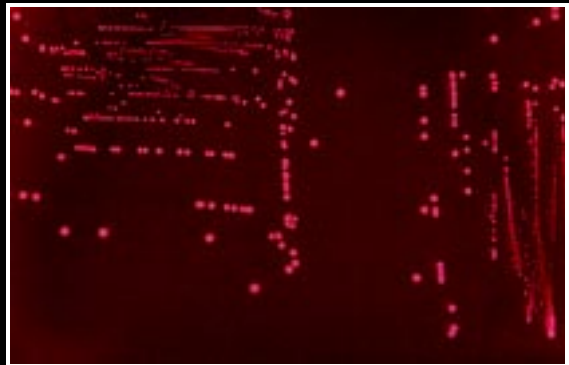
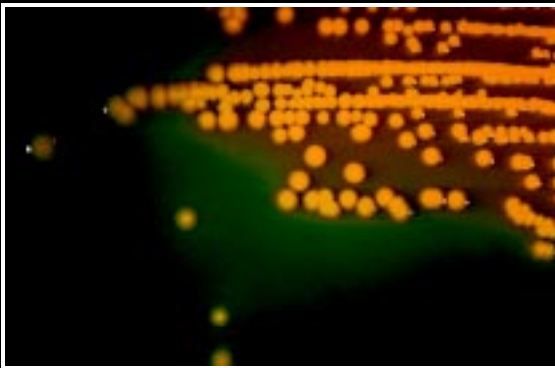
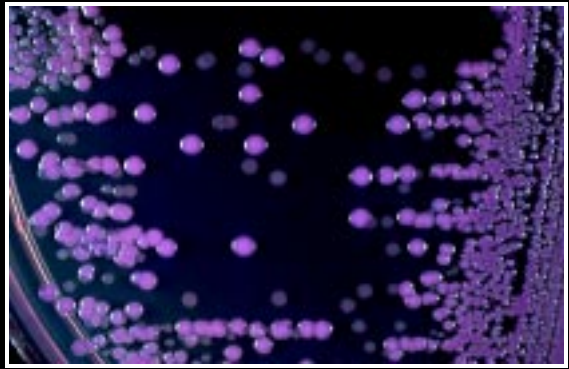


Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra

Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia 2002



Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra

**Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia 2002**

Le présent manuel a été préparé par le Centre national des maladies infectieuses (NCID), des Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia, États-Unis, en collaboration avec le Bureau régional OMS pour l'Afrique (OMS/AFRO) Harare, Zimbabwe.

Jeffrey P. Koplan, M.D., M.P.H., Directeur, CDC

James M. Hughes, M.D., Directeur, NCID, CDC

Mitchell L. Cohen, M.D. Directeur, Division des maladies bactériennes et mycosiques, NCID, CDC

Ebrahim Malek Samba, M.B., B.S., Directeur régional, OMS/AFRO

Antoine Bonaventure Kabore, M.D., M.P.H., Directeur, Division de la prévention et de la lutte contre les maladies transmissibles, OMS/AFRO

Les membres suivants des CDC ont préparé le présent rapport :

Cheryl A. Bopp, M.S.

Allen A. Ries, M.D., M.P.H.

Joy G. Wells, M.S.

Production :

J. Kevin Burlison, Graphiques

James D. Gathany, Photographie

Lynne McIntyre, M.A.L.S., Rédaction



Traduction :

Traduction française réalisée par le projet SARA, le Bureau régional pour l'Afrique de l'OMS (AFRO), Zimbabwe et par le Bureau de l'OMS de Lyon (CSR/LYO), France. Coordination Antoine Pierson, Pharmacien-Biologiste

Imprimé en français en 2002 par le projet SARA. Le projet SARA (Soutien pour l'analyse et la recherche en Afrique), mis en oeuvre par l'Académie pour le Développement de l'Éducation, est financé par l'Agence des États-Unis pour le Développement international, Bureau de l'Afrique, Division du Développement durable aux termes du contrat AOT-C-00-99-00237-00.

Page de couverture : A partir du haut, *Escherichia coli* O157:H7 sur une gélose de MacConkey, *V. cholerae* O1 sur une gélose TCBS et *Shigella flexneri* sur une gélose de xylose-lysine-désoxycholate (XLD).

Remerciements

Le financement pour la réalisation de cet ouvrage a été apporté par l'Agence des États-Unis pour le Développement international, Bureau de l'Afrique, Division du développement durable.

Ce manuel a été rédigé grâce à un effort conjoint du Bureau régional pour l'Afrique de l'Organisation Mondiale de la Santé, du Siège de l'OMS et des Centers for Disease Control and Prevention dans le cadre des activités de l'Équipe spéciale de l'OMS pour la lutte contre le choléra. Le personnel du projet de l'amélioration de la préparation et de la réponse au choléra et aux autres maladies diarrhéiques épidémiques en Afrique australe a travaillé en étroite collaboration avec un grand nombre de techniciens de laboratoire et d'épidémiologistes en Afrique australe pour mettre au point une approche intégrée du diagnostic du choléra et de la dysenterie grâce aux méthodes de laboratoire, sur laquelle repose le présent manuel.

