nous avons laissée par commodité dans le tableau 6, de *Pseudoalteromonas*, responsable d'infections graves chez des poissons d'ornement, et de *Shewanella putrefaciens*. Fréquemment associée aux poissons, cette dernière (anciennement *Pseudomonas*, puis *Alteromonas*) a été récemment démembrée en plusieurs espèces. Aérobie ou microaérophile, elle tend à pousser en profondeur en gélose VF, et apparaît plus typiquement aérobie en Mevag. L'aspect beige rosé des colonies, fortement odorantes, et la production d'H₂S en milieu de Kligler-Hajna contribuent à lever le doute. Concurrément à différents *Vibrio* certains représentants de ces familles, *Shewanella algae*, *Pseudoalteromonas tetraodonis*, affichent un intérêt plus hygiénique et plus anecdotique. Ils contribuent à l'élaboration de la redoutable toxine du fugu.

Proches des *Moraxella*, les *Acinetobacter* sont de gros coccobacilles aérobies stricts, immobiles, surtout caractérisés par leur morphologie trapue, leur faible décolorabilité au Gram, et l'absence d'oxydase qui les différencie des moraxelles. *Acinetobacter calcoaceticus* a longtemps été le seul représentant du genre associé à des troubles cliniques observés sur poissons mais la nature exacte des souches incriminées peut paraître suspecte quand on sait que l'espèce a été scindée en plusieurs autres que les pathologistes commencent à citer, notamment, *A. baumannii*, *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. pittii* et *A. johnsonii*. La question est au reste secondaire car ces agents, souvent rencontrés sur poissons, sont probablement des opportunistes sévissant dans des conditions particulières d'élevage intensif. L'intérêt hygiénique est en revanche sérieux, tous étant plus ou moins incriminés dans des infections nosocomiales et multirésistants aux composés antimicrobiens. Le diagnostic est souvent compliqué par l'existence d'étroites parentés (comme dans le complexe *Acinetobacter calcoaceticus* – *baumannii*, dit ACB) mais là aussi le séquençage (ARNr-16S, *ropD*, *gyrB*) apporte une aide précieuse.

Flavobactériacées (tableaux 8 à 11)

Après une longue période d'errance taxonomique, les bactéries de la famille des flavobactériacées (Bernardet *et al.* 1996 et 2002) couramment retrouvées chez des poissons malades sont désormais classées dans les genres *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, et *Tenacibaculum*. Le tableau 8 présente les principaux caractères permettant de différencier ces 4 genres. Les deux espèces du genre *Elizabethkingia*, encore récemment incluses dans le genre *Chryseobacterium*, en ont été séparées sur la base de quelques caractères biochimiques et surtout de leur absence de pigmentation. Les caractères distinctifs des espèces appartenant aux 4 genres sont présentés dans les tableaux 9, 10 et 11. Pour les genres *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* et *Elizabethkingia*, seules ont été incluses les espèces impliquées en pathologie des poissons ou susceptibles d'être rencontrées dans les eaux, mais il en existe bien d'autres dans les sols ou les milieux polaires (Bernardet et Bowman, 2006;

Bernardet *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2001). Alors que les *Flavobacterium* et les *Elizabethkingia* aquatiques ne se trouvent qu'en eau douce et que les *Tenacibaculum* ne se rencontrent qu'en mer, les différentes espèces de *Chryseobacterium*, pour la plupart halotolérantes et capables de pousser sur des milieux enrichis en sel, se trouvent aussi bien en mer qu'en eau douce.

Comme il apparaît dans les tableaux, des caractères assez particuliers sont nécessaires à l'identification des 4 genres et de leurs espèces. Les méthodes, pour les mettre en évidence, sont précisées dans les notes accompagnant les tableaux ou dans le formulaire technique de l'Annexe 2. La présence de pigments jaunes de type flexirubine (par opposition aux caroténoïdes) caractérise les *Chryseobacterium* et certains *Flavobacterium*. Des colonies jaune pâle, plates, étalées, adhérentes à la gélose ou collantes, à bord irrégulier, rhizoïde ou filamenteux et adsorbant le rouge Congo doivent immédiatement faire penser à *F. columnare* en eau douce et à *T. maritimum* en mer. *Flavobacterium hydatis* et *F. johnsoniae* produisent eux aussi des colonies typiques, très fines et envahissantes. La mobilité par glissement (par opposition à la mobilité ciliaire et flagellaire) et la formation de sphéroplastes (cellules arrondies dégénérées) dans les cultures liquides en phase stationnaire ne se rencontrent que chez certaines espèces de *Flavobacterium* et de *Tenacibaculum*. La plupart des *Flavobacterium* pathogènes pour les poissons (tableau 9) présentent un glissement actif, mais seules quelques souches de *F. psychrophilum* en sont capables, et la mobilité n'a jamais été observée chez *F. branchiophilum*. Outre l'adsorption du rouge Congo, *Tenacibaculum maritimum* et *T. ovolyticum*, pathogènes pour les poissons ou leurs œufs, se distinguent par la production de sphéroplastes et par l'épaississement des cultures en milieu liquide (tableau 11). Le comportement sur différents milieux de culture apporte aussi d'utiles indications. Les espèces de *Chryseobacterium* qui nous intéressent ici se distinguent d'après leur capacité à croître sur le milieu au cétrimide et celui de MacConkey. Quant à l'incapacité à croître sur des milieux marins tels le Marine Agar 2216E (Difco), elle ne se rencontre que chez les *Flavobacterium* pris en compte dans cet ouvrage (à l'exception de *F. flevense*, qui vit pourtant en eau douce).

Outre ces caractères un peu particuliers, les flavobactéries ichtyopathogènes se distinguent grâce à des caractères physiologiques et biochimiques plus classiques, tels la tolérance thermique, l'acidification de différents hydrates de carbones, la dégradation de certains substrats et la production d'H₂S ou d'indole (tableaux 8 à 11). Les membres des genres *Chryseobacterium* et *Elizabethkingia meningoseptica* sont cependant les seuls à pouvoir être correctement identifiés en pratique grâce aux galeries API 20NE incubées à la température recommandée par le fabricant (30°C). La plupart des autres flavobactéries ne supportent pas cette température et/ou exigent un milieu salé. Les galeries API ZYM, qui ne requièrent pas la croissance des bactéries, fournissent des profils assez constants et peuvent aider à l'identification des principales espèces. En particulier, elles permettent de vérifier que les deux *Flavobacterium* pathogènes majeurs (*F. columnare* et *F. psychrophilum*) ne dégradent aucun des sucres présents dans les galeries. Quant aux techniques biochimiques sophistiquées telles que les analyses des protéines totales et des acides gras, si on a bien montré que les profils qu'elles génèrent sont spécifiques d'espèce ou de genre elles sont trop lourdes pour justifier des applications diagnostiques pratiques et seule la spectrométrie de masse MALDI-TOF paraît susceptible d'apporter des progrès très attendus. L'origine du prélèvement peut enfin guider l'identification des flavobactéries : les *Tenacibaculum* ne peuvent provenir que de poissons marins, *F. psychrophilum* de salmonidés (à de très rares exceptions près), *F. branchiophilum* de lésions des branchies, etc.

Bien que différents sérotypes aient été décrits chez *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum* et *F. branchiophilum*, ainsi que chez *Tenacibaculum maritimum*, la sérologie n'a guère été appliquée en pratique aux flavobactéries, en particulier parce que les différentes techniques utilisées n'aboutissent pas toujours au même nombre de sérotypes (Izumi *et al.* 2003) et parce que des réactions croisées assez nombreuses compliquent la préparation des sérums. La mise au point d'une méthode de typage fondée sur la PCR multiplex et susceptible de permettre la caractérisation des sérotypes chez *Flavobacterium* (Rochat *et al.* 2017 ; voir GSP, chapitre 2³) pourrait toutefois assez prochainement modifier cet état de fait. Eprouvée et validée sur une trentaine de souches de *F. psychrophilum*, après séquençage des génomes complets et identification des gènes responsables de la spécificité antigénique, elle devrait pouvoir s'appliquer à d'autres espèces de la famille. D'autres techniques moléculaires (voir GSP, chapitre 2⁴) sont disponibles pour détecter spécifiquement les flavobactéries dans les prélèvements, pour les identifier lorsqu'elles sont isolées en culture (PCR), pour distinguer les différentes espèces (par exemple la RAPD appliquée aux *Flavobacterium*) ou pour typer les collections de souches (ribotypie, RFLP du gène de l'ARNr 16S amplifié, MLST et ses variantes). L'emploi généralisé dans la dernière décennie de la MLST, sur *F. psychrophilum* d'abord puis d'autres espèces de la famille, a considérablement fait progresser les approches épidémiologiques de ces agents et contribué à banaliser le typage moléculaire pour assurer la traçabilité de leurs variants génétiques (voir Compléments, chapitre 7⁵).

