

Le diagnostic bactériologique du choléra

Marie-Laure Quilici a,*

RÉSUMÉ

Le choléra est une infection intestinale aiguë à caractère épidémique, strictement humaine, à l'origine de pandémies et représentant un problème majeur de santé publique. La perte massive de liquide diarrhéique riche en électrolytes entraîne une déshydratation importante pouvant provoquer un état de choc. En l'absence de traitement, le choléra est mortel dans 25 à 50 % des cas, mais le traitement réduit le taux de mortalité à moins de 1 %. L'agent du choléra est une bactérie à Gram négatif, appartenant aux sérogroupe O1 ou O139 de l'espèce *Vibrio cholerae*. Le rôle du laboratoire de bactériologie est très important pour le diagnostic de cas isolés - cas dits « d'importation » - ou pour le diagnostic des premiers cas d'un nouveau foyer épidémique. Le diagnostic bactériologique est relativement aisés du fait de l'abondance du vibron cholérique dans les selles. Cependant, les épidémies de choléra surviennent souvent dans des régions où il n'y a pas de laboratoire de microbiologie, alors qu'un diagnostic rapide et rigoureux est indispensable pour mobiliser les ressources nécessaires au traitement des malades et maîtriser l'épidémie. Un test de diagnostic rapide, qui serait d'une grande utilité pour les pays ne disposant pas des infrastructures nécessaires, est en cours de validation par l'OMS. Son utilisation ne dispensera pas cependant de l'isolement de la souche, indispensable à l'étude de caractères d'intérêt épidémiologique. Le suivi des souches et l'échange d'informations au niveau mondial sont des éléments indispensables à la mise en place d'une surveillance efficace du choléra.

Vibron cholérique – manifestations cliniques – enrichissement – isolement – identification présumptive – agglutination – sérogroupe O1-O139 – déclaration.

1. Historique et situation actuelle

Le choléra, maladie infectieuse diarrhéique d'origine bactérienne, à caractère épidémique, est connu depuis très longtemps, comme en témoigne son étymologie la plus probable qui signifie en grec ancien « écoulement de bile ». Ce n'est cependant qu'en 1817 que commença la première pandémie cholérique qui envahit l'Asie, le Moyen-Orient et l'Est de l'Afrique et qui dura jusqu'en 1823. Les pandémies qui lui ont succédé, ayant toutes l'Asie comme point de départ, ont atteint successivement tous les continents en progressant de plus en plus rapidement avec l'amélioration des moyens de transport [1]. C'est au cours de

SUMMARY

Laboratory diagnosis of cholera

Cholera is an acute intestinal infection that is strictly limited to humans. It can cause epidemics and cholera infection has reached pandemic proportions, representing a major international public health concern. The massive loss of diarrheal fluid rich in electrolytes, due to the activity of the cholera toxin, causes dehydration leading to major shock. If left untreated, cholera has a 25-50 % mortality rate. Treatment reduces the mortality rate to less than 1 %. Cholera is caused by two serogroups (O1 and O139) of a Gram-negative bacterium, *Vibrio cholerae*. Bacteriology laboratories are very important for the diagnosis of isolated cases – generally imported - or for the diagnosis of the first cases of an epidemic. Bacteriological diagnosis of cholera is reasonably easy, due to the abundance of *Vibrio cholerae* in stool. Epidemics, however, frequently occur in areas with either limited or no laboratory facilities, while rapid and accurate diagnosis of cholera is essential to mobilize the resources needed for treatment of patients and containment of the epidemic. A rapid diagnostic test, which would be very useful to countries lacking the necessary infrastructure, is currently being validated by the WHO. Its use, however, will not remove the need to isolate the cholera-inducing *Vibrio* strains, essential for studying characteristics of epidemiological interest. Continued monitoring of strains and information-sharing at the international level are part of an effective cholera surveillance system.

Choleragenic vibrio – clinical manifestations – enrichment – isolation – presumptive identification – agglutination – serogroups O1-O139 – reporting.

la cinquième pandémie (1881-1896) que Robert Koch démontra, en 1883, le rôle pathogène de la bactérie *V. cholerae* (observée sur des coupes anatomiques par Pacini en 1854) dans le choléra. Cette bactérie fut identifiée ultérieurement comme appartenant au sérogroupe O1 et au biotype classique de l'espèce *V. cholerae*. Nous sommes actuellement, depuis 1961, dans la septième pandémie cholérique, due à *V. cholerae* O1, biotype El Tor. Les souches appartenant à ce biotype, défini sur la base de quelques caractères phénotypiques, ont été isolées pour la première fois en 1905 au lazaret de El Tor, dans la presqu'île du Sinaï. Il fallut cependant attendre 1961 pour qu'elles soient reconnues comme responsables du choléra. C'est pourquoi la septième pandémie cholérique n'a commencé officiellement qu'en 1961, avec la dissémination

^aCentre national de référence des vibrons et du choléra

Laboratoire des bactéries pathogènes entériques
Institut Pasteur
28, rue du Dr Roux
75724 Paris cedex 15

* Correspondance
quilici@pasteur.fr

en Asie de *V. cholerae* O1, biotype El Tor. Cette septième pandémie a atteint l'Afrique en 1971, l'Amérique latine et l'Amérique centrale en 1991 et Madagascar en 1999, alors que cette île avait été épargnée par ce fléau pendant un siècle. Alors que la septième pandémie cholérique est loin d'être terminée, l'apparition en Inde et au Bangladesh, fin 1992, d'épidémies de choléra provoquées par une souche différente de la souche responsable de la septième pandémie, et appartenant à un nouveau sérogroupe de l'espèce *V. cholerae*, le sérogroupe O139, fait peser la menace d'une huitième pandémie. Il semble cependant à ce jour que cette souche reste confinée au continent asiatique. Au début du XXI^e siècle, l'évolution du choléra est caractérisée par la persistance d'un grand nombre de pays atteints par des épidémies, la persistance pour certains d'entre eux d'épidémies dramatiques, et le risque représenté par la nouvelle souche de *V. cholerae* O139 contre laquelle *V. cholerae* O1 n'induit pas de protection croisée. Les deux continents les plus touchés sont l'Afrique et l'Asie, 94 % du total des cas et 98 % des décès étant signalés en Afrique. Le choléra reste aujourd'hui une maladie grave, aussi bien pour l'individu que pour les collectivités, notamment par ses conséquences économiques dans les pays en développement. Comme l'observe chaque année l'Organisation mondiale de la santé (OMS), qui publie un état du choléra dans le monde à partir des notifications effectuées par les pays, «*le nombre de personnes actuellement vulnérables au choléra augmente de façon spectaculaire dans l'ensemble du monde, créant les conditions d'un problème majeur à l'échelon de la planète*». Pour l'année 2008, 56 pays ont officiellement déclaré à l'OMS un total de 190 130 cas et 5 143 décès [2]. L'OMS «*estime toutefois que les chiffres réels sont plus élevés, compte tenu de la sous-notification et d'autres insuffisances des systèmes de surveillance ainsi que de l'augmentation du nombre de personnes vulnérables*», et estime à moins de 10 % des cas réels le nombre de cas officiellement déclarés. Pour illustrer cette sous-notification, nous citerons l'exemple, qui n'est sans doute pas unique, du Bangladesh où de 100 000 à 600 000 personnes sont atteintes de choléra chaque année alors qu'aucun cas n'est notifié à l'OMS.

2. Clinique, physiopathologie et modalités de contamination

Après une incubation de quelques heures à quelques jours, le choléra se manifeste brutalement par de violentes diarrhées et des vomissements, sans élévation de la température. Les selles, fécaloïdes au début, deviennent rapidement aqueuses, couleur eau de riz, avec des flocons blanchâtres, grains riziformes qui sédimentent et se remettent facilement en suspension. Les selles cholériques ne sont jamais sanguinolentes sauf en cas d'association avec une autre pathologie comme une shigellose. Cette importante fuite d'eau et d'électrolytes entraîne des crampes musculaires très douloureuses ainsi qu'une soif intense impossible à calmer du fait des vomissements. Ces crampes et ces douleurs atteignent les membres inférieurs, les membres supérieurs, les muscles de la face, puis l'abdomen et le thorax. Les yeux s'enfoncent dans les orbites, les muscles

orbiculaires des lèvres se crispent, donnant une expression de «rire sardonique». Le visage du cholérique est cyanosé d'où l'expression «avoir une peur bleue». Les autres conséquences de la déshydratation sont : un pouls rapide et filant difficilement prenable, un effondrement de la pression artérielle, une respiration difficile, un enfouissement des joues, un pli cutané persistant révélant la déshydratation du tissu cellulaire, une peau couverte d'une sueur froide due à une baisse de la température des extrémités alors que la température centrale est presque normale (choléra algide), une oligurie évoluant rapidement vers une anurie. Même lorsque la déshydratation est importante, le malade, prostré, reste lucide, parfois agité et irritable. En l'absence de traitement, il évolue vers un état de grande faiblesse, de léthargie puis la mort survient en 1 à 3 jours, dans 25 à 50 % des cas, par collapsus cardiovasculaire. La mortalité est plus importante chez les enfants, les personnes âgées ainsi que chez les sujets carencés. Cette forme clinique du choléra avec état de choc représente classiquement 10 % des cas de choléra au cours d'une épidémie.

Le choléra peut aussi se manifester sous la forme d'une gastroentérite sévère entraînant une déshydratation importante (5 à 10 % du poids du corps) mais sans état de choc. Classiquement, cette forme représente environ 30 % des cas et l'évolution est le plus souvent favorable.