Nous tenons à mentionner la précieuse assistance de Madame Katherine Greene, du Docteur Eric Mintz, de Madame Nancy Puhr, du Docteur Nancy Strockbine, du Docteur Robert Tauxe et du Docteur Fred Tenover, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgie, États-Unis ; du Docteur Lianne Kuppens, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Suisse ; du Docteur Elizabeth Mason, Organisation Mondiale de la Santé, Harare, Zimbabwe et de Madame Catherine Mundy, École de médecine tropicale de Liverpool, Liverpool, Royaume-Uni.

Introduction

Le choléra et la dysenterie ont affligé l'humanité pendant des siècles. Les épidémies ainsi causées ont marqué le destin des pays, alourdissant les pertes dues aux guerres. Dans la majeure partie du monde, le choléra et la dysenterie épidémiques sont devenus de plus en plus rares, mais, depuis une dizaine d'années, ces deux maladies ont fait leur réapparition dans un grand nombre de pays en voie de développement et contribuent à l'augmentation significative de la morbidité et de la mortalité.

Seuls quelques pathogènes peuvent être la cause de diarrhées épidémiques mais un grand nombre d'entre eux peuvent entraîner une diarrhée sporadique. Dans les pays en développement, deux agents étiologiques sont responsables de la majorité des diarrhées épidémiques : *V. cholerae* O1 toxinogène qui est à l'origine des épidémies de diarrhées aqueuses et *Shigella dysenteriae* type 1, causant des épidémies de diarrhées sanglantes. Récemment, deux nouveaux organismes à l'origine de diarrhées épidémiques ont fait leur apparition, *V. cholerae* O139 qui engendre des diarrhées aqueuses et *Escherichia coli* O157:H7 qui est à l'origine de diarrhées sanglantes. Ce dernier agent est très courant et ce, uniquement dans les pays développés.

Le présent manuel se concentre sur l'épidémiologie de ces quatre organismes et les méthodes de laboratoire utilisées pour les identifier et tester la résistance aux antimicrobiens dans un contexte épidémique. Ce recueil présente des techniques et une méthodologie d'étude en laboratoire qui fournira une information exacte et utile pour lutter contre l'épidémie tout en utilisant un minimum de ressources. Il accorde une place importante à la coordination des activités du microbiologiste et de l'épidémiologiste afin d'obtenir une information utile pour l'élaboration d'un protocole de traitement efficace face à ces maladies diarrhéiques épidémiques. Il préconise la mise en place d'études ciblées pour identifier les organismes à l'origine de l'épidémie et leurs profils de sensibilité aux antimicrobiens plutôt que de se fier à des informations aléatoires qui ne permettent pas d'établir un tableau représentatif de la situation.

Souvent, les pays qui doivent prendre des mesures face à une épidémie sont ceux qui ont le moins de ressources. Par conséquent, le laboratoire de microbiologie doit utiliser rationnellement ses faibles ressources afin d'avoir le plus d'impact possible sur la réduction de la morbidité et de la mortalité pendant une épidémie. Il existe souvent plusieurs manières d'identifier l'organisme causant l'épidémie. Il est vrai que pour obtenir un petit avantage supplémentaire, un investissement important en matériel et en temps est souvent nécessaire. Le présent manuel s'attache tout particulièrement à ce problème. Les procédures décrites ici ne sont pas nouvelles et la plupart d'entre elles sont même utilisées depuis des années. Mais elles ont été choisies surtout pour étudier des spécimens provenant d'épidémies plutôt que pour un emploi courant dans un

laboratoire de microbiologie clinique. Ces procédures ainsi choisies permettent de réduire la quantité de matériel nécessaire au laboratoire tout en délivrant l'information la plus utile qui soit, et ce avec le minimum de moyens.

Table des matières

Remerciements

Introduction

Chapitre 1 : Rôle des laboratoires cliniques en santé publique	1
A. Diarrhée épidémique	1
B. Rôle des laboratoires en santé publique	2
Chapitre 2 : Prélèvement et transport des échantillons de matières fécales ..	7
A. Recueil des selles	7
B. Préparation des échantillons pour le transport	10
Chapitre 3 : Épidémiologie de la dysenterie causée par <i>Shigella</i>	13
A. Épidémiologie de <i>Shigella</i>	13
B. Manifestations cliniques	14
C. Traitement	14
Chapitre 4 : Isolement et identification de <i>Shigella</i>	17
A. Méthodes d'isolement	17
B. Tests de dépistage biochimique	20
C. Identification sérologique de <i>Shigella</i>	26
D. Milieux d'isolement et d'identification de <i>Shigella</i>	28
Chapitre 5 : Étiologie et épidémiologie du choléra	37
A. Données historiques	37
B. Manifestations cliniques	38
C. Traitement	39
D. Épidémiologie	39
E. Vaccin contre le choléra	40
Chapitre 6 : Isolement et identification de <i>Vibrio cholerae</i> sérogroupes O1 et O139	41
A. Méthodes d'isolement	41
B. Identification sérologique de <i>V. cholerae</i> O1 et O139	49
C. Milieux et réactifs pour <i>V. cholerae</i>	51
Chapitre 7 : Épidémiologie d'<i>Escherichia coli</i> sérotype O157:H7	55
Chapitre 8 : Isolement et identification d'<i>Escherichia coli</i> sérotype O157:H7	57
A. Méthodes d'isolement et d'identification	57
B. Préparation et contrôle de qualité de la gélose MacConkey	60
Chapitre 9 : Test de sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)	61
A. Divers aspects à prendre en compte pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens	61
B. Procédure de diffusion en milieu gélosé	61
C. Aspects particuliers pour le test de sensibilité de <i>V. cholerae</i> ..	71
D. Préparation et contrôle de qualité des milieux et des réactifs ...	72