Mycobacterium et Nocardia (tableau 12)

La confrontation à un syndrome d'infection granulomateuse devant entraîner automatiquement la réalisation de colorations microbiennes sur frottis ou empreintes, le caractère acido-alcoolo-résistant (AAR) des mycobactéries n'échappe généralement pas à l'investigateur (voir GSP, figure 2.17). La détermination des espèces est plus délicate. Les mycobactéries pisciaires se prêtent généralement bien à la culture sur milieux bactériologiques, autorisant le recours à des galeries d'identification conventionnelles (tableau 12), mais la description d'espèces nouvelles fondées sur les applications moléculaires et indiscernables sur des arguments phénotypiques ne permet plus de s'en contenter. En cas d'incertitude, la restriction enzymatique (PCR-RFLP) ou le séquençage du gène de l'ARN 16S ou du gène *rpoB* ont d'abord paru les méthodes les plus commodes à mettre en œuvre. (Talaat *et al.* 1997; Lee *et al.* 2000). Depuis les années 2010 c'est cependant la spectrométrie de masse dans sa version MALDI-TOF, à laquelle les mycobactéries ont offert des applications assez convaincantes, qui semble gagner la faveur (Biswas et Rolain, 2013). Les tentatives d'adaptation dédiées aux espèces pathogènes des poissons sont toutefois encore exceptionnelles (Kurokawa *et al.* 2013).

Le caractère AAR, même s'il est moins prononcé que chez les mycobactéries, tout comme l'amorce de formes filamenteuses branchées facilitent généralement le diagnostic de nocardiose sur des critères morphologique (GSP, figure 2.16). L'identification spécifique se heurte aux mêmes problèmes que celle des mycobactéries.

³ De Kinkelin P., Michel C., Morand M., Bernardet J-F., Castric J., Morin T. 1999. Le diagnostic de laboratoire. In : *Gestion de la santé des poissons* (C. Michel coord.), collection Savoir faire, éditions Quae, Versailles, p 182.

⁴ Ibid., 145-157.

⁵ Michel C, Bernardet J-P, 2018. Bactéries et bactérioses des poissons. op. cit., 63-65.

Des clés de détermination faisant appel à la RFLP ont été proposées pour pallier à cet inconvénient (Conville et Witebsky, 2004). Les profils de restriction des espèces exclusivement ichtyopathogènes n'y figurent pas mais pourraient être utilement établis. Remarquons que si la culture de ces souches ne pose pas d'autre problème que sa lenteur, car contrairement à *Nocardia asteroides* elles ne poussent pas à 37 °C, l'extraction de l'ADN peut présenter quelques difficultés. Il reste que comme pour les mycobactéries, et de manière générale les autres genres de bactéries AAR d'intérêt médical, le MALDI-TOF suscite un intérêt croissant. Les auteurs n'en conseillent pas moins de con quelques caractères morphologiques et cultureux classiques pour étayer les conclusionrôlers.

Le recours à l'immuno-histochimie peut également apporter certains bénéfices dans le diagnostic rapide de ce type d'infections, bien que des réactions croisées puissent être rencontrées.

Renibacterium salmoninarum

Il n'est guère besoin d'insister sur le cas des *Bacillus*, des microcoques et des staphylocoques qu'on isole parfois en milieu aquatique. Tous ont leurs équivalents chez les animaux supérieurs. Le seul agent à Gram positif vraiment particulier aux poissons est *Renibacterium salmoninarum*, dont les exigences thermiques et nutritives et le métabolisme extrêmement lent impliquent une incubation de l'ordre de 3-4 semaines à 15 °C et se prêtent mal à la réalisation de galeries d'identification. C'est pourquoi des méthodes rapides de diagnostic fondées sur l'immunofluorescence indirecte, l'ELISA, la PCR et plus récemment la qRT-PCR, qui permet d'attester la viabilité des bactéries, ont très vite été développées pour suppléer la mise en culture. Comme *Renibacterium* a fait l'objet d'intenses efforts de détection et d'éradication, une littérature abondante existe à ce sujet et des réactifs spécifiques sont disponibles sur le marché. Les méthodes fondées sur l'immunologie, immunofluorescence et l'Elisa en particulier, ont joué un grand rôle dans la mise en place de programmes de lutte sanitaire, ceci grâce à la production nettement dominante d'une protéine soluble de 57 kD, la p57 ou MAP (major antigenic protein) qui reste largement liées à la surface des corps bactériens. La signification de p57 en termes de virulence reste mal déterminée mais son pouvoir immunogène a permis de l'employer avec profit, tant pour le diagnostic que pour les approches vaccinales, avant que les techniques d'amplification génétique ne soient vulgarisées. De manière intéressante, les résultats de la qRT-PCR appliquée à des prélèvements de mucus cutané sont apparus corrélés à l'importance de l'infection, telle qu'évaluée sur des prélèvements de tissu rénal. Ce constat a ouvert des possibilités de contrôles systématiques n'impliquant pas le sacrifice des sujets examinés (Elliott *et al.* 2015).

Bactéries lactiques

L'importance croissante de ces bactéries a confronté les laboratoires de diagnostic à de sérieux problèmes d'identification. L'emploi des galeries miniaturisées permet une caractérisation à peu près acceptable de certains agents réputés pathogènes de longue date, surtout si plusieurs systèmes sont combinés. Toutefois, outre que le temps requis s'en trouve allongé et que faute de documents de référence appropriés l'expérience personnelle reste déterminante dans l'interprétation des résultats, nous savons maintenant que toujours accru par de nouvelles descriptions, un grand nombre de

bactéries commensales, beaucoup plus difficiles à déterminer, peuvent introduire des confusions. Un travail de criblage fondé sur l'amplification et la restriction du gène de l'ARN 16S (Michel *et al.* 2007) nous avait permis de proposer des critères d'identification plus simples, plus rapides et surtout plus fiables que l'analyse biochimique (des exemples de profils sont rapportés dans le tableau 13) et de fait, la RFLA et ses variantes ont été d'un grand secours dès lors qu'on ne disposait pas d'idée préconçue sur la nature de la bactérie recherchée. Dans le cas contraire, une simple PCR pouvait évidemment apporter des garanties équivalentes (Berridge *et al.* 1998 ; Mata *et al.* 2004 ; Zlotkin *et al.* 1998). Compte tenu des prix actuels du séquençage il devient assez justifié de s'en remettre directement à cette étape bien que les méthodes d'amplification-restriction aient conservé tout leur crédit dans des domaines où la taille et la richesse des échantillons imposent leur propre logique, comme le contrôle alimentaire et la recherche de souches d'intérêt probiotique. Dernière venue, la chromatographie en phase gazeuse (MALDI-TOFF) semble bien avoir trouvé des applications privilégiées dans l'identification précise de ces bactéries.

Chlamydiacées, Piscirickettsia et Francisella

Le cas de ces bactéries n'est évoqué que pour mémoire dans cette section car, en dehors des premières approches fondées sur l'observation lésionnelle et microscopique, leur diagnostic reste très spécialisé. Dans le cas où "*Piscichlamydia*", les CLB (*Chlamydia*-like bacteria) et *Piscirickettsia salmonis* sont des agents à développement strictement intracellulaire, l'inoculation de cultures cellulaires ou la mise en œuvre de méthodes immuno-moléculaires restent les mieux adaptées à leur caractérisation. La culture sur lignées cellulaires ne paraît pas avoir été tentée avec succès pour les Chlamydiacées. Celle de *P. salmonis* recourt à des lignées particulières (CHSE-214 ou EPC) mais doit être opérée en absence d'antibiotiques, ce qui en rend le succès assez hasardeux. Au contraire, *Francisella* semble capable de croître sur gélose cœur-cystine enrichie de 1 à 5 % d'hémoglobine mais le développement des colonies requiert du temps, jusqu'à 15 jours à 25 °C, ce qui paraît peu conciliable avec une approche fondée sur l'analyse de caractères métaboliques. Les tentatives d'identification de ces bactéries de culture difficile fondées sur des démarches moléculaires (RT-PCR) restent trop neuves pour pouvoir proposer des critères de détermination de valeur générale mais il est, par ailleurs, encourageant de noter que la spectrométrie de masse a produit de bons résultats dans le cas de *F. tularensis* (Gravet et Gessier, 2013).

2. Tables d'identification bactérienne

Les tables de diagnostic rassemblées dans cette annexe ne prétendent pas à l'exhaustivité. Leur seule ambition est de fournir quelques éléments illustrant ou complétant selon les cas, pour les groupes d'agents les plus représentatifs de la bactériologie des poissons, les particularités ou les orientations actuelles de la démarche diagnostique. Elles s'adressent donc en première intention à des personnes déjà entraînées, disposant de l'expérience et de la documentation requises pour la pratique du laboratoire vétérinaire courant.

On remarquera que dans beaucoup de cas, ces seuls documents ne permettront pas de parvenir à une conclusion sans appel. Cela tient à la fois : à l'état encore lacunaire des connaissances relatives à certains taxons ; à la grande variabilité intra-spécifique des souches environnementales, qui oblige à approcher tout diagnostic de manière assez globale et sans accorder trop d'importance à des incohérences ponctuelles, (*a fortiori* s'il s'agit de lectures négatives) ; aux désaccords souvent rencontrés dans la littérature, qui reflètent l'hétérogénéité des méthodes d'étude employées par les différents auteurs.

