

Rapport concernant la Culture M/14194 :

Vibrio cholerae (selles)

« Echantillon de selles d'un patient avec des vomissements et une diarrhée suite à l'ingestion de fruits de mer »

de l'enquête EEQ 2016/3

Document préparé par Pierrette Melin, Centre National de Référence des *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*,

Juin 2017

Culture M/14194 *Vibrio cholerae* (selles)

La souche à identifier provenait d'un prélèvement de selles d'un patient présentant des vomissements et diarrhée suite à l'ingestion de fruits de mer ; il s'agissait d'un *Vibrio cholerae*. Ce patient souffrait d'une vibriose et non de choléra, en effet des analyses complémentaires réalisées sur cette souche ont montré qu'elle n'appartenait pas au séro groupe O1 ni O139 et qu'elle ne possédait pas de gène de virulence codant pour la toxine cholérique.

Lors de ce contrôle, 68,2 % des laboratoires ont correctement identifié cette souche ; 10% supplémentaires ont rapporté un *Vibrio albensis* sans mentionner la synonymie avec *V. cholerae* et enfin 11,5% ont rapporté qu'il s'agissait d'un *Vibrio* sans en identifier l'espèce. En 2009, lors d'un précédent contrôle, 71,8% des laboratoires avaient correctement identifié une souche semblable de *Vibrio cholerae*.

Ce contrôle est intéressant pour rappeler que des cas de vibrioses peuvent survenir en Belgique, mais également que d'éventuels cas de choléra d'importation doivent être rapidement identifiés et déclarés aux autorités de surveillance des maladies infectieuses. Pour différencier les cas de vibrioses à *Vibrio cholerae* des cas de choléra, l'appartenance ou non au séro groupe O1 ou O139 ainsi que la présence du gène de virulence codant pour la toxine cholérique doivent absolument être déterminés. Le plus rapidement possible toute souche de *Vibrio* devrait toujours être transmise dans un centre de référence pour confirmer l'identification et faire ces déterminations.

Choléra et vibrioses

Le choléra est une maladie diarrhéique aiguë, dont on peut mourir en quelques heures en l'absence de traitement. Il est provoqué par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés par le bacille *Vibrio cholerae*. Il reste un problème de santé publique majeur avec chaque année, selon les estimations, 1,3 à 4 millions de cas et 21.000 à 143.000 décès dans le monde (OMS 2017). Le cholera reste endémique dans de nombreux pays, d'Asie du sud-est, d'Afrique, d'Amérique centrale et du Sud. La transmission est étroitement liée à un manque d'accès à l'eau potable et installations d'assainissement.

Les symptômes apparaissent entre 12h à 5 jours après l'ingestion d'aliment ou d'eau contaminée. La dose infectieuse se situe entre $10^6 - 10^{11}$ vibrions ingérés ; cette dose est plus faible en cas d'acidité gastrique diminuée et chez les sujets appartenant au groupe sanguin O. Il faut remarquer que la plupart des personnes infectées ne manifestent aucun symptôme bien que le *Vibrio* soit présent et éliminé dans leurs selles pendant 1 à 10 jours après l'infection.

Seules les souches appartenant aux sérogroupes O1 et O139 et productrices de la toxine cholérique sont responsables des cas de choléra et des flambées épidémiques.

Les principaux réservoirs de *Vibrio cholerae* sont l'homme (seul hôte vertébré) et les milieux aquatiques tels que les eaux salines, les eaux saumâtres et chaudes des estuaires et zones côtières. *Vibrio cholerae* a aussi été observé notamment chez des oiseaux aquatiques et herbivores vivant près de lacs d'eau douce et de rivières ainsi que dans des algues, crustacés et insectes.

Les vibrioses désignent les maladies causées par des souches de *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 ou par d'autres espèces de *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, par exemple). Ce sont typiquement des infections gastro-entériques (diarrhées non sanglantes) provoquées par la consommation de crustacés ou autres produits de la mer contaminés, crus ou insuffisamment cuits. Les manifestations peuvent aussi être extra-digestives variées et plus ou moins sévères telles que bactériémie, infection de plaies et fasciite nécrosante par exposition/contact avec de l'eau de mer, eau salée ou eau saumâtre contaminée.

Ces différentes espèces de *Vibrio* y compris *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 sont des bactéries qui font partie de l'écosystème normal des estuaires et des régions côtières, elles sont présentes en Europe et, dans nos régions en particulier, on les retrouve dans les canaux et dans les eaux saumâtres. Le contact avec l'eau contaminée et l'ingestion de fruits de mer colonisés sont le plus souvent à l'origine d'infection. Ces bactéries sont plus abondantes dans les mois chauds de l'été.

