

ANNEXE

EXAMEN DES FÈCES DE SUJETS SUSPECTS D'INFECTION CHOLÉRIQUE

Lors de la publication, sous forme d'articles successifs, des études sur le choléra dans le *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, on avait fait suivre l'étude N° 7 d'une annexe portant sur le diagnostic du choléra en laboratoire, rédigée par Ahuja et ses collaborateurs (1950, 1951). Il a paru opportun de la remplacer dans ce volume par une nouvelle série d'instructions, mises au point par Burrows & Pollitzer (1959) et publiées également dans le *Bulletin*. Ces instructions ne sont reproduites ici que partiellement. En effet, les méthodes de récolte, et de conservation des échantillons, de préparation des milieux de culture et des réactifs ont été exposées dans divers chapitres de la monographie. On se borne donc à faire figurer ci-après les procédés d'examen des fèces, en vue d'y déceler la présence éventuelle du vibrion cholérique.

Examen des échantillons

Les vibrions du choléra sont excrétés en grand nombre, souvent en culture pratiquement pure, dans les selles en eau de riz qui caractérisent les stades précoces, non traités, de la maladie. L'isolement est alors relativement aisé. Le nombre des vibrions, dans les selles prélevées le deuxième jour de la maladie, c'est-à-dire après l'apparition des symptômes généraux, peut être réduit au point que l'on ne voit se développer qu'une seule colonie sur 100 cultures en milieu solide ensemencées directement. Plus tard, il peut être difficile, dans certains cas, de trouver les vibrions par culture directe, alors que, dans d'autres, ils paraissent augmenter en nombre. En général, ils disparaissent rapidement le sixième ou septième jour.

L'administration au malade de substances antibactériennes telles que les sulfamides, les tétracyclines et le chloramphénicol, réduit notablement la période durant laquelle on peut obtenir des cultures positives, bien que le cours de la maladie paraisse inchangé.

Ainsi, deux facteurs affectent l'isolement du vibrion en vue du diagnostic du choléra: le stade de la maladie et le fait que le sujet a reçu, ou non, des substances antibactériennes avant prélèvement de l'échantillon de selles.

En général, l'isolement réussit dans 50% des cas où le prélèvement est effectué pendant la période aiguë de la maladie et inoculé directement sur milieu solide. Il réussit dans 90-95% des cas, lorsque l'on prélève plus d'un échantillon et que l'on inocule ces derniers dans plus d'un milieu de culture.

Examen microscopique

Les premiers chercheurs ont attaché une grande importance à la mise en évidence de vibrions, morphologiquement typiques, dans les frottis de selles en eau de riz ou de flocons de mucus, fixés par la chaleur et colorés par le Gram. Cet examen n'est plus recommandé aujourd'hui, car il n'est pas possible de différencier à coup sûr, dans ces frottis, le vibron cholérique des vibrions cholériformes, des bacilles coliformes et d'autres germes intestinaux, et parce que les vibrions cholériques présentent souvent dans ces préparations des formes atypiques.

Enrichissement

Il est souvent souhaitable de faire une première culture sur milieu liquide, afin d'assurer la prédominance des vibrions sur les autres micro-organismes, cela surtout lorsque l'échantillon est prélevé plus de 48 heures après le début de la maladie. Cette culture d'enrichissement est indispensable lorsqu'il s'agit d'échantillons prélevés après le 4^e-6^e jour de la maladie. Les milieux liquides décrits au chapitre 7 — l'eau peptonée (pages 560-563), le milieu bismuth-sulfite (pages 567-569), et le tellurite de potassium (page 570) peuvent être employés dans ce but.

La quantité d'inoculum sera en fonction inverse de la richesse supposée de l'échantillon en vibrions. C'est ainsi qu'un flocon de mucus de fèces en eau de riz peut suffire. Ou bien l'on emploiera un milieu à concentration double,ensemencé avec un égal volume de suspension de fèces. La culture d'enrichissement peut être mise en incubation pendant quelques heures seulement (deux heures suffisent s'il s'agit de matériel prélevé durant le stade aigu de la maladie) ou pendant 6 ou même 12 heures, s'il s'agit de matériel prélevé durant la convalescence. Si le temps d'incubation est long, il y aura avantage à faire plus d'un repiquage. Le vibron se développe rapidement sous forme d'une mince pellicule à la surface du milieu, dont une anse suffit à ensemercer le milieu solide.