Liste des tableaux

- 1 Orientation du diagnostic des entérobactéries les plus courantes chez les poissons
- 2 Orientation du diagnostic des vibronacées et aéromonadacées
- 3 Principaux *Aeromonas* mobiles susceptible d'être rencontrés en aquaculture
- 4 Caractère distinctif des *Aeromonas* immobiles
- 5 Caractéristiques particulières pouvant orienter rapidement le diagnostic de certains *Vibrio* ou d'agents apparentés
- 6 Espèces pathogènes de *Vibrio*, *Photobacterium* et *Moritella* chez les poissons
- 7 Bactéries ichtyopathogènes aérobies : *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*
- 8 Caractères différentiels des quatre genres de la famille des flavobactériacées contenant des espèces pathogènes pour les poissons
- 9 Caractères différentiels des espèces du genre *Flavobacterium* pathogènes des poissons ou rencontrées dans les eaux douces tempérées
- 10 Caractères différentiels des espèces de *Chryseobacterium* et *Elisabethkingia* pathogènes des poissons ou rencontrées dans les milieux aquatiques tempérées
- 11 Caractères différentiels des espèces de *Tenacibaculum*
- 12 Les mycobactéries des poissons
- 13 Taille des bandes d'ADN (en paire de bases) obtenues en gel d'agarose après digestion du gène d'ARN 16S par des endonucléases, chez les principales bactéries lactiques isolées de poissons.

Clés pour la lecture (sauf mention différente)

+ et - de manière générale cette notation reflète des caractères largement exprimés dans le groupe bactérien considéré, les exceptions n'excédant jamais 10 % des souches. Quand ces exceptions sont particulièrement rares ou acquièrent une signification diagnostique, elles peuvent être mentionnées entre parenthèses en seconde option [exemple : + /(-)].

d (ou v) ces signes, éventuellement complétés du sens de la tendance quand celle-ci est nette (d+ ou d-) rendent compte de la variabilité évoquée ci-avant.

[+] quelques souches de croissance lente peuvent exprimer des caractères tardifs, que nous signalons entre crochets [+], bien que pour beaucoup d'observateurs elles apparaîtront négatives.

± réfère à un caractère faiblement exprimé et souvent peu interprétable.

ND indique des caractères non documentés pour l'espèce considérée

Tableau 1a. Orientation du diagnostic des entérobactéries les plus courantes chez les poissons

	pigment	mobilité	VP/RM	PDATDA	uréase	indole	gaz	H ₂ S	citrate de Simmons	malonate	Tween 80	gélatinase	Dnase	LDC	ODC	ADH	ONPG	lactose	KCN
<i>Escherichia</i> spp	d (J) ⁷	d+	- / +	-	-	d	+	-	-	d	-	-	-	d	d	d-	+	d	-
<i>E. coli</i>	-	d ⁸	- / +	-	-	+	d ⁸	-	-	-	-	-	-	+	d+	d	+	+	-
<i>E. vulneris</i>	d (J)	+	- / +	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	d	+	-	-
<i>Salmonella</i> spp	-	+	- / +	-	-	-	+	+	+	d	-	d	-	+	+	-	-	-	-
<i>S. enterica arizonae</i>	-	+	- / +	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d	+	d-	-
<i>Citrobacter</i> spp. ¹	-	d+	- / +	-	d	d	+	d	d+	d	-	-	-	-	d	d	+	d	d+
<i>C. freundii</i>	-	+	- / +	-	d	-	+	d+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>C. braakii</i>	-	d+	- / +	-	d	-	+	d	+	-	-	-	-	-	+	+	d+	d+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ²	-	-	- / +	-	- / [+]	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	d
<i>Pantoea agglomerans</i> ³	+ (Rg)	+ ⁹	+ / d ⁹	d	-	-	- / [+]	-	d	+	+	+	-	-	-	d-	d	d	d+
<i>Hafnia alvei</i>	-	+ ⁹	+ / - ⁹	-	-	-	+ ⁹	-	-	[+]	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>Serratia "liquefaciens"</i> ⁴	-	+	+ / d	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	d	+	-	[+]
<i>S. plymuthica</i>	d (Rg)	+	+ / -	-	-	-	d	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	d
<i>S. fonticola</i>	-	+	- / +	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Providencia rettgeri</i> ⁵	-	+ ⁹	- / +	+	+	+	d-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Edwardsiella</i> spp	-	+	- / +	-	-	d+	+	d+	-	d	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. tarda</i>	-	+	- / +	-	-	+	+	+	-	d-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. anguillarum</i>	-	+	+ / +	-	-	+	+	+	+		d	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>E. ictaluri</i>	-	+ ⁹	- / +	-	-	-	+ ⁹	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-	-
<i>E. piscicida</i>	-	+	- / +	-	-	+	+	+	-		d	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Yersinia</i> spp ⁶	-	+ ⁹	d / d ⁹	-	+	d	-	-	d ⁹	-	d	-	d	-	+	-	+	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	-	+ ⁹	d / + ⁹	-	-	-	-	-	d ⁹	-	d	d	d	+	+	-	+	-	d
<i>Y. intermedia</i>	-	+ ⁹	+ / +	-	+	+	-	-	d ⁹	-	d	-	-	-	+	-	+	d	-

Notes tableau 1a

¹ la présence d'autres espèces sur poissons est probable, mais mal documentée.

² souches pourvues d'une capsule très nette

³ correspond aux anciens *Enterobacter agglomerans* et *Erwinia herbicola*. Les *Enterobacter* vrais se rencontrent en hygiène alimentaire

⁴ la distinction entre *S. liquefaciens*, *S. grimesii* et *S. proteomaculans* n'est généralement pas précisée dans les observations sur poissons

⁵ *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Rahnella*, qui dégradent les aminoacides aromatiques, sont surtout des contaminants alimentaires (souches histaminogènes)

⁶ hors *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*

⁷ un pigment jaune doit orienter vers *Leclercia* (ancien *E. adecarboxylata*, dépourvu de carboxylases) ou *E. vulneris*.

⁸ biogroupe alkalescens-dispar négatif. Les souches de poissons sont généralement immobiles

⁹ caractères inconstants au dessus de 30 °C

Symboles : pigments J jaune, Rg rouge. Réactions + positive, [+] tardive, - négative, d, d+, d- variables, avec tendance éventuelle

Tableau 1b. Caractères de différenciation des *Edwardsiella* ichthyopathogènes

	<i>E. tarda</i>	<i>E. anguillarum</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. piscicida</i>
croissance à 42 °C	+	+	-	+
arabinose	-	+	-	-
mannitol	-	+	-	-
maltose	+	+	+	-
D-mannose	+	+	-	+

Tableau 2. Orientation du diagnostic des vibrionacées et aéromonadacées

	Vibrions d'eau douce	Vibrions halophiles	<i>Photobacterium</i>	<i>Enterovibrio</i>	<i>Grimontia</i> (ex <i>V. hollisae</i>)	<i>Aeromonas</i> mobiles	<i>Aeromonas</i> immobiles	<i>Plesiomona</i> s
pigments	-	d	-	-	-	-	d (soluble)	-
luminescence	-/(+)	-/(+)	d	-	-	-	-	-
mobilité	+/-	+/-	+/-	+	+	+	-	+
flagellation ¹	M/L/P	M/L	M/L	M	M	M	-	P/L
crois. TCBS ²	+	+	+	+	-	-	-	-
gaz (glucose)	-	-/(+)	d	-	-	d	d	-
oxydase	+	+/-	d	+	+	+	+	+
réd. NO₃	+	+/-	d	-	+	+	+/-	+
NaCl 0 %	+	-	-	-	-	+	+	+
O/129	S/(R)	S	S	R	d	R	R	S
VP	d	-	d	+	-	d	d	d
LDC	+	d	+	-	-	d	d	+
ODC	+	d	-	-	-	d	-	+
ADH	-	d	+/-	+	-	d	d	+
indole	+	d	-	+	+	+/-	+/-	+
gélatinase	+/-	+/-	-/[+]	-	-	+	+/-	-
mannitol	+	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-

¹ Observation en coloration de cils/flagelles : M = monotriche, L = lophotriche, P = péritriche

² Milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose

Codes : S : sensible ; R : résistant ; + et - : caractère positif ou négatif [>90% des souches] ; d : variable ou controversé ; [+]: tardif ; ND : indéterminé ; les signes entre parenthèses soulignent l'existence de cas particuliers).

Tableau 3. Principaux *Aeromonas* mobiles susceptible d'être rencontrés en aquaculture