Enfin, dans environ 60 % des cas, le choléra se manifeste sous une forme très atténuée, appelée «cholérine», plus difficile à diagnostiquer, et dont l'évolution est plus lente et généralement moins grave, la guérison survenant le plus souvent spontanément en quelques jours.

À côté de ces formes cliniques typiques, il existe de rares cas de choléra «sidérant» ou «sec» dans lequel une chute brutale de la tension entraîne la mort par collapsus alors qu'il n'y a pratiquement pas eu de diarrhée. Dans ces formes d'évolution foudroyante, qui surviennent généralement chez les enfants, les sécrétions intestinales restent confinées dans un intestin grêle et un côlon distendus.

Le choléra résulte de l'absorption, par voie orale, du vibron cholérique contaminant l'eau ou les aliments. La dose infectieuse, déterminée au cours d'expérimentations sur des volontaires, est relativement élevée, de l'ordre de 10^8 à 10^{11} bactéries, du fait de la sensibilité du vibron cholérique à l'acidité gastrique. Cela explique que la dose infectieuse soit beaucoup plus faible lorsque les vibrions cholériques sont inclus dans des aliments, qui les protègent pendant leur passage dans l'estomac. Il a été montré que la neutralisation de l'acidité gastrique par une solution de bicarbonate de sodium permettait d'abaisser la dose infectieuse à 10^4 - 10^6 bactéries, et cette méthode est utilisée pour les infections expérimentales réalisées chez des volontaires aux États-Unis.

Après passage dans l'estomac, les vibrions qui ont survécu se fixent au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle, traversent la couche de mucus et adhèrent aux entérocytes grâce à leurs pili. Ils sécrètent alors la toxine cholérique, principale toxine produite par le vibron cholérique, composée d'une sous-unité A et de 5 sous-unités B, dont l'action va altérer les transports ioniques membranaires, à l'origine de la diarrhée. Ce dérèglement ionique entraîne une perte massive d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale, aboutissant à la diarrhée caractéristique du choléra.

Le volume d'eau éliminé peut atteindre 15 à 20 L par jour, ce qui explique la gravité de la déshydratation. Le compartiment extracellulaire est d'abord touché par cette déshydratation, avec une diminution des volumes intravasculaires. Ensuite, l'atteinte du compartiment intracellulaire affecte les fonctions cellulaires. Lorsque le volume intravasculaire diminue de plus de 20 %, l'hypotension et le manque de perfusion des organes vitaux entraînent la mort.

La toxine cholérique ne provoque pas de lésions cellulaires et peut donc être considérée plus comme une cytotoxine que comme une cytotoxine. Cela explique que la muqueuse intestinale ne présente pas de lésions macroscopiques et que le malade, bien réhydraté, guérisse sans séquelle. L'élimination naturelle des vibrions cholériques, liée à un facteur mécanique, l'abondance de la diarrhée, et la mise en place de défenses immunitaires, d'abord non spécifiques puis spécifiques, contribuent à une possible évolution spontanée vers la guérison. Cependant, paradoxalement, l'absence de lésions cellulaires et le fait que le vibron cholérique ne pénètre pas dans les cellules, expliquent que les malades ne présentent pas d'élévation de leur température et qu'en conséquence, leur état de conscience soit maintenu jusqu'à un stade avancé de la maladie. Le maintien de cet état de conscience, chez un malade qui se voit littéralement mourir, contribue sans doute à la sinistre réputation du choléra dans la conscience populaire.

La physiopathologie du choléra permet de comprendre la transmission des vibrions cholériques. La propagation rapide du choléra dans les populations s'explique par le fait que l'homme est d'une part un milieu de culture et d'autre part un moyen de transport. En effet, les selles diarrhéiques, libérées en grande quantité sous l'action de la toxine cholérique, vont répandre les vibrions cholériques dans l'environnement ; en l'absence de systèmes d'assainissement et d'approvisionnement en eau potable, qui représentent de ce fait un bon marqueur de la pauvreté et de l'absence d'hygiène d'une population, les vibrions cholériques sont alors transmis de façon indirecte par contamination de l'eau et des aliments (péril orofécal) et de façon directe par les contacts interhumains. De nombreuses études épidémiologiques réalisées en Asie, en Afrique et en Amérique latine ont démontré le rôle important des aliments contaminés dans la transmission du choléra et notamment des aliments préparés ou conservés dans de mauvaises conditions d'hygiène, comme ceux préparés dans la rue [3]. Par ailleurs, pendant la période d'incubation de la maladie, ou au cours d'un portage asymptomatique, l'homme transporte les vibrions cholériques dans son intestin, sur des distances plus ou moins longues selon les moyens de transport utilisés. Des études ont montré que le portage de vibrions cholériques pouvait persister de 2 semaines à 7 mois chez des convalescents.

Les vibrions cholériques possèdent également une deuxième niche écologique, l'environnement marin. C'est l'acquisition, par des souches de sérotype O1 de l'espèce *V. cholerae* – initialement d'origine marine et dont la niche écologique est représentée par les eaux côtières et estuariennes –, d'une cassette de virulence transmise par un phage, le phage CTX, qui leur a permis de devenir des vibrions cholériques et de conquérir avec le succès que

l'on connaît une nouvelle niche écologique : l'homme [4]. Il est également possible que la survie des vibrions cholériques dans l'environnement marin puisse jouer un rôle dans l'entretien des épidémies de choléra. L'existence d'un réservoir naturel aquatique de vibrions cholériques associés au phytoplancton et zooplancton a été démontrée au Bangladesh [5]. La période de floraison de ce plancton dans le golfe du Bengale correspond à une recrudescence des cas de choléra dans cette région du monde.

3. Agents responsables

Les agents responsables du choléra, appelés vibrions cholériques, sont des bactéries mobiles, Gram négatifs, oxydase positifs, appartenant à la famille des *Vibrionaceae* et au genre *Vibrio*. Ce genre bactérien comprend plus de 90 espèces, ayant essentiellement pour habitat le milieu marin et, plus particulièrement, les eaux côtières et estuariennes. La diversité des espèces du genre *Vibrio* est à la mesure de celle du milieu marin. Du point de vue médical, il est cependant possible de distinguer 2 populations parmi les vibrions pathogènes pour l'homme :

- les vibrions cholériques, responsables du choléra, population constituée de souches appartenant à 2 sérogroupes – O1 et O139 – de l'espèce *V. cholerae*. Ces souches se sont adaptées à l'homme et possèdent donc 2 niches écologiques, l'homme et les eaux côtières et estuariennes ;
- les vibrions non cholériques, appartenant d'une part aux sérogroupes de l'espèce *V. cholerae* autres que O1 ou O139 (*V. cholerae* non-O1/non-O139), et, d'autre part, à d'autres espèces du genre *Vibrio*, parmi lesquelles on peut citer *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*. L'homme entre en contact avec ces « vibrions non cholériques » par l'intermédiaire de la mer ou de ses produits, par ingestion ou par contact direct. Ces vibrions non cholériques, qui ne sont pas spécialement adaptés à l'homme à la différence des vibrions cholériques, entraînent des toxi-infections alimentaires ou des infections sporadiques, ces dernières pouvant être gravissimes [6].

L'isolement d'une souche appartenant à l'espèce *V. cholerae* ne suffit donc pas pour affirmer que l'on est en présence d'un cas de choléra. Outre le fait qu'il faut bien entendu tenir compte du contexte clinique, il faut en effet poursuivre les investigations par la détermination du sérotype (O1 ou O139), et parfois par la recherche des gènes de la toxine cholérique, avant d'affirmer que l'on a affaire à un vibron cholérique. Il est donc regrettable que le terme « cholera », fortement évocateur du choléra, ait été utilisé pour désigner une espèce bactérienne qui n'est pas toujours responsable de cette maladie.

Le sérotype O est déterminé par la spécificité immunologique d'un antigène exposé à la surface des bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide. Plus de 200 sérogroupes O ont été décrits au sein de l'espèce *V. cholerae*. Parmi les souches de *V. cholerae* O1, on distingue principalement 2 sérotypes : les sérotypes Ogawa et Inaba. Un troisième sérototype a été décrit, le sérototype Hikojima, correspondant à une forme de transition entre les 2 premiers. Les souches de *V. cholerae* O1 peuvent aussi être classées en biotypes en fonction de caractères phénotypiques et génotypiques

Tableau I – : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des biotypes de <i>V. cholerae</i> O1.									
Biotypes	Marqueurs phénotypiques						Marqueurs génotypiques		
	VP ¹	PB ²	CCA ³	HEM ⁴	Phage IV ⁵	Phage V ⁶	tcpA ⁶	ctxB ⁷	rstR ⁸
Classique	-	S	-	-	(S)	(S)	Cla	Cla	Cla
El Tor	+	(R)	+	(+)	(R)	(R)	ET	ET	ET

*Adapté de Safa et al, Trends Microbiol 2009;18:46-54.

S: sensible ; **R:** résistant ; le symbole () indique des résultats variables.