L'émergence de vibrioses sous nos latitudes requiert de bonnes méthodes de détection et une prise de conscience clinique de ces pathogènes émergeant.

Diagnostic bactériologique

Le rôle du laboratoire est essentiel pour le diagnostic de cas de choléra, en particulier pour le diagnostic des cas isolés dits « d'importation ».

***Vibrio cholerae*, la bactérie**

Vibrio cholerae est un bacille Gram négatif droit ou incurvé, relativement court (1,5-3 µm) non sporogène, avec un seul flagelle polaire, oxydase positif, fermentant le glucose, le saccharose et le mannitol, possédant une lysine et une ornithine décarboxylase.

Sa croissance est favorisée par un pH de 7,6 à 9,5 et une concentration en NaCl de 3 à 8 %.

La bactérie est identifiée sur base de ses caractères biochimiques ou de son profil en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

- Détermination du sérotype

La diversité de ses antigènes somatiques O permet de différencier près de 200 sérotypes. Seulement deux sérotypes O1 (biotypes classique et El Tor) et O139, sont à l'origine des flambées épidémiques choléra. Les souches du sérotype O1 sont classées en trois sérotypes (Ogawa, Inaba et Hikojima) et sont responsables de la majorité de cas de choléra. La détermination du sérotype se fait par agglutination des souches de *Vibrio cholerae* avec les sérums anti-O1 et anti-O139. Les tests d'agglutination des souches de *V. cholerae* O1 avec d'autres antisera permettent de différencier *V. cholerae* O1 serovar Inaba, *V. cholerae* O1 serovar Ogawa et *V. cholerae* O1 serovar Hikojima.

- Recherche de la toxine cholérique

Les sérotypes pathogènes produisent la toxine cholérique, alors que les souches non pathogènes peuvent ou non produire cette toxine.

Le bactériophage filamentueux Ctx confère aux souches de *Vibrio cholerae* l'opéron Ctx, portant les gènes CtxA et CtxB. La transmission se fait par un transfert horizontal, avec intégration de l'opéron dans le génome bactérien qui est alors capable de produire la toxine cholérique conférant une pathogénicité à la bactérie. Cette toxine cholérique sera notamment responsable de symptômes diarrhéiques pouvant mettre en péril le pronostic vital.

Parmi les diverses méthodes de détection de la production de cette toxine, la technique d'amplification par PCR du gène codant pour la toxine s'est avérée la plus sensible. En Belgique, le CNR *Vibrio*, utilise une PCR en temps réel pour cette détection.

Prélèvements

Pour la recherche de *Vibrio cholerae*, ce sont principalement des prélèvements de selles diarrhéiques et parfois un frottis rectal qui sont soumis à la culture. Un milieu de transport de type Cary-Blair est nécessaire si le délai avant inoculation dépasse quelques heures. Une eau peptonée alcaline (EPA) peut également servir de milieu de transport.

Lors de manifestations extra-digestives, d'autres prélèvements sont réalisés : hémoculture, prélèvement de plaies, liquide de ponction, etc.

Culture de selles et identification

En Belgique comme dans la plupart des pays développés, la recherche spécifique de *Vibrio cholerae* dans les selles ne se fait pas systématiquement mais uniquement sur une demande clinique précise ; celle-ci devrait être justifiée par l'apparition d'une diarrhée aqueuse aiguë au retour d'une région à risque de choléra.