	<i>A. hydrophila hydrophila</i>	<i>A. hydrophila ranae</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>Aeromonas piscicola</i>	<i>A. salmonicida</i> "mésophiles"	<i>A. sobria</i>	<i>A. eurenophila</i>	<i>A. punctata</i> (<i>A. caviae</i>)	<i>A. molluscorum</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>Aeromonas tecta</i>	<i>A. veronii biov. veronii</i>	<i>A. veronii biov. sobria</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. enteropelogenes</i>
mobilité	+	+	+	+	+	+	+/(-)	+	d+	+	+	+	+	d+	d+	+	+	+	+
gaz en glucose	d+	d+	+	d+	+	d+	d+	d+	-	-	+	d+	+	+/(-)	+/(-)	+	+	-	d+
H₂S (GCF)	+	-	+	d+	+	d+	d-	- d +	-	-	d+	- d +	+	d	+/(-)	- d +	+/(-)	-/(+)	+/(-)
VP	d+	-	+	d+	+	d+	d	-	-/(+)	-	+/(-)	d	d	+	+/(-)	-	+/(-)	d	-
PDA, TDA	-	-	-	-	-	-	+ -	- ?	-	?	-	-	-	+	+?	?	+/(-)	d	?
indole	+	+	+	+	+	+	+	d+	+	-	d+	+	-	+	+	+	+	-	+
LDC	+	+	+	+/(-)	+	d+	+/(-)	-	-/(+)	-	-	-	-	+	d	+	+/(-)	+/(-)	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/(+)	-	d	d+	-	d-	-	-	-
ADH	+	+	+	+/(-)	-	d	-	+/(-)	+	+	+	+/(-)	+	-	+	d+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	- + -	+ d	+	+	d	+	+	[+]	+	+	+	+/(-)	+
gélatinase	+	+	+	d	+	+	+ - +	+/(-)	+/(-)	+	+	+ - +	+	+	+	+	d+	+/(-)	+
lipase (Tw.80)	d +	?	+	d-	+	+	d+	d+	d+	?	+	+ - +	+	+	+	+	+	d+	-
esculine	+/(-)	-	+	+	+	+/(-)	-/(+)	+/(-)	+/(-)	+	-	+	d+	+	-	d	-	-	-
élastase	d	+	+	d+	+	d+	-/(+)	+/?	d	-	-	-	+	-/(+)	-/(+)	-	d	d-	- +?
L-arabinose	+/(-)	-	-	+	-	+/(-)	-	+/(-)	+	+/(-)	d-	d-	-	-	-/(+)	d	-/(+)	-	-
D-cellobiose	d-	-	-	d-	-	d	+/(-)	+/(-)	d+	+/(-)	-	-/(+)	-	d+	d-	+	d-	-	+
lactose	d	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	d+	+	+	+	+	+/(-)	+	+	d+	+	+/(-)	-	d
saccharose	+	-	+	+	+	+	+	d-	+	+	-	d-	-	+	+/(-)	+	d	-	d-
salicine	+	-	d+	d	+	d	-/(+)	d+	d+	+	-	d+	d+	+	-	-	-	-	-
citrate Simmons	d	d-	+	d	-	-	d	-	d	+?	+	-	d	d+	d	d	+/(-)	d	+
d-lactate	d+	+	+	-	-	-	-	-	d	d	+	-	-	-	-	+	+	d	+

Tableau 4. Caractère distinctif des *Aeromonas* immobiles

Subsp.	<i>A. salmonicida</i>				<i>smithia</i>	<i>pectinolytica</i>
	<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>			
pigment brun	+	-	-	-	-	+
croissance à 37°	-	-	-	-	-	+
gaz en glucose	+	-	+	+	+	+
VP	-	-	d+	-	-	+
H₂S (GCF)	-	-	d	+	-	-
PDA, TDA	-	-	-	-	-	ND
indole	-	d+	+	-	-	+
LDC	d-	-	d+	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	-	-	d- (37°)
ONPG	d+	d+	d+	+	+	+
gélatinase	+	d+	+	+	+	+
lipase (Tw.80)	+	+	+	-	-	ND
esculine	+	-	+	-	-	-
élastase	ND	ND	ND	-	-	-
						ND
L-arabinose	+	-	+	+	ND	+
cellobiose	-	-	-	-	-	+
lactose	-	-	-	-	-	+
maltose	+	+	+	-	-	
D-mannitol	+	-	+	-	-	+
saccharose	-	+	+	+	d+	+
salicine	d-	d-	d-	-	-	-
citrate Simmons	-	-	-	-	-	+

Tableau 5. Caractéristiques particulières pouvant orienter rapidement le diagnostic de certains *Vibrio* ou d'agents apparentés. (l'absence de précision en colonne "autres caractères" correspond à l'absence des caractères considérés ; les parenthèses indiquent des propriétés seulement exprimées par certaines souches ; l'essaimage est un envahissement des milieux gélosés).

Pigment	Luminescence	NaCl 0 %	résistance au O-129	autres caractères	Espèce	Importance
rouge	-	-		gaz +	<i>V. gazogenes</i> , <i>V. ruber</i>	environnement marin
bleu-noir	-	-		gaz -	<i>V. nigripulchritudo</i>	environnement
jaune	-	-			<i>V. woderis</i>	poissons, flore
jaune	+	-			<i>V. fisheri</i> ¹ , <i>V. logei</i> ,	poissons, pathogènes ?
-	-	-			<i>V. splendidus</i> type I	poissons, pathogène
-	+	-		(essaimage)	<i>V. harveyi</i> ²	poissons, pathogène
-	+	-		gaz d, Ox d	<i>Ph. phosphoreum</i> , <i>Ph. leiognathi</i>	animaux marins, symbiose
-	(+)	+			<i>V. cholerae</i>	poissons dulçaquicoles
-	-	+			<i>V. albensis</i> , <i>V. mimicus</i>	eau douce
-	-	+	R	oxydase -	<i>V. metschnikovii</i>	eau douce
-	-	+			<i>V. hispanicus</i>	<i>Artemia</i> , flore
-	-	+	R	essaimage	<i>V. proteolyticus</i>	environnement
-	-	-	R		<i>V. mediterranei</i> ³	coraux, pathogène ?
-	-	-	R	gaz +, Ox -	<i>V. aerogenes</i>	sédiments
-	-	-	R		<i>V. nereis</i>	environnement marin
-	-	-	R		<i>V. lentus</i>	huître, flore
-	-	-	(R)		<i>V. anguillarum</i> , <i>V. fluvialis</i>	poissons, pathogène
-	-	-	(R)	gaz +	<i>V. furnissii</i>	poissons, pathogène
-	-	-	(R)	TCBS -	<i>Grimontia hollisae</i>	poissons, mollusques, flore
-	-	-		mobilité -	<i>V. haliotocoli</i> , <i>V. superstes</i> , <i>V. gallicus</i>	ormeaux, flore
-	-	-		mobilité -	<i>V. rumoensis</i>	poissons, flore
-	-	-		mobilité -	<i>Ph. damselaepiscicida</i>	poissons, pathogène
-	-	-		essaimage	<i>V. alginolyticus</i>	poissons, pathogène
-	-	-		essaimage	<i>V. pectenocida</i>	bivalve, pathogène
-	-	-		gaz +	<i>V. mytili</i>	moules, flore
-	-	-	-	gaz +	<i>V. damselaedamselae</i>	poissons, pathogène
-	-	-		oxydase -	<i>V. pacinii</i>	poissons, pathogène ?

Notes : ¹ autre appellation reconnue : *Photobacterium fisheri*

² *V. carchariae*, décrit pathogène pour les poissons et les squales, est maintenant assimilé à *V. harveyi*, tout comme *V. trachuri*

³ Une souche oxydase-négative et O/129 sensible avait été décrite sous le nom de *V. shilonii*.

Tableau 6. Espèces pathogènes de *Vibrio*, *Photobacterium* et *Moritella* chez les poissons

	<i>Photobacterium</i>			<i>Listonella anguillarum</i>	<i>Vibrio</i>													
	<i>P. damsela</i>	<i>P. piscicida</i>	<i>Moritella viscosa</i>		<i>V. cholerae</i> non-O1	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. splendidus</i> type I	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. ichthyenteri</i>	<i>V. ordalii</i>	<i>V. pelagius</i> biov. I	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. fisheri</i> ?	<i>V. logei</i> ?
pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/129 150 µg/ml	S	S	S	S	S ¹	S	S	S	S	S	d	S	S	S	S	S	S	S
luminescence	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-	+	-	d	-	-	-	-	-	+	+
essaimage ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d-	-	-	-	-	-	-	-
mobilité (flagelles) ²	+	-	+	d (m)	+	d (p)	d (p)	+	d+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gaz en glucose	+	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
cr. NaCl 0 %	-	-	-	d-	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 10 %	-	-	-	d	-	d+	d+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4 °C	-	-	+	d	-	-	-	+	d-	-	-	d	-	+	-	-	-	+
35°	+	d+	-	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	-	+	d	-	-
40 °C	d	-	-	-	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	-	-
ONPG	d	-	ND	+	+	d+	+	d	d+	-	d+	-	d	-	+	-	ND	ND
indole	-	-	-	d+	+	d	d+	-	+	d+	+	-	-	-	+	ND	-	-
uréase	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	-	-	+	ND	ND
LDC	d-	-	d	d-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	d	-
ADH	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	-	+	d+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	d-	-	-	-
PHB	+	+	ND	-	ND	-	d	ND	-	-	-	ND	-	ND	ND	+	ND	ND
amylase	d	-	+	+	ND	+	d	ND	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	ND
gélatinase	d-	-	+	+	+	+	+	d	d+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Tween 80	d+	-	+	+	+	+	+	d	d	+	+	-	+	-	+	+	d	d
chitinase	+	ND	d	+	+	+	+	ND	d+	+	+	d+	d-	-	+	d-	+	+
alginate	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	d-	-	d-	ND	+	ND	-	-	-	-

arabinose	-	ND	-	d+	d	+	+	ND	-	-	d	-	-	+	-	-	-	-
cellobiose	d	-	-	d+	-	d	-	ND	+	-	d+	-	-	-	d	+	+	+
D-galactose	+	+	ND	d	ND	+	+	ND	d	ND	ND	-	d	ND	d	ND	ND	ND
lactose	-	-	-	-	ND	-	-	+	d	-	-	-	-	ND	-	+/[+]	-	ND
maltose	+	d+	d	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	-	ND	ND	ND
mannitol	-	-	-	+	+	+	+	ND	+	+	+	-	+	ND	d	d	d+	+
D-mannose	+	ND	d	+	d	+	d+	ND	+	d	d+	+	ND	ND	d	-	-	d
saccharose	-	d-	-	+	d	+	+	ND	d-	+	d	+	+	+	-	-		d
salicine	d-	-	-	-	-	+	-	ND	-	-	d	-	d-	+	-	ND	ND	ND
sorbitol	-	ND	-	+	-	-	-	ND	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tréhalose	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	-	ND	+	ND	ND	ND
croissance en :																		
acétate	+	-	ND	ND	ND	+	ND	-	d	+	+	ND	ND	+	ND	-	-	ND
G-	-	ND	ND	-	ND	+	+	-	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	ND
citrate	d-	d-	ND	+	d	+	+	+	+	d+	d+	-	-	+	-	+	d	-
D-gluconate	-	-	ND	+	+	+	+		d	d+	+	-	d	+	+	+	-	+
propionate	-	ND	ND	+		+	+	-	+	+	+	ND	ND	+	ND	+	-	ND
putrescine	-	ND	ND	-	d	d	+	-	-	d-	-	-	ND	+	ND	-	-	-