1. **VP:** réaction de Voges-Proskauer permettant la mise en évidence de la production d'acétoïne.
 2. **PB:** sensibilité à la polymyxine B, déterminée par la méthode de diffusion en disque sur milieu Mueller-Hinton.
 3. **CCA:** chicken cell agglutination: agglutination des érythrocytes de poulet.
 4. **HEM:** capacité b-hémolytiques de *V. cholerae* O1 testée sur gélose au sang de mouton.
 5. **phages IV et V:** sensibilité aux bactériophages IV et V de Mukerjee.
 6. **tcpA:** toxin co-regulated pilus (TCP) : récepteur du phage CTX ϕ et facteur de colonisation des cellules intestinales; sa séquence génomique diffère à l'extrémité C terminale entre les souches classiques et El Tor.
 7. **ctxB:** sous-unité B de la toxine cholérique; sa séquence varie selon le biotype par quelques mutations.
 8. **rstR:** répresseur du phage CTX ϕ , dont la séquence varie selon le biotype.

présentés dans le **tableau I**. Les souches du biotype classique, responsables des 5^e et 6^e pandémies, ont quasiment disparu, à l'exception d'un foyer dans le golfe du Bengale. Les souches du biotype El Tor sont responsables de la 7^e pandémie. On assiste depuis quelques années à l'émergence, au Bangladesh, et la dissémination, de variants de *V. cholerae* O1 biotype El Tor, hybrides entre les souches des biotypes classique et El Tor [7]. Ces souches, également identifiées dans certains pays d'Afrique de l'Est, se révéleraient, d'après des constatations de terrain, plus virulentes, entraînant un taux de létalité plus élevé. La dissémination de ces souches dans d'autres parties du monde [8] a conduit certains auteurs à proposer une révision du schéma de nomenclature actuel des biotypes [9]. *V. cholerae* O1 a été le seul agent connu du choléra pendant plus d'un siècle, entre 1883 et 1992. L'apparition d'une nouvelle souche de vibron cholérique appartenant à un nouveau sérogroupe – O139 – de l'espèce *V. cholerae* représente donc un événement considérable dans l'histoire du choléra. Cette nouvelle souche est identique à *V. cholerae* O1 par les formes cliniques de choléra qu'elle entraîne, par ses caractères biochimiques et par ses facteurs de virulence, dont le principal est la toxine cholérique. Cependant, l'immunité induite à la suite d'un contact avec *V. cholerae* O1 ne protège pas contre *V. cholerae* O139, ce qui montre que les anticorps dirigés contre la toxine cholérique ne sont pas protecteurs et ce qui apporte un argument en faveur du rôle protecteur des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide. Des travaux de génétique bactérienne ont montré que *V. cholerae* O139 résulte d'un transfert de matériel génétique d'une souche de *V. cholerae* non-O1, ne produisant pas la toxine cholérique [10, 11], à une souche de *V. cholerae* O1, produisant la toxine cholérique. Ce transfert a provoqué la modification de la structure chimique du lipopolysaccharide de la souche réceptrice, et donc la conversion du sérogroupe O1 en sérogroupe O139, alors que cette souche gardait sa capacité à produire la toxine cholérique et donc à provoquer le choléra. *V. cholerae* O139 possède de plus une capsule polysaccharidique, dont la structure de base est identique à celle de la partie polysaccharidique spécifique du lipopolysaccharide O139.

Dans les directives de l'OMS, *V. cholerae* O1 et *V. cholerae* O139 sont classés comme causes reconnues du

choléra et doivent être notifiés de la même manière auprès des autorités sanitaires compétentes.

4. Diagnostic

La prise en charge d'une épidémie de choléra représente une urgence de santé publique [12, 13]. Le diagnostic du choléra est d'abord clinique, mais le rôle du laboratoire de bactériologie est essentiel pour l'identification de l'agent étiologique de l'épidémie.

4.1. Diagnostic clinique

«Une diarrhée sévère suivie de vomissements qui tue les adultes en quelques heures est presque toujours un choléra», disait Lapeyssonnie, médecin militaire exerçant en Afrique lors de l'arrivée de la septième pandémie cholérique sur ce continent, en 1970 [14]. Il ne faut donc pas attendre le résultat du laboratoire pour commencer le traitement. Il est cependant frappant de constater que, malgré l'aspect typique de la forme clinique majeure du choléra, le diagnostic clinique n'est pas toujours évident, même pour des cliniciens ayant une grande expérience de cette maladie. En effet, une étude récente réalisée à Dacca, au Bangladesh, dans un hôpital spécialisé dans le traitement du choléra et qui reçoit chaque année jusqu'à 100 000 cholériques, a montré que le diagnostic clinique (spécificité, sensibilité) n'était exact que dans 79 % des cas.

4.2. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic d'un vibron cholérique (*V. cholerae* O1 ou *V. cholerae* O139) au laboratoire est toujours une question de rigueur et de rapidité qui engage le biologiste, le clinicien, les autorités sanitaires nationales et l'OMS.

• Essentiel

L'identification du vibron cholérique dans les prélèvements de selles diarrhéiques est essentielle pour affirmer la présence du choléra. Le rôle du laboratoire de bactériologie est donc très important soit pour le diagnostic de cas isolés – cas dits «d'importation» – soit pour le diagnostic des premiers cas d'un nouveau foyer épidémique. Il est donc indispensable de rechercher les vibrions cholériques dès que des cas cliniques suspects sont signalés dans

une région à risque. Lorsque l'épidémie se développe, la recherche du vibron cholérique devient inutile d'une part parce qu'elle n'apporte rien au traitement des malades, et d'autre part, parce qu'elle surcharge inutilement le laboratoire. En revanche, la recherche du vibron cholérique sur les prélevements suspects redeviennent utile lorsque l'épidémie est dans sa phase descendante. En effet, les examens de laboratoire permettent, lorsqu'ils sont négatifs, de confirmer bactériologiquement la fin d'une épidémie de choléra. Une autre caractéristique du diagnostic du vibron cholérique est qu'il doit être réalisé à la fois avec rigueur et rapidité. La rigueur permettra d'éviter aussi bien les fausses alertes au choléra que les retards dans la détection d'un nouveau foyer cholérique. La rapidité du diagnostic permettra la mise en œuvre rapide de mesures sanitaires pour limiter la progression de l'épidémie.

• **Simple**

Le diagnostic bactériologique du choléra consiste en l'identification de la bactérie responsable dans des selles suspectes. Cette bactérie est relativement simple à identifier du fait de sa concentration habituellement élevée dans les selles de malades. Elle est de plus peu exigeante pour sa culture, et présente à sa surface un antigène spécifique – l'antigène O1 ou l'antigène O139 – qui permet son identification par une simple réaction d'agglutination sur lame. C'est d'ailleurs la reconnaissance de cet antigène par des anticorps spécifiques qui a été mise à profit pour le développement d'un test de diagnostic rapide du choléra sur bandelette.

• **Rendu inutilement confus**

L'identification du vibron cholérique a été rendue confuse par l'utilisation du nom unique de « *V. cholerae* » pour désigner à la fois le vibron cholérique et également des bactéries qui n'ont jamais été rendues responsables de cas de choléra. En effet, **seules les souches de l'espèce *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 sont à l'origine de cas de choléra, et sont appelées vibrions cholériques.** Les souches de l'espèce *V. cholerae* appartenant aux autres sérogroupes, désignées comme *V. cholerae* non-O1/non-O139, peuvent provoquer des diarrhées, des abcès ou des septicémies, mais ne provoquent pas d'épidémies de choléra et ne sont pas des souches de vibron cholérique. Une autre source de confusion est due à l'inclusion de caractères superflus dans les schémas classiques d'identification du vibron cholérique. En effet, s'il est intéressant de connaître le biotype (« classique » ou El Tor) et le sérotype (Ogawa ou Inaba pour les souches de *V. cholerae* O1) des souches, ces informations ne sont pas nécessaires au diagnostic et ne doivent en rien retarder le rendu des résultats. De même, elles ne doivent pas interférer dans la prise en charge de l'épidémie. Cela est particulièrement important pour le diagnostic du vibron cholérique dans un laboratoire disposant de moyens limités.

• **Une démarche diagnostique différente des démarches classiques**

La nécessité de rigueur et de rapidité pour l'identification du vibron cholérique est à l'origine d'une démarche diagnostique différente de celle qui est habituellement utilisée en bactériologie.

Généralement, dès qu'une souche suspecte est isolée, les

schémas classiques d'identification bactérienne donnent la priorité à la détermination de l'espèce à laquelle cette souche appartient, par l'étude des caractères biochimiques. Cette étude requiert un délai de 24 à 48 heures après l'isolement de la souche, et la détermination du sérogroupue et/ou du sérotype n'intervient qu'après l'identification de l'espèce.

Pour être effectué autant avec rigueur que rapidité, le diagnostic du vibron cholérique comporte d'abord un diagnostic présomptif de l'espèce *V. cholerae*. Ce diagnostic présomptif associe l'étude de quelques caractères – morphologiques, culturaux et biochimiques – à la recherche de l'agglutination de la souche suspecte par les sérum anti-O1 et anti-O139. Cette démarche, associée au contexte clinique et écologique dans lequel a été effectué le prélèvement, permet d'établir avec une quasi-certitude que la souche isolée est un vibron cholérique.

Si la réponse est positive, le laboratoire local doit :

- faire une déclaration de présomption de choléra aux autorités sanitaires nationales, en fonction des dispositions locales, de façon à ce que ces autorités prennent les mesures nécessaires ;
- envoyer la souche à un laboratoire national de référence pour confirmation du diagnostic.

Depuis l'entrée en vigueur le 15 juin 2007 du nouveau Règlement sanitaire international (RSI), adopté par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2005, le choléra n'est plus nominativement désigné comme étant une maladie à déclaration obligatoire au niveau international. Sa notification éventuelle à l'OMS par les autorités sanitaires se fera si le cas entre dans les critères de déclaration, le nouveau règlement imposant maintenant aux États membres de l'OMS de déclarer « tous les événements sanitaires susceptibles de constituer une urgence de santé publique de portée internationale », quelle que soit la pathologie concernée. L'identification de l'espèce *V. cholerae* est ensuite poursuivie selon les méthodes bactériologiques classiques avec l'étude d'un plus grand nombre de caractères biochimiques. La composition des milieux utilisés est présentée en [annexe I](#) de ce document.