Isolement en culture pure

On inoculera directement des milieux à la gélose avec les échantillons prélevés durant la phase aiguë de la maladie ou avec une certaine quantité de la culture d'enrichissement. On utilisera à cet effet un ou plusieurs des milieux solides favorisant la croissance de *V. cholerae*, décrits au chapitre 7, notamment la gélose aux sels biliaries (page 594), le milieu d'Aronson (page 587), et le milieu au bismuth-sulfite, modifié par Wilson & Reilly (page 595).

Après 18 heures d'incubation, *V. cholerae* se développe sur la gélose aux sels biliaires sous forme de colonies d'un mm ou moins, transparentes, élevées, lisses, ressemblant à des gouttes de rosée; elles sont ainsi faciles à distinguer des coliformes et autres bacilles. Les colonies de vibrions cholériformes et d'*Alcaligenes faecalis* leur ressemblent cependant, mais elles sont légèrement opalescentes.

Sur le milieu d'Aronson, de petites colonies apparaissent dès les 10 premières heures d'incubation, et après 15-20 heures, elles grandissent et prennent une couleur rouge vif. Cette coloration n'est pas spécifique du vibron cholérique. Elle indique seulement une fermentation des sucres contenus dans le milieu.

Sur le milieu bismuth-sulfite, *V. cholerae* se développe au bout de 12-18 heures sous forme de colonies jaune-brunâtre, qui, chez certaines souches, acquièrent une sorte de brillant métallique avec une incubation plus longue. Quoique caractéristique, cet aspect n'est pas absolument spécifique, puisque les colonies de *Proteus* peuvent prendre une coloration analogue.

Des frottis des unes ou des autres de ces cultures seront fixés à la flamme et colorés au Gram. La présence de bacilles incurvés Gram positifs ainsi que les caractères des cultures peuvent donner une forte présomption de la présence de *V. cholerae* dans les selles, mais à ce stade, ce n'est toutefois qu'une présomption.

Identification

L'identification de *V. cholerae* est fondée sur les points suivants: a) ses caractères biochimiques, soit la fermentation du saccharose et du mannose, mais non de l'arabinose; la réduction des nitrates en nitrites et la formation d'indole à partir du tryptophane, qui donne la réaction du cholera-roth, enfin une réaction Voges-Proskauer négative; b) son incapacité de provoquer l'hémolyse des hématies de chèvre ou de mouton, dans des conditions données; son agglutinabilité par l'antisérum O du groupe I.

Une subculture de la plaque d'isolement est prélevée — colonie typique composée de vibrions reconnus comme typiques au microscope — et ensemencée en vue des examens biochimiques. A cet effet, on prépare des tubes d'eau peptonée contenant chacun l'un des sucres à tester (saccharose, mannose et arabinose), un tube d'eau peptonée pour l'épreuve du cholera-roth et un tube d'eau peptonée-glucose-phosphate pour le test de Voges-Proskauer. En outre, on prépare un tube de bouillon de Douglas isotonique pour le test d'hémolyse (voir ci-après).

Réactions biochimiques. Le résultat des tests de fermentation doit être lu après 18-24 heures d'incubation, afin d'éviter la fermentation tardive de l'arabinose qui s'observe dans quelques souches. La réaction nitroso-indole, ou test du cholera-roth, s'obtient par addition à l'eau peptonée d'une goutte d'acide sulfurique concentré par ml de culture. Une coloration cerise tournant au rubis, apparaissant plus ou moins tôt à la surface de la

culture et se propageant dans l'ensemble du tube en 2-3 heures, indique une réaction positive.

L'eau peptonée-glucose-phosphate est laissée en incubation pendant 2-4 jours, bien que, selon Taylor, Pandit & Read (1937), on puisse obtenir des réactions positives après 24 heures déjà. On ajoute à 1 ml de culture 0,6 ml d'une solution à 5% d' α -naphтол dans l'éthanol absolu et 0,2 ml d'une solution à 40% d'hydroxyde de potassium. Les réactifs sont ajoutés dans l'ordre indiqué et le liquide est agité pendant 5 secondes après chaque addition. Une coloration cerise-rubis 2-4 heures après addition des réactifs indique une réaction positive. Les instructions habituelles indiquent que le test doit être lu après 4 heures au plus tard. Cependant, certains chercheurs estiment qu'il peut être lu après 24 heures encore.