¹ résistances plasmidiques possibles

² essaimage : envahissement de la gélose. Types de flagellation m: monotriche, l: lophotriche, p: flagelles latéraux, mais des souches atypiques peuvent exister

³ ADH positive en milieu de Thornley, moins constante en Møller

Codes : + et - : caractère positif ou négatif [>90% des souches] ; d+ et d- : variable à forte dominance [>75 %]; d : variable ou controversé ; [+]: tardif ; ND : indéterminé) ; R : résistant, S : sensible, J : jaune

Tableau 7. Bactéries ichtyopathogènes aérobies : *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i> (biotypes)					<i>P. chlororaphis chlororaphis</i> ¹	<i>P. putida</i> (biotypes)		<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. anguilliseptica</i>	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ²	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pasteurella skyensis</i>	<i>Fr. phlomitragia noatunensis</i>
		I	II	III	IV	V		A	B							
flagelles	1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0 à >1	1 ³	1	1	-	-	-
pyocyanine	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pyoverdine	d	+	d	+	+	d	d	+	d	+	-	-	-	-	-	-
autres pigments	-	-	-	-	bleu	-	+	-	-	-	-	jaune	rosé	-	-	-
lévanes en saccharose	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]	-	-
type métabolique	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS	AS ⁶	AS	AAF	AS
resp. NO ₃	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	- ⁷	-
H ₂ S en Kligler-Hajna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND
gélatinase	+	+	d	d	d	+	+	-	-	-	+ ⁵	+	-	-	ND	-
lécithinase	-	+	±	+	+	d	d	-	-	-	ND	ND	-	d	ND	ND
Tween 80	±	d	-	d	d	d	d	d	d	-	+ ⁵	+	-	+	ND	ND
acid. glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	-	+	-	+	+	+
croissance :																
4 °C	-	+	+	+	+	d	+	d	+	-	+	d	+	ND	-	-
41 °C ⁴	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-(37° -)	-(37° -)

utilisation :																acidification	
L-arabinose	-	+	+	d	+	d	-	d	+	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	-
saccharose	-	+	+	-	+	d	d	-	d	-	ND	+	d	ND	-	+	
tréhalose	-	+	+	d	+	d	+	+	-	-	ND	+	ND	ND	+	-	
adonitol	-	+	-	d	-	d	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	
éthanol	+	-	+	d	-	d	d	d	d	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	
m-inositol	-	d	+	d	+	d	+	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	ND	
sorbitol	-	+	+	d	+	d	-	-	-	ND	ND	-	-	ND	-	-	
amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	
esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	-	
citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	ND	ND	

¹ Comprend maintenant 3 sous-espèces : *chlororaphis*, *aureofaciens* et *aurantiaca*. ² Espèce exclusivement marine : NaCl 0% -, O/129 R

³ Mobilité faible. ⁴ Des souches thermotolérantes d'espèces psychrophiles poussent parfois à 41 °C. ⁵ Perte de caractère possible en subcultures

⁶ Respiration de NO₃ suggérant souvent un comportement AA

⁷ Non utilisés par *P. skyensis*, qui requiert NaCl (1,5 %) et est en outre : indole, LDC, ODC + ; catalase, ONPG, uréase, VP -

⁸ *F. philomiragia noatun.* : NaCl requis, indole, maltose, mannose + (mais l'acidification des sucres peut dépendre du milieu d'étude, la cystéine étant indispensable)

Tableau 8. Caractères différentiels des quatre genres de la famille des flavobactériacées contenant des espèces pathogènes pour les poissons

Caractères	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Tenacibaculum</i>
Habitat	Eau douce ou eau de mer	Eau douce	Eau douce	Eau de mer
Morphologie des colonies	Rondes et bombées	Rondes et bombées	Rondes et bombées ou plates et rhizoïdes	Rondes et bombées ou plates et rhizoïdes
Adhérence à la gélose	-	-	v	v
Production de pigments jaunes de type flexirubine	+	-(+)	v	-
Morphologie des cellules sphéroplastés* produits	Bacilles	Bacilles	Bacilles ou filaments	Bacilles ou filaments
Mobilité par glissement	-	-	+	+
Croissance sur milieux à l'eau de mer	+	+	-	+
Croissance à :				
5 °C	-	-	v	-
37 °C	v	+	-	v
42 °C	-	v	-	-
Production de :				
DNase	+	+	v	+
b-galactosidase (ONPG)	v	+	+	ND
H₂S	v	-	-	- ou ND
Indole	+	+	-	ND

Acidification du glucose	+	+	v	ND
Réduction des nitrates	-	-	v	v
Dégradation de :				
Esculine	+	+	v	-
Amidon	+	-	+	v
Résistance à la pénicilline G	+	+	v	- ou ND

* cellules rondes apparaissant dans les cultures liquides en phase stationnaire et considérées comme des formes de dégénérescence.

Tableau 9. Caractères différentiels des espèces du genre *Flavobacterium* ichtyopathogènes ou rencontrées dans les eaux douces tempérées

Caractères	<i>F. aquatile</i>	<i>F. branchiophilum</i>	<i>F. columnare</i>	<i>F. flevense</i>	<i>F. hydratis</i>	<i>F. johnsoniae</i>	<i>F. psychrophilum</i>	<i>F. saccharophilum</i>	<i>F. succinicans</i>
Pathogène avéré	-	+	+	-	(+) ^a	(+) ^a	+	-	-
Aspect des colonies sur milieu d'Anacker et Ordal	Rondes, peu bombées	Rondes, peu bombées	Plates, adhérentes, bord rhizoïde	Rondes, peu bombées, enfoncées dans la gélose	Plates, envahissantes bord filamenteux	Plates, envahissantes bord filamenteux	Rondes, peu bombées, bord parfois irrégulier	Plates, envahissantes enfoncées dans la gélose	Plates, envahissantes bord filamenteux
Mobilité par glissement	-(+)	-	+	(+)	+	+	(+)	+	+
Présence de sphéroplastés ^b	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Adsorption du rouge Congo	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pigments de type flexirubine	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Croissance sur :									
marine agar 2216	-	-	-	+	-	-	-	-	-
nutrient agar	+	-	-	+	+	+	(+)	+	+
trypticase-soja agar	(+)	-	-	+	+	+	-	+	+
Croissance à 25°C	+	+	+	+	+	+	v ^c	+	+
Utilisation du glucose	ND	ND	-	+	+	+	-	+	+
Acidification des sucres	+	+	-	+	+	+	-	ND	+
Dégradation de :									
gélatine	+	+	+	-	+	+	+	+	(+)
caséine	+	+	+	-	+	+	+	+	+
amidon	+	+	-	+	+	+	-	+	+
carboxymethyl cellulose	-	-	-	-	-	+	-	(+)	(+)
agar	-	-	-	+	-	-	-	+	-
chitine	-	-	-	-	(+)	+	-	-	-
esculine	+	-	-	+	+	+	-	+	+
ADN	-	-	+	-	+	+	(+)	-	+
urée	-	-	-	-	-	+	-	-	-
tyrosine	+	+	-	-	+	+	v	+	-

Production de mélanine sur gélose à la tyrosine	-	-	v	-	-	v	-	-	-
Précipité sur gélose au jaune d'oeuf	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Production de:									
b-galactosidase (ONPG)	+	+	-	+	+	+	-	+	+
cytochrome oxydase	+	+	+	+	+	+	(+)	-	<u>v</u>
H₂S	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Réduction des nitrates	+	-	+	-	+	v	-	+	v
Sensibilité au O/129^d	-	+	+	+	-	-	+	+	+

^a, des souches semblables à *F. hydatis* et *F. johnsoniae* sont fréquemment isolées de lésions superficielles de différentes espèces de poissons, mais elles sont généralement considérées comme des opportunistes ; ^b, cellules rondes apparaissant dans les cultures liquides en phase stationnaire et considérées comme des formes de dégénérescence ; ^c, la plupart des souches de *F. psychrophilum* peuvent pousser à 22-23°C mais pas à 25°C ; ^d, méthode par diffusion en gélose, disques contenant 500 mg.

Symboles et abréviations : + ou -, caractère positif ou négatif chez toutes les souches ou une majorité d'entre elles ; (+), caractère faible ou tardif ; v, caractère variable selon les souches ; v, caractère variable selon les études ; ND, non déterminé.