4.2.1. Type de prélèvements étudiés

On peut être amené à rechercher le vibron cholérique dans les selles et les vomissements. La méthodologie sera dans tous les cas sensiblement identique.

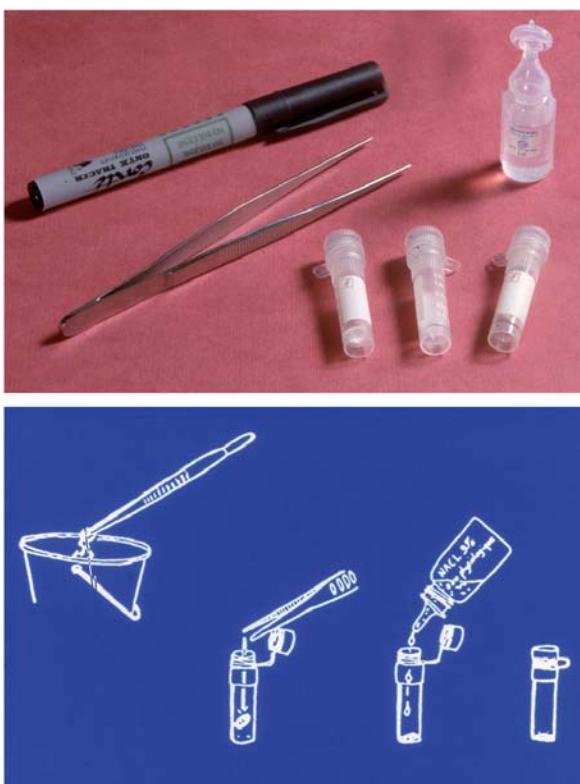
Les selles sont fécaloïdes durant les premières heures de la maladie puis liquidiennes. Le malade peut émettre jusqu'à 15 litres de selles par jour. Ces selles ont l'aspect d'une eau claire dans laquelle flottent des grains riziformes constitués de vibrions et de mucus. Il n'y a jamais de sang dans des selles cholériques sauf complication ou association à une autre pathologie.

Conditionnement, conservation et transport des prélèvements

• **Conditionnement**

La méthode la plus simple pour envoyer les selles suspectes au laboratoire consiste à imbiber un petit morceau de papier absorbant stérile, et à le placer dans un tube stérile en matière plastique à fermeture étanche, contenant quelques gouttes d'eau physiologique stérile ([figure 1](#)).

Figure 1 – Dispositif utilisé par MSF pour le transport au laboratoire des échantillons de selles en vue de la recherche de vibron cholérique.



Un disque de papier absorbant est trempé dans la selle diarrhéique, puis déposé dans un tube en matière plastique. Quelques gouttes de sérum physiologique sont versées dans le tube pour maintenir une atmosphère humide. Le tube est fermé de façon étanche par un bouchon muni d'un joint torique. Le tube doit être envoyé au laboratoire à température ambiante, les vibrons supportant mal les basses températures.

© Institut Pasteur.

D'autres moyens de transport peuvent être utilisés : eau peptonée hypersalée alcaline (milieu de transport et d'enrichissement pour vibrons, Bio-Rad) ou le milieu semi-solide de Cary-Blair. Il faut éviter les solutés salins glycérolés, qui ne sont pas favorables à la conservation des vibrons.

• Conservation des prélèvements

Les échantillons ainsi conditionnés peuvent contenir des vibrons viables jusqu'à 4 ou 5 semaines après la date de conditionnement.

Ils peuvent être envoyés au laboratoire de préférence à température ambiante. Nous avons isolé des souches de vibrons cholériques de prélèvements conservés à température ambiante et reçus au laboratoire plus de 10 jours après leur conditionnement.

Les souches isolées et les prélèvements doivent être conservés au laboratoire sans réfrigération, dans la mesure où ils sont traités rapidement.

• Transport

Plusieurs règlements sont à respecter venant d'autorités différentes, variables selon les produits et les pays. Le transport doit être soumis à la réglementation locale ou internationale concernant le transport des substances

infectieuses. De même, il faut se conformer à la réglementation locale et internationale pour ce qui concerne l'emballage de tels échantillons.

■ Il est impératif d'utiliser un système à triple emballage, et comprenant :

- un récipient primaire étanche contenant la culture ou le matériel biologique (attention, la quantité de matière infectieuse est limitée à 50 mL ou 50 g par colis en aérien);
- une boîte secondaire étanche, résistant aux chocs, avec un matériau absorbant en quantité suffisante, dans laquelle est inséré le récipient primaire;
- un emballage tertiaire résistant dans lequel est placé l'ensemble, dont la plus petite dimension soit supérieure 10 cm, afin de porter le marquage spécifique et l'étiquetage réglementaire obligatoire. Cet étiquetage, permettant l'identification de la classe de danger, est placé sur la paroi externe de l'emballage tertiaire (utiliser les étiquettes de danger normalisées en losange de 10 x 10 cm).

■ Identifier clairement le destinataire et l'expéditeur avec le nom et le numéro de téléphone d'un responsable, éventuellement le numéro de télecopie du laboratoire expéditeur.

■ Placer dans le paquet les documents requis (formulaires, lettre), et si possible envoyer par courrier séparé une copie de ces documents.

■ Les vibrons sont classés dans le groupe de risque 2 des agents pathogènes (Manuel de sécurité biologique en laboratoire 1997, publié par l'OMS, Liste CCE des agents pathogènes, actualisée le 26 novembre 1997). Il existe des textes officiels de référence concernant la réglementation et les directives internationales sur les transferts de matières biologiques. Des informations pratiques peuvent être trouvées en particuliers sur le site de l'Institut Pasteur, <http://www.pasteur.fr/sante/clre/chap/envois/accueil.html>

■ Il est bon dans la mesure du possible d'informer à l'avance le laboratoire de destination de l'arrivée des échantillons. Cela permettra leur prise en charge immédiate dès leur arrivée au laboratoire.

4.2.2. Enrichissement et isolement

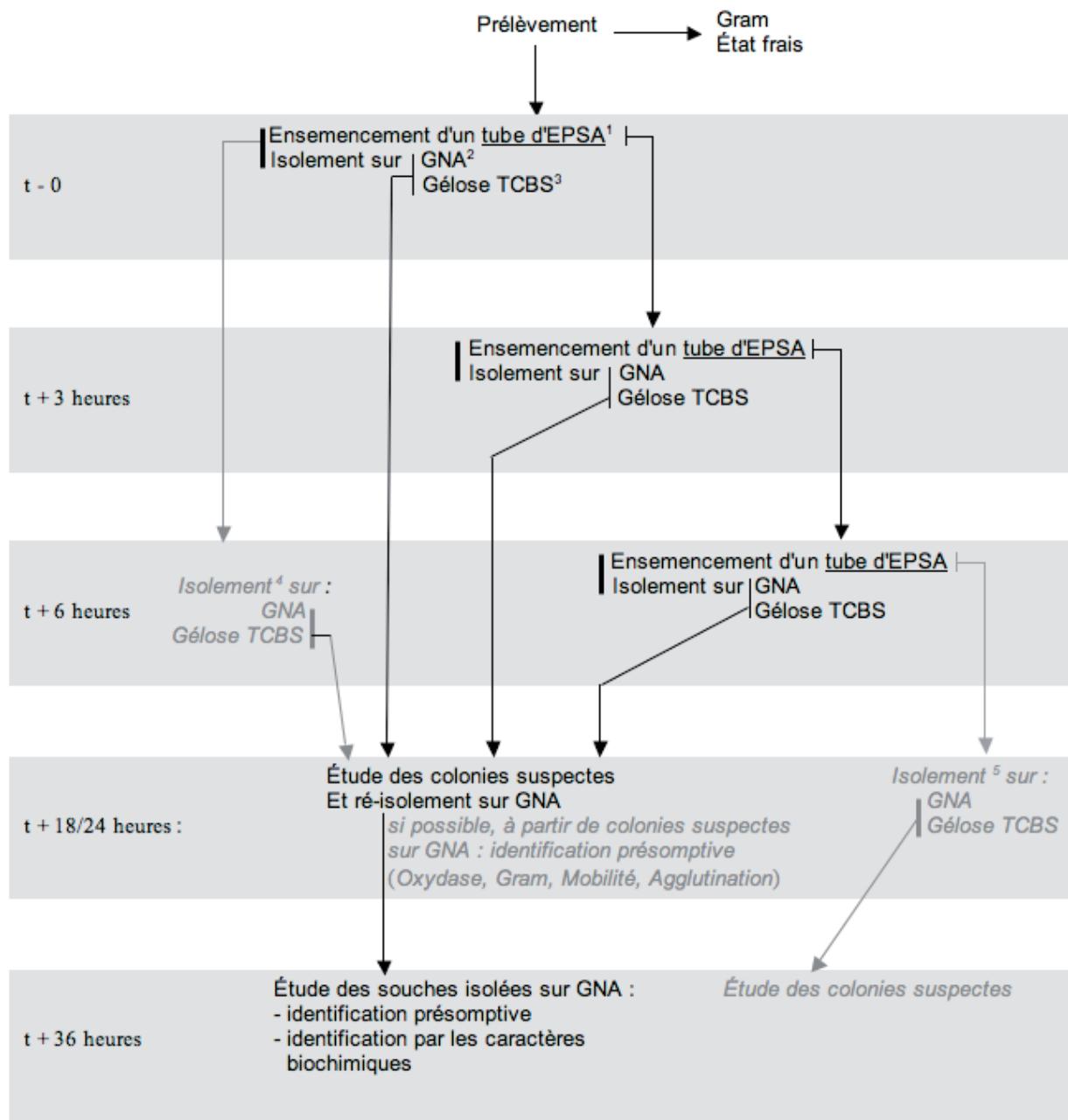
La **fiche technique 1** présente de façon schématique la méthode d'enrichissement et d'isolement du vibron cholérique. Le détail du mode opératoire est présenté dans la **fiche technique 2**.