Hémolyse. Dans les tests d'activité hémolytique portant sur le vibron cholérique et les vibrions apparentés, il est de toute importance de distinguer entre l'hémolyse observée sur les cultures de gélose au sang et la lyse des érythrocytes en suspension, mis en présence d'une suspension du micro-organisme en question. Ainsi, par exemple, des souches de *V. cholerae* vrai présentent des zones parfaitement claires indiquant une β -hémolyse sur gélose au sang, ce que d'autres ne font pas, alors que ni les unes ni les autres ne lysent les globules rouges dans les conditions indiquées ci-après. Cette contradiction apparente a été levée par van Loghem (1913), qui a établi que l'hémодigestion observée sur gélose et l'hémolyse des érythrocytes en suspension étaient des phénomènes fondamentalement différents.

Le test d'activité hémolytique des vibrions, ou test de Greig, comporte l'addition d'1 ml d'une suspension à 3% d'érythrocytes à 1 ml, soit d'une culture de 24 heures en bouillon de Douglas isotonique, soit d'une suspension d'une culture sur gélose dans le soluté physiologique isotonique, contenant environ 2 milliards de vibrions par ml. La culture sur bouillon est jugée préférable à l'autre. Dans sa technique originelle, le test était effectué avec des hématies de chèvre, mais celles de mouton sont tout aussi satisfaisantes, peut-être même meilleures. Les hématies humaines ne conviennent pas s'il s'agit de différencier *V. cholerae* du vibron El Tor, qui provoque l'hémolyse des hématies de chèvre et de mouton. Le mélange est mis à l'étuve à 37° C pendant deux heures, le test est alors lu une première fois; puis le tube est mis à la glacière durant la nuit et une nouvelle lecture faite le lendemain matin. La clarification de la suspension d'hématies et la libération de l'hémoglobine indiquent une réaction positive. L'hémoglobine est souvent réduite et l'hémolyse ne se manifeste pas toujours par une clarification parfaite, mais la lecture du test ne présente guère de difficulté.

Agglutination. *V. cholerae* étant agglutiné par les antisérums du groupe OI, il est dit « agglutinable », tandis que les vibrions répondant à une autre spécificité O sont « inagglutinables ». Cette terminologie n'im-

plique évidemment pas que des vibrions qui n'ont pas de parenté sérologique sont inagglutinables par les antisérums homologues.

Le test d'agglutination peut être effectué sous forme de test rapide sur lame, en utilisant des colonies typiques morphologiquement, provenant soit de la plaque d'isolement soit d'un repiquage sur gélose inclinée. L'agglutination peut s'opérer aussi par la titration en tube, avec une suspension des micro-organismes dans le soluté salin isotonique et des dilutions en série du sérum, à raison 2ⁿ.

Pour le test rapide sur lame, on utilise une anse de soluté isotonique et une anse d'antisérum — à une dilution déterminée préalablement par un essai avec une suspension de souches connues de *V. cholerae* — placées l'une à côté de l'autre sur une lame propre. La culture sur gélose est mise en suspension dans le soluté, de façon qu'elle donne une goutte laiteuse opaque. Une goutte de cette suspension est alors déposée dans la goutte de sérum et mélangée avec soin. La formation de petits grumeaux, après 1-2 minutes, visibles à l'oeil nu, à la loupe ou au microscope à dissection, indique une réaction positive. Il est nécessaire d'effectuer un test à blanc avec la suspension bactérienne dans le soluté, sans antisérum. Dès le 3^e jour de la maladie, on peut rencontrer des formes R du vibron, spontanément agglutinables dans le soluté salin. Il va sans dire que de telles formes ne peuvent être utilisées pour le test d'agglutination. Si l'on trouve des formes agglutinables dans le soluté, on peut parfois tourner la difficulté en réduisant la teneur en sel à 0,5%.