Tableau 10. Caractères différentiels des espèces de *Chryseobacterium* et *Elisabethkingia* ichtyopathogènes ou rencontrées dans les milieux aquatiques tempérées

Caractères	<i>C. balustinum</i>	<i>C. daecheongense</i>	<i>C. indologenes</i>	<i>C. indoltheticum</i>	<i>C. joostei</i>	<i>C. scophthalmum</i>	<i>E. meningoseptica</i>
Habitat	Poissons d'eau douce malades	Lac d'eau douce	Eaux douces, humains et animaux malades ^a	Eau de mer	Lait cru de vache, poissons malades	Eau de mer, poissons marins sains et malades	Eaux douces, sols, humains et animaux malades ^a
Pigments de type flexirubine	+	+	+	+	+	+	- ^b
Croissance sur							
Marine agar 2216	-	ND	(+)	+	(+)	+	+
Cétrimide agar	-	ND	(+)	-	(+)	-	(+)
MacConkey agar	+	-	v	+	+	-	v
Croissance à :							
5 °C	(+)	-	-	+	+	v	-
37 °C	-	+	+	-	-	-	+
42 °C	-	-	-	-	-	-	v
Dégradation de :							
Amidon	(+)	+	+	-	+	-	-
Tyrosine	(+)	ND	-	+	+	+	(+)
Urée	-	-	v	-	-	+	-
Production de :							
H₂S	v	-	+	+	-	-	-
Indole	+	-	+	+	+	-	+
β-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	+	+

Acidification de :

Ethanol	+	-	-	-	-	-	+	v
D-Fructose	+	+	(+)	-	+	+	-	+
D-Glucose	+	-	+	+	+	+	-	+
Glycérol	-	+	(+)	-	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	v
Maltose	-	-	+	+	+	+	-	+
Tréhalose	-	+	+	-	+	+	+	+
D-Xylose	-	+	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	<u>v</u>	+	v	-	-	-	-	-
Alcalinisation sur citrate de Christensen	-	ND	+	<u>v</u>	+	+	+	v

Symboles et abréviations : + ou -, caractère positif ou négatif chez toutes les souches ou une majorité d'entre elles ; (+), caractère faible ou tardif ; v, caractère variable selon les souches ; v, caractère variable selon les études ; ND, non déterminé ;

^a, entre autres poissons d'eau douce et amphibiens ; ^b, les souches d'*Elizabethkingia meningoseptica* sont incolores ou faiblement colorées en jaune, les souches de toutes les espèces de *Chryseobacterium* produisent un pigment jaune orangé vif.

Tableau 11. Caractères différentiels des espèces de *Tenacibaculum*

Caractères	<i>T. lutimaris</i>	<i>T. skagerrakense</i>	<i>T. amyolyticum</i>	<i>T. mesophilum</i>	<i>T. ovolyticum</i>	<i>T. maritimum</i>
Origine	Sédiment, zone intertidale, Corée	Eau de mer, Danemark	Algue marine, Japon	Eponge et algue marines, Japon	Oeufs de flétan, Norvège	Poissons marins, cosmopolite
Taille des bacilles (+m)	0,5 x 2-10	0,5 x 2-15	0,4 x 2-4	0,5 x 1,5-10	0,5 x 2-30	0,5 x 2-30
Présence de sphéroplastés ^a	-	+	-/(+)	-/(+)	-	+
Mobilité par glissement	+	- ^b	+	+	+	+
Aspect des colonies sur marine agar 2216	Irrégulières, adhérentes, bord étalé	Rondes, bord étalé	Rondes, bord étalé	Irrégulières, bord étalé	Rondes à irrégulières, bord net à rhizoïde	Irrégulières, grumeleuses, adhérentes à collantes, bord ± rhizoïde
Couleur de colonies	jaune pâle	jaune vif	jaune	jaune	jaune pâle	jaune pâle
Adsorption du rouge Congo	ND	ND	ND	ND	-	+
Cultures liquides visqueuses et pellicule en surface	-	-	-	-	-	+
Tolérance thermique (°C)	10-39	10-40	20-35	15-40	4-25	10-34
Optimum thermique (°C)	30-37	25-37	27-30	28-35	15-25	25-30
Croissance avec NaCl seul	ND	-	(+)	+	-	-
Besoin minimal de salinité (‰)	ND	25	50	10	70	30
Réduction des nitrates	v	+	(+)	-	+	+

Seules sources de carbone et/ou d'azote :

saccharose	-	+	-	-	-	-
DL-aspartate	-	+	-	+	-	-
L-proline	-	+	+	+	-	-
L-glutamate	-	+	+	+	-	(+)

Symboles et abréviations : + ou -, caractère positif ou négatif chez toutes les souches ou une majorité d'entre elle s ; (+), caractère faible ou tardif ; v, caractère variable selon les souches ; ND, non déterminé.

^a, cellules rondes apparaissant dans les cultures liquides en phase stationnaire et considérées comme des formes de dégénérescence ; ^b, le glissement n'a pas été observé chez *T. skagerrakense* bien que ce caractère soit mentionné dans la description du genre *Tenacibaculum*.

Tableau 12. Les mycobactéries des poissons

	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. shottsii</i>	<i>M. pseudoshottsii</i>	<i>M. chesapeaki</i>	<i>M. montefiorensis</i>
Croissance :								
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	d	-	+	-
37 °C	+	+	+	d-	-	-	+	-
42 °C	+	+ / (-)	+ / (-)	-	-	-	ND	-
temps de culture ¹	3-4 j	3-4 j	3-4 j	lent	lent	lent	lent	lent
pigmentation ²	-	-	-	+ photochr.	-	+ photochr.	-	-
catalase	+	+ / (-)	+	+	-	-	ND	-
NO ₃	+	-	-	-	-	-	-	-
uréase	+	+	+	+	+	+	+	-
phosphatase acide	+	+	+	+	d	d	ND	ND
niacine	-	- / (+)	- / (+)	- / (+)	+	+	-	-
citrate de fer amm.	+	- / (+)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ONPG	+	[+]	ND	ND	ND	-	ND	ND
Tween 80	d	- / (+)	-	+	-	-	-	-
pyrazinamidase	+	+	+	d	- / [+]	-	+	ND
arylsulfatase	+	+	+	d	-	-	-	-

¹ 4 à 6 semaines d'incubation parfois nécessaires

² pigment jaune produit après incubation à la lumière (les souches photochromogènes) ou à l'obscurité (souches scotochromogènes)

Tableau 13. Taille des bandes d'ADN (en paires de bases) obtenues en gel d'agarose après digestion du gène d'ARNr 16S par 3 endonucléases, chez les principales bactéries lactiques isolées de poissons.

	Endonucléases		
	<i>Cfo</i> 1 ¹	<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I
<i>L. raffinolactis / piscium</i>	555-502	598-283-154	
<i>L. garvieae</i>	549-277-226	411-277-187-155	
<i>L. lactis lactis</i>	520-502	410-275-187-155	
<i>L. lactis cremoris</i>	548-504	412-275-188-155	
<i>S. iniae</i>	520-503	505-275-155-93	700-193-149
<i>S. dysgalactiae</i>	516-502	505-271-154-93	591-262-192
<i>S. agalactiae</i>	547-503	505-275-93-80-75	595-262-193
<i>S. uberis</i> variant	547-503	505-275-155-93	438-262-157-143-50 700-157-143-50
<i>S. parauberis</i>	547-494	280-241-226-147-91	701-183-149
<i>C. maltaromaticum</i>	553-504	565-281-189	
<i>E. faecium / faecalis</i>	490-376	600-253-141	
<i>E. gallinarum / casseliflavus</i>	504-373-184	599-251-155	
<i>V. fluvialis</i>	504-343-213	598-207-155	
<i>V. salmoninarum</i>	504-343-208	698-280-155	
<i>Aerococcus sp. / viridans</i>	547-504	668-232-85-44	

¹ noter la fréquence des doublets dans la marge 500-550 pb

ANNEXE 2. Formulaire des Techniques de laboratoire

1. Milieux et techniques en bactériologie

Milieux de culture particuliers pour les bactéries

Flavobacterium

- Anacker et Ordal (AO)

Bouillon :	acétate de Na	0,2 g	
	tryptone	0,5 g	
	extrait de levure	0,5 g	
	extrait de bœuf	0,2 g	
	eau	1 litre	ajuster le pH à 7,2-7,4 par la soude 1 N autoclaver 15 mn à 115 °C.
AOA :	idem + agar	4 ou 12 g	selon formule (conservation ou isolement) l'agar est très acide. Ajuster le pH à chaud.

Variantes :

AOE (AO enrichi pour *F. psychrophilum*) tryptone augmentée à 5 g/l
Production ajouter sérum à 5 %

- TYES (tryptone-yeast extract-salt)

1) Base :

tryptone	4g	
extrait de levure	0,4 g	
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,2 g	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g	
eau distillée	1 litre	
agar	10 g	ajuster le pH à 7,2, autoclaver.

2) Avec lait écrémé : lait écrémé à 20 % en eau distillée, réparti en tubes de 5 ml et autoclavé

Emploi : ajouter le lait écrémé à 1 % au milieu de base (0,2 % final)

Tenacibaculum

- Marine broth agar 2216 E (DIFCO) ou Anacker et Ordal préparé en eau de mer artificielle à 50 % (cf. infra)

- FMM ("*Flexibacter maritimus*" medium)

acétate de sodium	0,01 g	
peptone	5 g	
extrait de levure	0,5 g	
agar	15 g	
eau de mer artificielle	1 litre	ajuster le pH à 7,2-7,4 et autoclaver

Vibrions et germes marins

- Eau de mer artificielle (ASW)

NaCl	23,4 g	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	24,6 g	
KCl	1,5 g	
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	2,9 g	(à dissoudre séparément)
eau distillée	1 litre	

S'utilise pour divers milieux (ex.: le BM, milieu de base pour vibrions marins), souvent diluée à 50 %.