Cette étape consiste en une succession de cultures en eau peptonée hypersalé alcaline (EPSA) ou en eau peptonée alcaline (EPA), qui ont pour objectif de sélectionner le vibron cholérique par son aptitude à se multiplier en milieu alcalin et salé plus rapidement que les autres germes habituellement présents dans les selles.

Dès qu'un tube d'EPSA ou d'EPA est trouble, la culture est isolée sur une gélose nutritive alcaline (GNA) et sur une gélose sélective thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS). Pour le repiquage et l'isolement à partir des tubes d'enrichissement, il faut prélever délicatement sous la surface de l'eau peptonée, sans agiter le tube.

Le milieu sélectif TCBS est intéressant lorsque les selles sont contaminées par du *Proteus*. Mais les colonies suspectes isolées sur TCBS (colonies saccharose +) doivent cependant être réisolées sur GNA afin de

Fiche technique 1 – Procédure d'enrichissement et d'isolement du vibrion cholérique.

¹ : EPSA : eau peptonée hypersalée alcaline² : GNA : gélose nutritive alcaline³ : TCBS : thiosulfate-citrate-bile-saccharose⁴ : isolement à faire uniquement si la culture en EPSA à t + 3 heures est négative⁵ : isolement à faire uniquement si les isolements effectués à t + 3 heures et à t + 6 heures sont négatifs

* Adaptée de « Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibrion cholérique et des autres vibrions ». Dodin A, Fournier JM - ISBN 2-901320-06-6 – 1992. Collection de la Commission des laboratoires de références et d'expertise de l'Institut Pasteur, Institut Pasteur (trilingue : français, anglais, espagnol).

Fiche technique 2 – Enrichissement et Isolement.		
	Mode opératoire	Commentaires
J1: Enrichissement et isolement		
➤	<ul style="list-style-type: none"> • Répartir stérilement le milieu EPSA dans des tubes de Khan, sous un volume de 2 ml par tube. Prévoir 3 tubes par échantillon. Placer tous les tubes à l'étuve à 37 °C. 	
<p>➤ T-0</p> <p>Ensemencement</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ensemencer un tube d'EPSA à partir de l'échantillon, à l'aide d'une pipette • On peut aussi plonger le papier buvard imprégné de selles dans ce milieu, si le conditionnement du prélèvement le permet. • Ce tube initial d'EPSA (T0) est placé à l'étuve à 37 °C pendant 3 heures. <p>Isolation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prélever l'échantillon avec une anse, faire un isolement sur: <ul style="list-style-type: none"> - gélose nutritive alcaline (GNA) (2 boîtes en épuisement) - gélose thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS) (2 boîtes en épuisement) • Incuber à 37 °C. <p>Examen microscopique</p> <ul style="list-style-type: none"> • État frais: aspect monomorphe avec mucus et cellules desquamées; nombreux germes à mobilité de type polaire, qui se déplacent en vols de moucherons. • Coloration de Gram: flore monomorphe faite de bacilles à Gram négatif, fins, incurvés ou non, isolés. 	<p>L'ensemencement doit être abondant, environ 0,2 ml de selles dans un tube de 2 ml d'EPSA.</p> <p>Faire deux boîtes de chaque milieu en épuisement pour avoir des colonies isolées.</p>	
➤	<p>T+3 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Repiquer le tube T0, même en l'absence de voile, dans un nouveau tube d'EPSA (tube T3). • À partir du tube T0, faire un isolement sur: <ul style="list-style-type: none"> - une GNA, - une gélose TCBS. • Placer à l'étuve à 37 °C. 	<p>Le voile commence à apparaître après quelques heures de culture, mais ne devient très net qu'après 18-24 heures de culture.</p> <p>Pour le repiquage et l'isolement, prélever délicatement sous la surface de l'eau peptonée, sans agiter le tube.</p>
➤	<p>T+6 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Repiquer le tube T3 dans un nouveau tube d'EPSA (tube T6). • À partir du tube T3, faire un isolement sur: <ul style="list-style-type: none"> - une gélose nutritive alcaline, - une gélose TCBS. • Si nécessaire (pas de culture en T3): faire un nouvel isolement à partir du tube T0 sur: <ul style="list-style-type: none"> - une gélose nutritive alcaline, - une gélose TCBS. • Placer à l'étuve à 37 °C. 	
J2: Enrichissement et isolement		
➤	<p>T + 18-24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si les isolements effectués à T+3h et T+6h ne présentent pas de colonies suspectes, refaire des isolements sur GNA et TCBS à partir du tube d'EPSA ensemencé à T+6 h (tube T6). • Si les isolements effectués à T+3 h et/ou T+6 h présentent des colonies suspectes, étudier ces colonies: <ul style="list-style-type: none"> ■ Sur TCBS, les colonies de vibrion cholérique sont arrondies, bombées et habituellement jaunes (sacc+). Reprendre au moins cinq colonies suspectes isolées sur TCBS et les ensemencer sur GNA. ■ Sur GNA, les colonies de vibrion cholérique sont rondes, de taille moyenne, environ 2 mm de diamètre après 18 heures de culture, translucides bleutées, à bord régulier. Si nécessaire, ré-isoler au moins 5 colonies suspectes sur GNA. 	<p>Il faut cependant noter l'existence de souches de vibrion cholérique qui donnent des colonies vertes (sacc-). L'attitude qui consiste à rejeter d'emblée les colonies vertes mérite donc d'être révisée.</p> <p>En pratique, les résultats obtenus sur GNA sont plus fiables et moins sujets à erreur de diagnostic.</p>
➤	<p>Si les colonies sont bien isolées sur GNA et si la culture est en quantité suffisante, l'identification présumptive, associant l'étude de quelques caractères et l'agglutination avec les sérum anti-O1 et anti-O139, peut souvent être pratiquée à ce stade.</p>	

© Institut Pasteur.

pouvoir faire la recherche de l'oxydase ainsi que la réaction d'agglutination avec les sérum anti-O1 et anti-O139. C'est pourquoi il faut toujours penser à utiliser dès le départ une GNA en parallèle avec le milieu TCBS pour isoler le vibrion cholérique. Cela peut permettre de gagner de 16 à 18 heures pour la réaction d'agglutination sur lame.

4.2.3. Identification présumptive du vibrion cholérique

L'identification d'un vibrion cholérique est schématisée sur le « Logigramme d'identification d'un vibrion cholérique » présenté en [annexe II](#). C'est l'étape d'identification présumptive qui conditionne la rapidité du diagnostic bactériologique ([fiche technique 3](#)).

Fiche technique 3 – Identification présumptive.		
	Mode opératoire	Commentaires
J2: Identification présumptive		
➤	<p>Étude de quelques caractères culturaux, morphologiques et biochimiques</p> <p>- À partir des colonies suspectes sur GNA:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Effectuer: <ul style="list-style-type: none"> ➤ un état frais ➤ une coloration de Gram ➤ une réaction d'oxydase <p>Si le germe est</p> <ul style="list-style-type: none"> - un bacille mobile (nombreux germes à mobilité de type polaire, qui se déplacent en vols de moucherons), - à Gram négatif (flore monomorphe, faite de bacilles fins isolés, incurvés ou non) - positif pour le test de l'oxydase, <p>L'identification d'un vibrion cholérique doit être poursuivie par la réaction d'agglutination.</p>	
➤	<p>Agglutination avec les sérum anti-O1 et anti-O139</p> <ul style="list-style-type: none"> • Déposer sur une première lame une goutte d'eau physiologique stérile et à côté une goutte de sérum anti-O1 • Prélever à l'anse de platine quelques colonies et les déposer sur la lame à côté de chacune des gouttes d'eau physiologique et de sérum anti-O1 • Avec l'anse de platine, mélanger doucement et progressivement les bactéries dans chacune des gouttes. Commencer par la goutte d'eau physiologique, continuer par le sérum anti-O1. La suspension doit être bien homogène. Agiter doucement par un mouvement tournant. • Lire à l'œil nu, ou mieux avec une loupe d'horloger, au-dessus d'une surface sombre. L'agglutination doit apparaître rapidement - en moins de 2 min. - et être fine et régulière. • Si la souche n'est pas auto-agglutinable et n'agglutine pas avec le sérum anti-O1, rechercher l'agglutination avec le sérum anti-O139 en déposant sur une seconde lame une goutte de sérum anti-O139. 	<p>La réaction d'oxydase ne doit pas être faite à partir d'une culture sur TCBS, la composition du milieu pouvant induire de faux résultats.</p> <p>L'utilisation d'une anse métallique peut entraîner une réaction faussement positive pour le test de l'oxydase. Utiliser une pipette Pasteur boutonnée ou une anse en plastique jetable.</p> <p>L'agglutination doit être faite de préférence à partir d'une culture sur GNA. Il est déconseillé d'utiliser des cultures sur milieu TCBS qui peuvent donner des réactions d'auto-agglutination en eau physiologique empêchant l'interprétation de la réaction. L'agglutination doit aussi être pratiquée avec une culture jeune.</p> <p>Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec l'eau physiologique. S'il y a agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable, et il est en conséquence inutile de poursuivre la réaction avec le sérum anti-O1 ou le sérum anti-O139. Envoyer la souche à un laboratoire de référence.</p>
➤	<p>Une souche de vibrion cholérique doit obligatoirement agglutiner avec le sérum anti-O1 ou le sérum anti-O139.</p>	
➤	<p>Les lames utilisées doivent être immédiatement jetées dans des bains d'eau de Javel. Le manipulateur doit se laver soigneusement les mains à l'eau javellisée après cette série d'agglutinations.</p>	
<p>© Institut Pasteur.</p>		

Elle peut intervenir à J2 ou J3 en fonction de la pureté et de la quantité de la culture sur GNA, mais elle peut aussi dans certains cas intervenir le jour même de réception du prélèvement suspect au laboratoire (J1), selon l'heure d'arrivée et le niveau de contamination initial du prélèvement. Rappelons en effet que les vibrions ont un temps de génération très court (10 min).