- Macroscopiquement, en phase aiguë de choléra, les selles sont afécales et présentent un aspect «eau de riz».
- L'examen microscopique à frais permet de visualiser des bacilles extrêmement mobiles.
- *Vibrio cholerae* se cultive facilement sur des milieux non spécifiques comme le milieu de MacConkey, de Drigalski, en gélose nutritive alcaline ou encore en Mueller Hinton ou plus spécifiquement sur une gélose TCBS (milieu à base de thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose) c'est à dire un milieu différentiel non sélectif utilisé pour l'isolement et la culture de *Vibrio cholerae* et d'autres *Vibrio* spp. à partir d'échantillons cliniques et autres types de prélèvements.
- Pratiquement, on recommande d'ensemencer en parallèle des milieux d'enrichissement et d'isolement. Les selles sont ensemencées sur TCBS, milieu sélectif inhibant la flore fécale et permettant la croissance des vibrions, incubé 16-18h, à 35°C, en aérobiose. Pour l'enrichissement sélectif, l'échantillon est inoculé dans un tube d'eau peptonée alcaline (EPA), ensuite incubée 6 à 8 heures à 35°C puis repiquée sur gélose de type TCBS (prélèvement à l'ose juste sous la surface de l'EPA non agitée préalablement). Après 16-18h d'incubation sur TCBS, les colonies suspectes de *Vibrio cholerae* mais aussi d'autres vibrions fermentant le saccharose sont arrondies, bombées, de taille moyenne (2-4 mm), lisses et colorées en jaune. De très rares souches de *Vibrio cholerae* ainsi que la plupart des autres vibrions importants au plan clinique, notamment *V. parahaemolyticus*, ne fermentent pas le saccharose et se présentent sous forme de colonies vertes.
- Pour obtenir une identification définitive des colonies présumées de *Vibrio* spp des tests supplémentaires biochimiques et/ou de spectrométrie de masse MALDI-TOF sont nécessaires. Pour information, le milieu TCBS n'est pas adapté à l'application du test d'oxydase sur les *Vibrio* spp.

Envoi au Centre National de Référence (CNR)

Au cours de cette enquête, 82 % des laboratoires participants ont déclaré qu'ils transmettraient la souche au CNR *Vibrio* : majoritairement (42%) dans un but épidémiologique et de confirmation d'identification, 18% pour confirmation

d'identification et 22% dans un but épidémiologique. Seuls 3 laboratoires évoquent une déclaration aux autorités sanitaires.

Il faut savoir que le cholera est une maladie à déclaration obligatoire au niveau national et international. Tout cas de choléra « confirmé » doit être déclaré aux autorités belges. Le CNR, en collaboration avec l'ISP, se charge d'assurer la déclaration au niveau international.

Lors de l'identification d'une souche de *Vibrio cholerae*, les biologistes doivent envoyer la souche au CNR *Vibrio*. En attente de confirmation des caractéristiques de la souche par le CNR, les médecins et biologistes qui suspectent un diagnostic de cholera (cas probable d'après la clinique et le contexte épidémiologique) doivent déjà « informer » le médecin inspecteur de leur région.

En Belgique, le CNR *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus* se tient à la disposition de tous les laboratoires pour la confirmation d'identification, y compris séro groupe et biotype, de toute souche de *Vibrio* sp et pour la recherche des gènes de virulence de *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*. Le CNR assure également un support technique aux laboratoires pour l'investigation de cas de vibrioses digestives.

Références

- Choléra – Organisation Mondiale de la Santé, Aide mémoire N°107, juillet 2017, 1-9. Disponible sur <http://www.who.int/medicentre/factsheets/fs107/fr/>
- Rapport annuel d'activité 2014, CNR des vibrions et du Choléra, Institut Pasteur France, 2015
- Cholera 2013 - WHO, Weekly Epidemiological Record, N°31, 2014, 89, 345-356, disponible sur <http://www.who.int/wer>
- CDC Laboratory testing for cholera - Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*, chapitre VI, 38-67 dans Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world, WHO, 2003 disponible sur : <https://www.cdc.gov/cholera/laboratory.html>
- *Vibrio cholerae*, Fiche technique santé-sécurité, Agence de la santé publique du Canada, 2010 disponible sur : <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/vibrio-cholerae-fra.php>
- O. Barraud, F. Denis & M.C. Ploy, Genre *Vibrio* dans Bactériologie médicale : techniques usuelles, 2^e Edition, 2011, Elsevier Masson, 361-366
- Cholera – Fiche informative, AViQ, ISP-WIV, version juillet 2016
- The VibrioNet web homepage : <http://www.vibronet.de>
- C.Baker-Austin, JA. Trinanes et al – Heat wave-associated vibriosis, Sweden and Finland, 2014, Emerging Infectious diseases, 22 (7) 2016 – DOI : <http://dx.doi.org/10.32032/eid2207.151996>
- F.Le Roux, K.M. Wegner et al - The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe : ecology, evolution, and pathogenesis, Frontiers in microbiology, 2015, 6 :830 – DOI : <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>
- S. Maraki, A. Christidou, M. Anastasaki & E. Scoulica, Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteremic skin and soft tissue infections, Infectious Diseases, 2016, 48 :3, 171-176 – DOI : <http://dx.doi.org/10.3109/23744235.2015.1104720>

Pierrette Melin et Rosalie Sacheli, Centre National de Référence des *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*