A défaut, on peut employer des sels du commerce pour aquariophilie, également dilués à 50 %.

- Milieu de base (BM) pour *Vibrio marinus*

Pour 1 litre d'ASW dilué à 50 % :

Tris-HCl, pH 7,5	50 ou 100 mM	
NH ₄ Cl	1 g	
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	75 mg	
FeSO ₄ , 7H ₂ O	28 mg	stérilisation par autoclavage

Renibacterium salmoninarum

- Milieu KDM-2 (Evelyn, 1977)

cystéine-HCl	1 g	
peptone	10 g	
extrait de levure	0,5 g	
agar	15 g	ajuster le pH à 6,5-6,8 par NaOH. autoclaver 20 mn à 120 °C

Ce milieu se conserve 1 mois à 4 °C.

Emploi :

Régénérer et ajouter 5 à 10 % de sérum de veau fœtal stérile.

Milieux spéciaux pour l'identification des bactéries

- Milieu GCF (glucose-cystéine-fer) pour la recherche d'H₂S produit par *Aeromonas* spp.

A) Base	bouillon nutritif	1 litre	
	KCl	4 g	
	citrate ferrique ammoniacal	0,4 g	
	agar	10 g	ajuster le pH à 7,4, répartir en tubes par 9 ml autoclaver 15 mn à 115 °C.

B) Solution de cystéine à 1 % :

L-cystéine (monochlorhydrate) 1 g pour 100 ml d'eau distillée. Filtrer à 0,22 µm.

Emploi :

Régénérer un tube de milieu de base et le maintenir à 55 °C. Ajouter 1 ml de solution de cystéine et laisser refroidir en culot. L'ensemencement consiste en 4 piqûres verticales, la production d'H₂S se manifestant par le noircissement des stries.

- Milieu synthétique M63 pour l'auxanogramme des bactéries à Gram négatif

KH ₂ PO ₄	13,6 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	
MgSO ₄	0,2 g	
Ca(NO ₃) ₂	0,01 g	
FeSO ₄	0,001 g	
eau distillée	1 litre	ajuster à pH = 7 avec soude ou potasse répartir par 5 ml et autoclaver à 110 °C ou filtrer conserver à 4 °C

Emploi :

les sources de croissance sont ajoutées stérilement à 1 p.100 au moment de l'ensemencement. On inocule par 1 goutte de suspension préparée en eau physiologique à partir de culture solide.

Colorations bactériennes

- Test à la potasse pour la différenciation Gram +/- (Gregersen, 1978)

Certaines bactéries (*Acinetobacter* par exemple) présentent naturellement une coloration de Gram assez douteuse. En tel cas, on peut déposer une goutte de KOH 3 % sur lame de verre et tenter de dissocier une colonie dans ce milieu.

Si la bactérie est Gram- une traînée filamenteuse visqueuse accompagne l'anse de platine quand on la relève. Les Gram+ restent sèches et ne prêtent pas à ce phénomène.

- Coloration des souches A+ autoagglutinantes de *A. salmonicida*

Elle permet de différencier les colonies A+ (R) des souches virulentes des colonies A- (S) avirulentes, sur la base de la couche A.

White et Wilson :

1) solution A :	crystal violet	2 g
	éthanol 100°	20 ml
2) solution B :	oxalate d'ammonium	0,8 g
	eau distillée	80 ml

La solution-mère s'obtient en mélangeant A et B (volume final 100 ml)

Emploi :

au 1/40 en eau distillée. Inonder les cultures solides et laisser agir 20 mn avant drainage. Les colonies A+ sont colorées.

Bleu de Coomassie :

Solution-mère préparée à 2 % en éthanol absolu (0,5 g dans 25 ml, agitation toute une nuit), et filtrée à 0,22 µm avant emploi.

Emploi :

Le milieu de culture solide (TSA en général) est régénéré et enrichi de solution-mère à 0,01 % (soit 1ml pour un volume final de 20 ml).

- Colorations des cils et flagelles de bactéries mobiles

Solution A : ajouter à froid dans l'ordre :

phénol (Merck pour analyses, ref. 206)	5 g
éthanol 100°	5 ml
violet cristallisé (Merck ref. 1407)	3 g
eau distillée	100 ml
tanin à l'alcool (Prolabo ref. 20712.233)	20 g

Solution B : alun saturé à préparer à 50°C :

eau distillée	100 ml
aluminium-potassium sulfate, 12 H ₂ O	
(Merck pour analyses, ref. 1047)	50 g

Chauffer les deux solutions à 60-70°C, mélanger à parties égales, et laisser reposer 24 heures.
Conserver à l'abri de la lumière à température ambiante ou à 37°C.

Emploi :

On peut partir d'une culture en bouillon, ou prélevée au bas d'une gélose en pente, pour préparer entre lame et lamelle une suspension pas trop dense. Déposer 1 goutte de réactif au bord de la lamelle et laisser diffuser par capillarité. Observer en immersion, au contraste de phase, sous un objectif 100x.

Caractérisation particulière des flavobactériacées

- Détection des pigments de type flexirubine

Test simple, permettant de différencier les pigments jaunes présents chez la plupart des flavobactéries : les flexirubines virent du jaune ou jaune-orangé au rose, rouge ou brun en milieu fortement basique, alors que les caroténoïdes ne changent pas de couleur. Une solution de potasse (KOH) à 20 % est recommandée mais la solution à 40 % incluse dans les kits de révélation des galeries API convient également. Ce changement est réversible : si la potasse est enlevée et remplacée par une solution fortement acide, les flexirubines reprennent leur couleur jaune initiale.

En pratique, il est conseillé de récolter des colonies sur une gélose et d'en faire deux petites masses sur une lame de verre placée sur un fond blanc; l'une des masses est ensuite recouverte de potasse et l'on compare les couleurs des deux masses. Le résultat du même test, réalisé directement sur la gélose, peut sembler négatif à cause du manque d'épaisseur des colonies bactériennes.

- Test au rouge Congo

Ce test révèle l'absorption du rouge Congo par certains éléments de la gangue polysaccharidique sécrétée par les flavobactéries. Une solution aqueuse à 0,01 % est déposée directement à la pipette sur une ou plusieurs colonies sur la gélose. Après quelques minutes, le colorant est délicatement aspiré ou rincé à l'eau distillée et les colonies sont comparées à celles qui n'ont pas été recouvertes de colorant : le test est positif si les colonies sont colorées en rouge, surtout en périphérie.

- Détection de la mobilité par glissement (*gliding motility*)

Ce type de mobilité propre aux flavobactéries ne se produit qu'au contact d'une surface humide (tissus des poissons, lame de verre, plastique...). Bien qu'on puisse en supposer l'existence quand les bords des colonies présentent un aspect plus ou moins rhizoïde et envahissant, il est préférable de l'observer directement au microscope en contraste de phase :

Il est parfois visible sur le bord des colonies observées directement sur la gélose à 100x, soit par dessus (la boîte de Petri ouverte), soit par dessous, en retournant la boîte fermée et en observant la colonie à travers le fond de la boîte et l'épaisseur de gélose. Le bords des colonies apparaît filamenteux et échevelé, traduisant l'envahissement centrifuge de la gélose par des bactéries parallèles en petits groupes ; on observe parfois le glissement lui-même ou les traces de polysaccharides laissées par les bactéries sur leur passage.

Il est toutefois préférable d'observer une goutte de culture liquide entre lame et lamelle à 400x ou 1000x ; l'observation attentive et patiente des bacilles collés à la face inférieure de la lamelle ou à la face supérieure de la lame permet d'en voir glisser certains. Le mouvement est lent et hésitant, avec de fréquents retours en arrière et changements de direction, ainsi que des pivotements des bacilles autour d'une de leurs extrémités restée fixée au support. Un minimum d'expérience est nécessaire pour bien détecter ce type de mobilité.

2. Milieux et techniques en mycologie

Culture

- Milieu de Sabouraud glucosé

<u>Formule de base:</u>	glucose	20 g
	néopeptone (Difco)	10 g
	agar	20 g
	eau distillée	1 litre

Solutions-stocks d'antimicrobiens :

pénicilline	à 2000 u /ml
streptomycine	à 4000 u /ml
actidione ou cycloheximide	500 mg à dissoudre dans 5-10 ml d'acétone compléter à 80 ml, filtrer et conserver à 4 °C

La solution d'emploi s'obtient à partir des solutions-stocks, en ajoutant 10 ml de pénicilline et 10 ml de streptomycine à 80 ml d'actidione.

Le milieu est régénéré, refroidi à 45 °C, et additionné de solution d'antimicrobiens à raison de 1 ml /10 ml.

- Culture sur lame (voir Rivalier et Seydel, 1932 ; accessible en ligne)

Les lames microscopiques sont stérilement trempées dans de la gélose de Sabouraud liquéfiée à 40 °C et placées sur supports de verre dans des boîtes de Petri contenant 5 ml d'eau, servant de chambres humides. On dépose l'inoculum sous forme d'un fragment de culture au centre de la lame. L'incubation doit être réalisée à l'abri des courants d'air afin d'éviter dessiccation et contaminations.