Ce diagnostic présumptif associe l'étude de quelques caractères – morphologiques, culturaux et enzymatiques – à la recherche de l'agglutination de la souche suspecte par les sérum anti-O1 et anti-O139.

Étude de quelques caractères, culturaux, morphologiques et enzymatique

Cette étape est réalisée à partir de colonies isolées sur GNA ayant l'aspect caractéristique décrit dans la **fiche technique 2**.

Si le germe est:

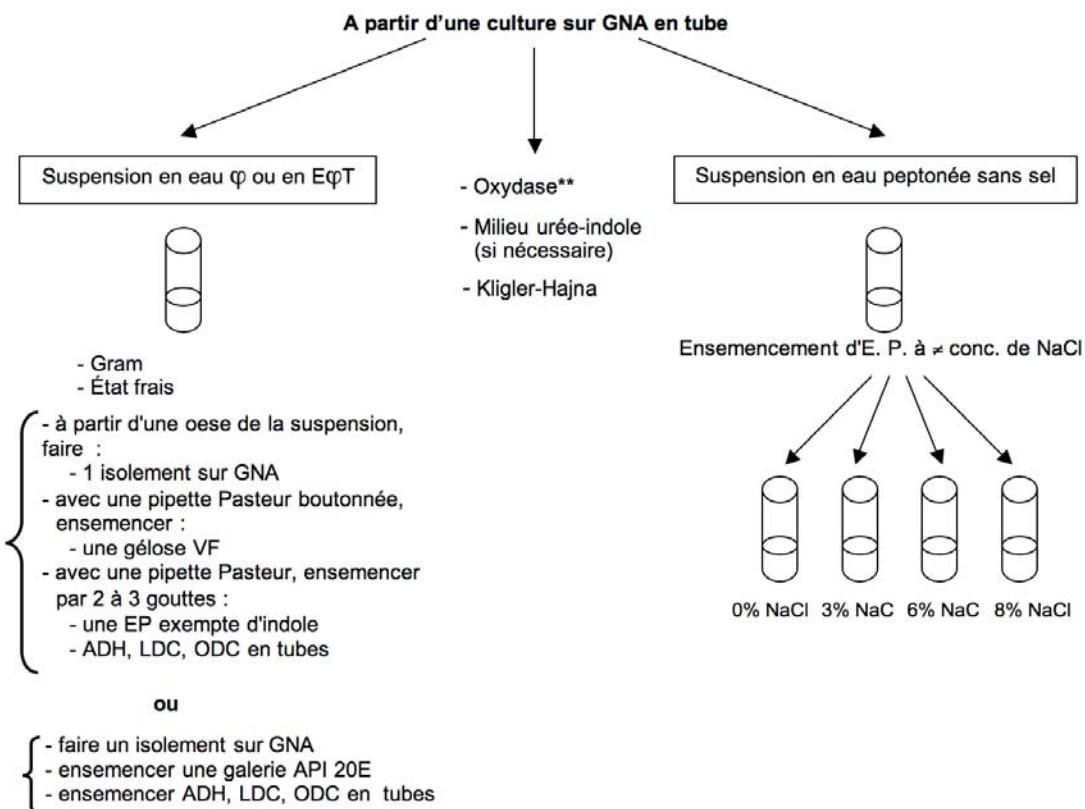
- un bacille mobile, à mobilité de type polaire,
 - Gram négatif, incurvé ou non (**figure 2**),
 - positif pour le test de l'oxydase,
- L'identification d'un vibrion cholérique doit être poursuivie par la réaction d'agglutination.



Fiche technique 4 – Confirmation de l'identification de l'espèce *V. cholerae*.

Constituer la galerie d'identification d'une souche de *Vibrio cholerae* :

- 1 gélose Viande-Foie
- 1 GNA
- 1 Kligler-Hajna*
- 1 disque ONPG
- 1 test indole (E. P. exempte d'indole ou milieu urée-indole)
- ADH, LDC, ODC en tubes
ou
- une plaque API 20E
- ADH, LDC, ODC en tubes



Incuber la nuit (18-24 h) à 37°C.

* : milieu à utiliser en fonction des disponibilités des laboratoires, mais non indispensable pour l'identification de *V. cholerae*.

** : pour le test de l'oxydase, utiliser une pipette Pasteur boutonnée ou une anse de plastique jetable

© Institut Pasteur.

Agglutination avec les sérum anti-O1 et anti-O139

C'est l'étape capitale du diagnostic du vibron cholérique, qui entraînera la prise de mesures sanitaires et la déclaration aux autorités de santé.

Une souche de vibron cholérique (*V. cholerae* O1 ou *V. cholerae* O139) doit obligatoirement agglutiner avec l'un des deux sérum, anti-O1 ou anti-O139. L'agglutination doit apparaître rapidement – en moins de deux minutes – et être fine et granulaire.

Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec l'eau physiologique. S'il y a agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable qui doit être envoyée à un laboratoire de référence.

Le contexte clinique et épidémiologique (essentiellement diarrhée épidémique ou diarrhée survenue au retour d'une région du monde où il y a du choléra), le contexte écolo-

gique (géographie, niveau d'hygiène, climat), les caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et immunologiques (réaction d'agglutination) décrits, permettent de conclure avec une quasi-certitude que la souche isolée est un vibron cholérique.

L'ensemble de ces éléments justifie d'une part la déclaration aux autorités sanitaires qui prendront les mesures nécessaires, et d'autre part l'envoi de la souche à un laboratoire national de référence pour confirmation du diagnostic bactériologique.

4.2.4. Poursuite de l'identification de l'espèce *V. cholerae*

Parallèlement à la déclaration aux autorités sanitaires et à l'envoi de la souche à un laboratoire national de référence,

Fiche technique 5 – Confirmation de l'identification : lecture des résultats.			
	Milieux et réactifs	Caractères d'identification d'une souche de <i>V. cholerae</i>	Commentaires
Tableau des principaux caractères de l'espèce <i>V. cholerae</i>			
➤	<ul style="list-style-type: none"> - Coloration de Gram - État frais - Disque d'oxydase - Gélose viande-foie semi-solide à 6 % - Eau peptonée sans NaCl - Eau peptonée avec NaCl en concentration croissante (1 à 10 %) - TCBS - Kligler-Hajna - Disque ONPG - Eau peptonée hypersalée ou milieu Urée-Indole et réactif de Kovacs - Milieux en tube pour la recherche des décarboxylases et dihydrolase 	<ul style="list-style-type: none"> - Gram – - Mobile polaire - Oxydase + - Croissance aéro-anaérobiose sans production de gaz - Croissance en absence de NaCl - Croissance jusqu'à 6 % de NaCl au maximum - Saccharose positif - Utilisation du glucose sans production de gaz - Lactose négatif - Pas de production d'H₂S - ONPG positif - Indole positif - ADH négatif - LDC positif - ODC positif 	<p>Caractère différentiel avec les <i>Pseudomonas</i>.</p> <p>Il existe des souches de <i>Vibrio cholerae</i> saccharose négatives</p> <p>Caractère peu important pour l'identification des vibrons</p> <p>La majorité des réactions positives sont observées entre 15 et 30 min après incubation à 37 °C.</p> <p>Depuis 1993, des souches indole négatives sont isolées en Afrique</p>
➤	Pour le décodage de la plaque API 20E, prendre en compte pour les décarboxylases et la dihydrolase les résultats obtenus en tubes.		
➤	<p>Remarque : des souches de <i>Vibrio cholerae</i> O1 résistantes au composé O129 sont de plus en plus fréquemment isolées. De ce fait, la résistance au composé O129 ne doit plus être considérée comme un caractère permettant d'éliminer l'espèce <i>Vibrio cholerae</i>. Cette résistance est liée à la résistance au triméthoprime.</p>		
<p>© Institut Pasteur.</p>			

l'identification de l'espèce à laquelle appartient la souche sera poursuivie.

Les principaux caractères culturaux et biochimiques de l'espèce *V. cholerae* ainsi que leurs moyens d'étude sont décrits dans les *fiches techniques 4 et 5*.

L'étude de ces caractères permet de confirmer l'appartenance de la souche à l'espèce *V. cholerae*.

Il faut cependant insister à nouveau sur le fait que l'identification de l'espèce ne permet pas à elle seule de faire la distinction, capitale dans ses conséquences en mesures de santé publique, entre les souches de vibron cholérique (*V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139) et les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139, qui ne sont pas des souches de vibron cholérique. Dans l'attente de la disponibilité d'un test de diagnostic rapide, la réaction d'agglutination au moyen d'un immun sérum reste encore aujourd'hui la seule technique spécifique – **et donc absolument nécessaire** – pour l'identification du vibron cholérique.