La preuve de l'identité sérologique de l'organisme à tester est d'autant plus convaincante que les résultats de l'agglutination en tube sont plus proches (à 1-2 dilutions près) de ceux que l'on obtient avec le micro-organisme homologue (à partir duquel l'antisérum a été préparé). Le sérum normal de lapin agglutine fréquemment *V. cholerae* à la dilution de 1/50. Il est donc préférable de commencer la série des dilutions à 1/100. Les sérums de titre élevé, préparés par hyperimmunisation, sont plus recommandables que les sérums ayant des titres de 1:2000 ou moins. Là aussi, il est important de faire figurer des tubes de soluté témoins dans l'essai. Une suspension de 2 milliards de vibrions par ml, correspondant à 5 unités de la Préparation internationale de Référence d'Opacité (Maaloe, 1955), constitue un antigène satisfaisant pour l'épreuve d'agglutination.

On peut utiliser l'une ou l'autre des méthodes pour classer le vibron cholérique en sérotype Inaba ou Ogawa. Ce typage n'est pas essentiel pour le diagnostic de laboratoire de l'infection, mais on peut le faire facilement en remplaçant le sérum de diagnostic bivalent par des antisérums absorbés.

Résumé et évaluation

Les caractères de *V. cholerae*, déterminés au moyen des tests précédents, peuvent être résumés comme suit:

saccharose	mannose	arabinose	cholera-roth	Voges-Proskauer	hémolyse
+	+	—	+	—	—

Les vibrions qui répondent à ces exigences sont en général du groupe OI. Ces vibrions agglutinables correspondent à la définition de *V. cholerae* et l'identification de ce micro-organisme peut être considérée comme résolue.

Deux déviations à ce schéma se rencontrent assez souvent. Il arrive, dans environ 1 % des cas, que l'on isole des vibrions en culture pratiquement pure de sujets atteints de choléra cliniquement typique, qui ne soient pas agglutinés par les antisérums OI. On ne sait pas encore si ces organismes ont un rapport étiologique avec l'infection diarrhéique aiguë, ou s'ils représentent une contamination de l'échantillon de selles.

Dans l'autre cas, les vibrions ont les caractéristiques d'un *V. cholerae* typique, mais sont hémolytiques. Ce sont les vibrions dits El Tor du groupe OI, et le test de l'hémolyse revêt ainsi une importance fondamentale pour les différencier des vibrions cholériques vrais. Ces formes hémolytiques, fréquentes dans les eaux de surface, peuvent contaminer les selles humaines, souvent les selles de sujets sains. Mais on les a rencontrées comme agents étiologiques d'une maladie diarrhéique épidémique aiguë à Célèbes. Des vibrions hémolytiques ont été aussi isolés dans l'Inde, en relation avec des diarrhées aiguës (Mukherji, 1955). Ces vibrions sont-ils des germes pathogènes distincts de *V. cholerae* ou des variants atypiques de ce dernier ? On ne peut le dire encore.

Quelle que soit la réponse qui sera donnée à cette question, seuls sont considérés actuellement comme *V. cholerae* typiques et déclarés comme tels, les vibrions répondant au schéma précité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahuja, M. L. et al. (1950) *Laboratory diagnosis of cholera. Bacteriological procedures.* In : *Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser.* **18**, 10
- Ahuja, M. L. et al. (1951) Laboratory diagnosis of cholera. A note on bacteriological procedures. *Indian J. med. Res.* **39**, 135
- Burrows, W. & Pollitzer, R. (1958) Laboratory diagnosis of cholera. *Bull. Wld Hlth Org.* **18**, 275
- Løghem, J. J. van (1913) Über den Unterschied zwischen Cholera- und El Tor-Vibrionen. *Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig.* **67**, 410
- Maaløe, O. (1955) The international reference preparation for opacity. *Bull. Wld Hlth Org.* **12**, 769
- Mukherji, A. (1955) Hemolytic vibrios in cholera epidemic at Lucknow in 1945. *Indian J. med. Sci.* **9**, 540
- Taylor, J., Pandit, S. R. & Read, W. D. B. (1937) A study of the vibrio group and its relation to cholera. *Indian J. med. Res.* **24**, 931