Colorations

Les colorations peuvent être opérées sur des cultures ou directement sur des tissus infectés. On peut aussi préparer une culture sur lame qui sera séchée et trempée dans une solution de collodion :

collodion officinal (sans huile de ricin)	1 ml
éthanol 100°	2 ml
éther sulfurique	2 ml

Après égouttage et séchage de 24 heures la lame est colorée environ 15 mn, différenciée rapidement à l'éthanol 70°, déshydratée par l'alcool-acétone et montée au baume.

- En coloration de Gram les structures fongiques apparaissent sous un aspect Gram +
- Coloration au bleu coton-lactophénol

Bleu coton C4B	0,5 g
lactophénol	100 ml

Les éléments fongiques sont colorés en bleu. Le lactophénol joue le rôle d'éclaircissant permettant d'améliorer l'observation directe du matériel biologique en le dilacérant dans une goutte de colorant et en le couvrant d'une lamelle, comme pour un état frais.

- Coloration de Hotchkiss-McManus (HMM)

Adaptation de la coloration PAS (acide périodique de Schiff) employée en histologie, qui colore les groupements aldéhyde en rose fuchsia, elle s'opère après fixation sur lame (par l'alcool - éther à parties égales) et met en évidence les groupements OH des polysaccharides oxydés par l'acide.

- Imprégnation argentique de Gomori-Grocott : Gomori méthenamine silver (GMS)

Principe identique au HMM mais la révélation des radicaux oxydés repose sur la précipitation argentique et le protocole, plus complexe, est surtout appliqué en histologie. Les parois fongiques apparaissent colorées en brun-noir.

3. Matériel et techniques pour la parasitologie

Décrochage des parasites fixés

Il est possible, avant l'anesthésie, de placer les poissons dans une solution thérapeutique en évitant les produits pouvant favoriser la lyse des parasites.

Produits de fixation et de conservation

éthanol 70°
formol 4 %
solution saturée d'acide picrique + gélatine (1/1)

Conservation possible à 4 °C. Pour les nématodes sensible au formol, préférer l'alcool 70°.

Fixation à chaud

- Pour les monogènes :

- gélatine-glycérine : faire fondre 7 g de gélatine dans 40 ml d'eau distillée, puis ajouter :

40 ml de glycérine.
0,25 g de phénol en cristaux

- formol-gélatine : formol 4 % (5 vol.) + gélatine (1 vol.)

- Pour les nématodes :

- éthanol-glycérine : éthanol 70° (9 vol.) + glycérine (1 vol.)

Procéder au chauffage ménagé des vers, placés dans une goutte d'eau sur une lame de microscope. Essorer la lame au papier-filtre et remplacer l'eau par une goutte de solution fixatrice tiédie avant de déposer une lamelle, qu'un chauffage ménagé et une légère pression permettront d'ajuster en assurant le positionnement et l'extension des vers. Luter les bords de la lamelle pour assurer une conservation de plusieurs jours.

Dissection de l'œil

Le globe oculaire est extrait de son orbite à l'aide d'une paire de pince à dents de souris et de ciseaux à bouts pointus, en coupant les paupières, les tissus internes et le nerf optique. L'ouverture de l'œil est pratiquée sous la loupe binoculaire à 2x à 5x, en introduisant une branche des ciseaux au niveau de l'insertion du nerf optique. Les humeurs liquides et le cristallin sont attentivement examinés : certaines larves de trématodes (*Tylodelphis* sp. et *Philometra obturans*) et de nématodes restent libres dans les humeurs, d'autres (*Diplostomum* sp.) sont implantés dans la structure du cristallin entre les différents feuillettes. il est important de saisir ce dernier avec précaution et de le « mirer » sous la lumière sur fond noir, mais il ne faut pas le léser et il est important de se méfier des reflets de l'éclairage.

Dékystement

L'efficacité de cette opération dépend de l'épaisseur du kyste :

Kystes fins : agitation en tube dans la solution saline.

Kystes plus épais : perçage ponction à l'aiguille ou pointe de scalpel, sous la loupe binoculaire

Kystes épais : digestion enzymatique (pepsine, trypsine par exemple) à température compatible avec les préférences physiologiques de l'hôte définitif.

Observation des parasites à l'état frais

L'observation à l'état vivant, entre lame et lamelle dans un peu d'eau, est incontournable pour la visualisation de certaines structures anatomiques (systèmes excréteur, nerveux ou glandulaire) que des colorations vitales (rouge neutre, bleu de méthylène) permettent d'améliorer.

Montage histologique

Une fois la fixation assurée les techniques sont celles de l'histologie classique, au moins pour les individus inclus en entier (taille < 20 mm). Une coloration au carmin est souvent employée pour les vers entiers, montés dans l'eugénol.

Références

- Abayneh T, Colquhoun D J, Sørum H, 2013. *Edwardsiella piscicida* sp. nov. a novel species pathogenic to fish. *J Appl Microbiol*, 114, 644–654.
- Abbott S L, Cheung W K W, Janda M, 2003, The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol*, 41, 2348-2357.
- Alsina M, Blanch A R, 1994a. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*, 76, 79-85.
- Alsina M, Blanch A R, 1994b. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol*, 77, 719-721.
- Bernardet J-F, Segers P, Vancanneyt M, Berthe F, Kersters K, Vandamme P, 1996. Cutting a Gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basionym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int J Syst Bacteriol*, 46, 128-148.
- Bernardet J-F, Nakagawa Y, Holmes B, 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1049-1070.
- Bernardet J-F, Bowman J P, 2006. The genus *Flavobacterium*. In : *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edition, Vol 7, *Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply rooting Bacteria*. (M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, E Stackebrandt, eds). Springer-Verlag, New-York, 481-531.
- Bernardet J-F, Hugo C, Bruun B, 2006. The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In : *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edition, Vol 7, *Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply rooting Bacteria*. (M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer, E Stackebrandt, eds). Springer-Verlag, New-York, 638-676.

- Berridge B R, Fuller J D, De Azavedo J, Low D E, Bercovier H, Frelie P F, 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. *J Clin Microbiol* 36, 2778-2781.
- Biswas S, Rolain J M, 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Meth*, 92, 14-24.
- Borrell N, Acinas S G, Figueras M-J, Martínez-Murcia A J, 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16 rRNA genes. *J Clin Microbiol* 35, 1671-1674.
- Castro-Escarpulli G, Figueras M-J, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio G O, Guarro J, Chacón M R, 2003. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol*, 84, 41-49.
- Conville P S, Witebsky F G, 2004. Current issues pertaining to the *Nocardia* species. *Clin Microbiol Newsletters*, 26, 57-62.
- Elliott D G, McKibben C L, Conway C M, Purcell M K, Chase D M, Applegate L J, 2015. Testing of candidate non-lethal sampling methods for detection of *Renibacterium salmoninarum* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis Aquat Org*, 114, 21-43.
- Evelyn TPT. 1977, An improved growth medium for the kidney disease bacterium and some notes on using the medium. *Bull OIE*, 87, 511-513.
- Figueras M J, Soler L, Chacon M R, Guarro J, Martinez-Murcia A J, 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2069-2073.
- Gravet A. Gessier M, 2013. Spectrométrie de masse et microbiologie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28, 297-308.
- Gregersen T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 123-127.
- Ivanova E P, Flavier S, Christen R, 2004. Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: Emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov. *Colwelliaceae* fam. nov. *Shewanellaceae* fam. nov. *Moritellaceae* fam. nov. , *Ferrimonadaceae* fam. nov. *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54, 1773-1788.
- Izumi S, Liu H, Aranishi F, Wakabayashi H. 2003, A novel serotype of *Flavobacterium psychrophilum* detected using antiserum against an isolate from amago, *Oncorhynchus masou rhodurus* Jordan & Gilbert, in Japan. *Journal of Fish Diseases*, 26, 677-680.
- Janda J M, Abbott S L, Khashe S, Kellogg G H, Shimada T, 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* 34, 1930-1933.
- Kurokawa S, Kabayama J, Fukuyasu T, Hwang S D, Park C . Park S B, ... & Hirono, I. 2013. Bacterial classification of fish-pathogenic *Mycobacterium* species by multigene phylogenetic analyses and MALDI Biotyper identification system. *Marine biotechnology*, 15, 340-348.
- Lee H, Park H-J, Cho S-N, Bai G-H, Kim S-J, 2000. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol* 38, 2966-2971.
- Mata A I, Gibello A, Casamayor A, Blanco M M, Dominguez L, Fernández-Garayzábal J F, 2004. Multiple PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3183-3187.

- Michel C, Pelletier C, Boussaha M, Douet D-G, Lautraite A, Tailliez P, 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microbiol*, 73, 2947-2955.
- Rivalier E. Seydel S. 1932. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué à l'étude microscopique des champignons des teignes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 10, 444-452.
- Rochat T, Fujiwara-Nagata E, Calvez S, Dalsgaard I, Madsen L, Calteau A, Lunazzi A, Nicolas P, Wiklund T, Bernardet J-F, Duchaud, E, 2017. Genomic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* serotypes and development of a multiplex PCR-based serotyping scheme. *Front Microbiol*, 8, 1752. [en lignr] doi: 10.3389/fmicb.2017.01752
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, Yamamoto S, 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: Proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov. and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1639-1652.
- Talaat A M, Reimschuessel R, Trucksis M, 1997. Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Vet Microbiol*, 58, 229-237.
- Thompson F L, Iida T, Swings J, 2004, Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 403-431.
- Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H, 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol* 36, 983-985.