5. Études complémentaires

L'étude approfondie des souches de vibrons cholériques peut apporter des informations d'intérêt épidémiologique, permettant éventuellement de détecter l'émergence d'une nouvelle souche épidémique et de déterminer les sources et les modes de transmission de l'agent étiologique de l'épidémie. L'un des rôles majeurs du laboratoire est également la détermination du profil

initial de sensibilité aux agents antimicrobiens de la souche isolée et le suivi d'éventuels changements dans ce profil au cours de l'épidémie. Cette détermination et ce suivi peuvent se faire au niveau du laboratoire de microbiologie ayant initialement isolé le vibron cholérique, ou au niveau du laboratoire de référence, auquel la souche a été expédiée.

5.1. Détermination du profil de sensibilité aux agents antimicrobiens

Bien que l'antibiothérapie ne soit pas essentielle pour traiter les patients atteints de choléra, elle peut s'avérer utile car elle réduit la durée et le volume de la diarrhée, réduisant ainsi le volume des liquides nécessaires à la réhydratation mais également la durée d'émission des vibrons dans les selles et dans l'environnement, et donc les sources possibles de contamination. La multi résistance croissante des souches de vibron cholérique aux antibiotiques a rendu nécessaire la surveillance de la sensibilité aux anti-infectieux. Cette sensibilité représente également un marqueur épidémiologique permettant un suivi des souches sur des périodes bien définies.

L'étude de la sensibilité aux agents antimicrobiens est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques). Les diamètres d'inhibition pour les vibrons ont été établis pour un nombre limité d'antibiotiques par le Comité national des normes pour laboratoires cliniques (NCCLS). Il est possible d'utiliser la technique des disques pour diffusion en gélose pour les bactéries à croissance

rapide selon les recommandations de la Société française de microbiologie ; l'interprétation est faite dans ce cas à partir des abaques de lecture basés sur le diamètre des zones d'inhibition des entérobactéries.

Les antibiotiques habituellement testés sont les aminopénicillines (ampicilline), les quinolones et fluoroquinolones (acide nalidixique, ofloxacine, ciprofloxacine, pefloxacine), la tetracycline, les sulfamides et associations (triméthoprime-sulfaméthoxazole), le chloramphénicol, les nitrofuranes, les macrolides (érythromycine, azithromycine), les polymyxines (polymyxine B, colistine), les céphalosporines de 1^{re} et 3^{re} générations : céfaloquine, céfotaxime.

À noter que l'interprétation des tests de sensibilité à l'érythromycine et à la doxycycline donne des résultats *in vitro* qui ne sont pas toujours corrélés à l'activité *in vivo*. La lecture interprétative de la sensibilité à la tétracycline est également valable pour prédire la sensibilité possible des souches à la doxycycline, cet antibiotique étant souvent prescrit du fait de son administration en une seule dose. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) peut permettre de mettre en évidence des souches de sensibilité diminuée à certains antibiotiques, comme cela a été démontré pour les fluoroquinolones, qui ne seraient pas détectées par des tests qualitatifs.

Tout changement dans les profils de sensibilité doit être communiqué aux services d'épidémiologie et de santé publique. Ces dernières années, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra ont été observées (tétracycline, doxycycline, furazolidone, triméthoprime-sulfaméthoxazole, érythromycine et chloramphénicol, et plus récemment fluoroquinolones).

5.2. Typage moléculaire des souches de vibrions cholériques

Les marqueurs disponibles ne sont pas tous d'égal intérêt.

- Les lysotypes ne sont plus utilisés.
- Parmi les 206 sérogroupes actuellement décrits au sein de l'espèce *V. cholerae*, seuls les souches des sérogroupes O1 et O139 sont à l'origine de cas de choléra. La détermination de ces sérogroupes est d'un intérêt majeur pour l'identification d'un vibron cholérique mais ne permet pas de refléter la variabilité des souches.
- Les biotypes, classique et El Tor, ainsi que les sérotypes, Ogawa, Inaba et Hikojima, ne sont décrits que pour les souches du sérotype O1. La détermination phénotypique des biotypes est basée sur l'expression de caractères tels que production d'acétoïne ou réaction de VP, lyse des hématies de mouton, sensibilité à la polymyxine B, qui sont susceptibles de varier au cours du temps. L'intérêt de la détermination du sérotype est encore souvent considéré à tort comme utile, voire indispensable. Elle n'a en fait qu'un intérêt très limité puisque l'étude de la génétique du lipopolysaccharide de *V. cholerae* O1 a montré qu'une souche pouvait fréquemment muter d'un sérotype à l'autre et donc qu'un changement de sérotype au cours d'une épidémie était à interpréter avec prudence et ne signifiait pas obligatoirement l'arrivée d'une nouvelle souche.
- Des marqueurs moléculaires tels que les profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ribotypes) [15], les profils d'électrophorèse en champs pulsés des fragments d'ADN obtenus après coupure par une enzyme

de restriction (pulsotypes) et l'étude des isoenzymes en électrophorèse ont été caractérisés. L'étude de ces marqueurs a montré, par exemple, que l'épidémie de choléra qui a envahi l'Amérique latine en 1991 représente probablement une extension de la 7^e pandémie. Il a aussi été montré que les vibrions cholériques qui ont envahi l'île de Madagascar en 1999 provenaient de la côte Est de l'Afrique.

- Un autre marqueur, qui n'a pu être corrélé à aucune des méthodes de typage moléculaire précédemment citées, est représenté par la perte de la production d'indole par des souches de *V. cholerae* O1 isolées depuis 1993 dans le centre de l'Afrique [16].
- Chez les souches de *V. cholerae* des sérogroupes O1 et O139, la capacité à produire la toxine cholérique est un déterminant important de la virulence, et il est considéré que toutes les souches de *V. cholerae* O1 et O139 sont toxinogènes et donc susceptibles de déclencher des épidémies de choléra. La recherche systématique des gènes codant pour la toxine cholérique (*ctxA*, *ctxB*), ainsi que du gène *tcpA* (toxin-coregulated pilus), facteur de colonisation majeur impliqué dans la virulence, confirmant que l'on est en présence de souches toxinogènes, n'est donc pas utile au niveau du diagnostic, surtout dans un contexte épidémique. Il peut arriver, rarement cependant, que certaines souches de *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 ne produisent pas de toxine cholérique ; de même il est courant au cours d'une épidémie de choléra d'isoler des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 non toxinogènes. Ces souches ne sont pas associées aux épidémies mais peuvent être associées à des diarrhées sporadiques et doivent être étudiées dans leur contexte clinique et épidémiologique.

- Le séquençage du gène *ctxB*, codant pour la sous-unité B de la toxine cholérique, est utile comme marqueur épidémiologique permettant de différencier les biotypes de *V. cholerae* O1. De nouveaux variants pathogènes de *V. cholerae*, souches hybrides possédant le gène *ctxB* de la toxine des souches du biotype classique, ont ainsi été mis en évidence, en Asie et dans certains pays d'Afrique [17]. Ces souches seraient selon certaines observations, à l'origine d'épisodes cholériques aggravés entraînant un taux de létalité plus élevé.

De même la séquence des gènes *tcpA* peut être utilisée comme outil de suivi et de caractérisation des souches car elle diffère entre les souches des biotypes classiques et ElTor [17].

Ces études complémentaires contribuent à la surveillance des infections à vibrions cholériques. C'est en partie grâce au suivi des souches et à l'échange d'informations au niveau international que l'on pourra adapter les outils et les interventions permettant de lutter efficacement contre le choléra.

Remerciement : je remercie le Dr Louis Koyange, République démocratique du Congo, pour sa précieuse participation à l'élaboration du logigramme d'identification.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Bourdelais P, Dodin A. Visages du choléra. Paris, Belin; 1987.
- [2] OMS. Choléra: bilan de la surveillance mondiale, 2008. Rel Epidemiol Hebdom 2009;31(84):309-24.
- [3] Mintz ED, Popovic T, Blake PA. Transmission of *V. cholerae* O1. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik Ø Edit. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington, DC: American Society for Microbiology 1994:345-56.
- [4] Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 1996;272:1910-4.
- [5] Huq A, Colwell RR, Chowdhury MA, et al. Coexistence of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Bengal in plankton in Bangladesh. Lancet 1995;345:1249.
- [6] Fournier JM, Quilici ML. Infections à vibrions non cholériques. Encycl Méd Chir, Ed. Scientif Méd Elsevier, Paris, Maladies infectieuses, 2002; 8-026-F-15, 7 p.
- [7] Nair GB, Faruque SM, Bhuiyan NA, et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J Clin Microbiol 2002;40:3296-99.
- [8] Safa A, Sultana J, Cam PD, et al. Classical cholera toxin producing *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains in Asia and Africa. Emerg Infect Dis 2008;14:987-8.
- [9] Raychoudhuri A, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, et al. Biotyping of *Vibrio cholerae* O1: Time to redefine the scheme. Indian J Med Res 2008;128:695-98.
- [10] Berche P, Poyart C, Abachin E, et al. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. J Infect Dis 1994;170:701-4.
- [11] Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: odyssey of a fortuitous variant. Microbes Infect 2003;5:329-44.
- [12] Brown V, Jacquier G, Bachy C, Bitar D, Legros D. Prise en charge des épidémies de choléra dans un camp de réfugiés. Bull Soc Pathol Exot 2002;95:351-4.
- [13] Piarroux R. Le choléra: épidémiologie et transmission. Expérience tirée de plusieurs interventions humanitaires réalisées en Afrique, dans l'Océan Indien et en Amérique centrale. Bull Soc Pathol Exot 2002;95:345-50.
- [14] Lapeyssonnie L. Acquisitions récentes en matière d'épidémiologie et de prophylaxie du choléra en Afrique. Bull Soc Pathol Exot 1971;64:644-52.
- [15] Popovic T, Bopp C, Olsvik Ø, Wachsmuth K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. J Clin Microbiol 1993;31:2474-82.
- [16] Dodin A, Bougoudogo F, Guillou M. La non-production d'indole: un marqueur épidémiologique du Vibron cholérique. Méd Trop 1994; 54:295-6.
- [17] Safa A, Nair GB, Kong RYC. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol 2009;18:46-54.

Annexe I – Composition et préparation des milieux de culture et réactifs.

Eau peptonnée hypersalée alcaline

Ce milieu est utilisé comme milieu de transport et d'enrichissement des vibrions cholériques. Sa concentration en chlorure de sodium et son pH alcalin donnent un avantage sélectif à la plupart des espèces de vibrions halophiles ou halotolérants en favorisant leur croissance par rapport à d'autres germes présents dans un produit contaminé.

1. Composition

Réactifs	Quantité
Peptone	30 g
NaCl	30 g
Eau distillée	QSP 1000 mL

2. Mode opératoire

Peser les différents réactifs. Dissoudre les composants avec l'eau distillée. Répartir en tubes sous un volume de 10 ml. Ajuster le pH à $8,4 \pm 0,2$ (à 25 °C) avec une solution d'hydroxyde de sodium. Stériliser 15 minutes à 121 °C à l'autoclave.

3. Durée de conservation et conditions de stockage

Les tubes sont conservés 1 an à 2-8 °C.

Eau physiologique tamponnée (E_pT)

Cette solution est utilisée pour réaliser les suspensions bactériennes des souches de vibrions halophiles ou halotolérantes, permettant l'ensemencement des galeries d'identification biochimique (API 20E ou galeries en tubes) et l'étude des caractères morphologiques (Gram, État Frais). Elle peut être remplacée par de l'eau physiologique en fonction des possibilités et disponibilités du laboratoire.

1. Composition

Réactifs	Quantité
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	22,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	36 g
Eau distillée	QSP 5000 mL

2. Mode opératoire

Peser les différents réactifs. Ajouter de l'eau distillée en quantité suffisante pour obtenir une dissolution complète (environ 500 ml dans l'éprouvette). Compléter à 5 000 ml avec de l'eau distillée. Répartir en tubes sous un volume de 10 ml ou en flacons de 250 mL. Stériliser 15 minutes à 121 °C à l'autoclave.

3. Durée de conservation et conditions de stockage

Les tubes ou flacons sont conservés 1 an à température ambiante.

Gélose nutritive alcaline

La concentration en chlorure de sodium et le pH alcalin de ce milieu sont favorables à la croissance de la plupart des espèces de vibrions halophiles ou halotolérants. L'aspect translucide des colonies de *Vibrio cholerae* sur ce milieu peut permettre de les différencier d'autres espèces ou genres bactériens en cas d'isolement à partir d'un prélèvement.

1. Composition

Réactifs	Quantité
Peptone	20 g
Agar	15 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1 000 mL

2. Mode opératoire

Peser la peptone, le chlorure de sodium et l'agar, les mettre dans l'eau distillée. Homogénéiser la solution. Ajuster le pH à $8,2 \pm 0,2$ (à 25 °C) avec une solution d'hydroxyde de sodium. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Distribuer stérilement dans des boîtes de Pétri sous un volume de 20 mL.

3. Durée de conservation et conditions de stockage

Les boîtes prêtes à l'emploi sont conservées 1 semaine en chambre froide.



Annexe I – Composition et préparation des milieux de culture et réactifs (suite).

Milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS)

Ce milieu permet l'isolement sélectif et la culture de *Vibrio cholerae* et d'autres espèces de vibrios. La plupart des bactéries autres que les *Vibrio* sont inhibées sur ce milieu, au moins pendant 24 h.

1. Composition

Réactifs	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Citrate de sodium	10 g
Thiosulfate de sodium	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Bile de bœuf	8 g
Citrate ferrique	1 g
Saccharose	20 g
Bleu de bromothymol	0,04 g
Bleu de thymol	0,04 g
Agar	14 g
Eau distillée	1000 mL

Le milieu TCBS est commercialisé sous une forme déshydratée distribuée par plusieurs fournisseurs. Cette forme déshydratée est utilisée pour sa préparation :

Réactifs	Quantité
TCBS Agar	88 g
Eau distillée	1000 mL

2. Mode opératoire

Peser la poudre, la mettre dans l'autopréparateur de milieux avec l'eau distillée.
Homogénéiser la solution.
Contrôler le pH qui doit être à $8,6 \pm 0,2$ ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), sans l'ajuster.
Porter à ébullition 1 min. Ne pas autoclaver.
Coulér en boîtes de Pétri sous un volume de 20 mL.

3. Lecture

Quelques colonies d'*Escherichia coli*, de *Proteus* et d'entérocoques peuvent pousser mais donnent de petites colonies jaunes ou incolores selon l'espèce, facilement reconnaissables par rapport aux colonies de *Vibrio*.

V. cholerae donne des colonies jaunes (saccharose +), plates, de 2 à 3 mm de diamètre environ après incubation d'une nuit à 37°C .

V. parahaemolyticus donne des colonies bleu/vert (saccharose -) de 3 à 5 mm de diamètre après incubation d'une nuit à 37°C .

D'autres espèces de *Vibrio* poussent également sur TCBS, comme

V. alginolyticus (colonies jaunes, de 3 à 5 mm de diamètre) ou

V. fluvialis (saccharose +), *V. mimicus* (saccharose -), *V. vulnificus*

(saccharose +/-).

4. Hygiène et sécurité

La pesée de la poudre doit se faire impérativement sous hotte chimique.

Pour limiter l'étape de pesée, ne pas préparer plus de 2 litres à la fois.

Porter un masque (poudre très volatile et irritante en cas d'inhalation).

5. Durée de conservation et conditions de stockage

Conserver le milieu déshydraté dans une boîte fermée, dans un endroit sec et à une température inférieure à 30°C . La date de péremption est indiquée sur le conditionnement.

Les boîtes prêtées à l'emploi sont conservées 1 semaine en chambre froide.

6. Remarques

La croissance bactérienne et l'aspect des colonies sur TCBS peuvent varier d'un lot de milieu de culture à l'autre pour un même fabricant, du fait de la composition complexe du milieu.

Les colonies jaunes sur TCBS peuvent virer au vert à température ambiante si les boîtes sont conservées trop longtemps. La lecture doit donc se faire rapidement après 18 à 24 heures d'incubation.

Le test de l'oxydase et les tests d'agglutination sur lame (colonies « collantes ») ne doivent pas être pratiqués à partir d'une culture sur milieu TCBS.

Eau peptonée à concentrations croissantes en sel

Cette gamme de milieux permet d'étudier la croissance d'une souche de vibron en l'absence de NaCl, ou en présence de différentes concentrations de NaCl.

La suspension du germe à étudier est faite dans un premier tube d'eau peptonée sans sel (EPSS), qui va permettre d'ensemencer un autre tube d'EPSS ainsi qu'une série de tubes d'EP contenant de 1 à 10 % de NaCl.

L'étude de ces caractères culturaux est capitale pour l'identification des espèces de vibrons halopiles.

1. Composition

1.1. Eau peptonée sans sel (EPSS)

Réactifs	Quantité
Peptone	20 g
Eau distillée	1000 mL

1.2. Eau peptonée (EP) à différentes concentrations de NaCl

Réactifs	Quantité	Réactifs	Quantité	Conc finale en NaCl
		eau peptonée sans sel	600 mL	0 %
NaCl	3 g	eau peptonée sans sel	300 mL	1 %
NaCl	6 g	eau peptonée sans sel	300 mL	2 %
NaCl	9 g	eau peptonée sans sel	300 mL	3 %
NaCl	12 g	eau peptonée sans sel	300 mL	4 %
NaCl	15 g	eau peptonée sans sel	300 mL	5 %
NaCl	18 g	eau peptonée sans sel	300 mL	6 %
NaCl	21 g	eau peptonée sans sel	300 mL	7 %
NaCl	24 g	eau peptonée sans sel	300 mL	8 %
NaCl	27 g	eau peptonée sans sel	300 mL	9 %
NaCl	30 g	eau peptonée sans sel	300 mL	10 %

2. Mode opératoire

2.1. Eau peptonée sans sel

Peser la poudre dans un bêcher.

Ajouter l'eau distillée et faire dissoudre.

Ajuster le pH à $8,2 \pm 0,2$ ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) avec une solution de NaOH.

2.2. Eau peptonée à différentes concentrations de NaCl

Peser les différentes quantités de NaCl dans des bêchers.

Ajouter à chaque pesée l'eau peptonée sans sel.

Homogénéiser la solution.

Distribuer chacune des solutions en tubes à vis sous un volume de 5 mL.

Indiquer sur chaque tube la concentration en NaCl de la solution (nombre de 0 à 10).

Regrouper les tubes de même concentration dans un panier.

Autoclaver 15 minutes à 121°C .

3. Durée de conservation et conditions de stockage

Les tubes sont conservés 3 mois à température ambiante.

© Institut Pasteur.

Annexe II – Logigramme d'identification d'un vibron cholérique.