Chapitre 10 : Conservation des isolements	75
A. Courte durée	75
B. Longue durée	75
Chapitre 11 : Contrôle de qualité des milieux et des réactifs	77
A. Contrôle de qualité des milieux	77
B. Contrôle de qualité des réactifs	78
C. Avantages liés aux acquisitions centralisées des milieux et des réactifs	79
Chapitre 12 : Pratiques de sécurité standard dans le laboratoire de microbiologie	81
A. Pratiques de sécurité standard en microbiologie	81
B. Pratiques spéciales	84
C. Habits et équipement de protection	85
Chapitre 13 : Emballage et expédition des échantillons cliniques et agents étiologiques	87
A. Préparation pour le transport des échantillons infectieux et des cultures	87
B. Transport et expédition des cultures et des échantillons	87
Annexe A : Fournitures de laboratoire nécessaires annuellement pour la confirmation de flambées de cas et la surveillance au laboratoire de la sensibilité de <i>V. cholerae</i> O1/O139	93
Annexe B : Fournitures de laboratoire pour l'identification de <i>Shigella dysenteriae</i> 1 pendant une flambée de cas	95
Annexe C : Directives pour la création d'un réseau de laboratoires de santé publique pour lutter contre le choléra	97
Annexe D : Laboratoires internationaux de référence	101
Annexe E : Conception d'une étude en vue d'examiner la sensibilité aux antimicrobiens des organismes à l'origine d'une diarrhée épidémique	103
Annexe F : Fiches de données avec échantillons de selles – diarrhée épidémique	105
Annexe G : Réactions rencontrées le plus souvent lors de l'étude des caractères biochimiques	106
Annexe H : Fournitures de laboratoire pour l'isolement et l'identification de présomption d'<i>Escherichia coli</i> O157:H7 lors d'une flambée de cas (suffisant pour 100 échantillons)	107
Citation suggérée	108

Chapitre 1

Rôle des laboratoires cliniques en santé publique

A. Diarrhée épidémique

Les deux types les plus courants de diarrhée épidémique dans le Tiers Monde sont la diarrhée aqueuse causée par *V. cholerae* séro-groupe O1 et la diarrhée sanglante causée par *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (Sd1). Ce chapitre présente une vue d'ensemble des organismes qui sont à l'origine de la dysenterie et du choléra épidémiques. La connaissance de l'épidémiologie et de la présentation clinique de ces organismes permettra de mieux saisir le bien-fondé des procédures au cours des chapitres suivants.

1. Choléra épidémique

Le choléra est une maladie diarrhéique sécrétoire causée par des souches de *V. cholerae* produisant une entérotoxine. Plus de 150 groupes sérologiques de *V. cholerae* ont été identifiés mais, pendant des décennies entières, on ne connaissait que *V. cholerae* O1 toxinogène comme cause du choléra épidémique. Après une épidémie importante en Asie en 1992 et en 1993, on s'est rendu compte que le groupe sérologique *V. cholerae* O139 pouvait déclencher des épidémies similaires à celles qui avaient été causées par *V. cholerae* O1. Dans les directives de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), *V. cholerae* O1 et O139 sont désormais classés comme causes reconnues du choléra en doivent être notifiés de la même manière. Des souches de *V. cholerae* non O1 et non O139 peuvent être sources de maladies mais ne posent pas le même problème de santé publique que les groupes sérologiques O1 et O139.

Des détails supplémentaires sur l'épidémiologie, les antécédents historiques, les manifestations cliniques et le traitement du choléra sont présentés au chapitre 5.

2. Dysenterie épidémique

La dysenterie, définie comme une diarrhée avec du sang visible dans les selles, peut être causée par de nombreux organismes différents dont *Shigella* spp., *E. coli* O157:H7 entérohémorragiques, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* entéro-envahissants (ou entéro-invasifs), *Salmonella* spp. et plus rarement *Entamoeba histolytica*. Parmi ces organismes, les seuls connus pour causer de graves épidémies sont les espèces *Shigella dysenteriae* type 1 (Sd1) et, avec une fréquence nettement moins importante, *E. coli* O157:H7. Pour des détails supplémentaires sur l'épidémiologie, les manifestations cliniques et le traitement de l'infection à Sd1, se reporter au chapitre 3.

Bien qu'elle soit rare, *E. histolytica*, une espèce d'amibe parasitaire, n'en mérite pas moins qu'on lui prête attention. *E. histolytica* est une cause occasionnelle de dysenterie, surtout chez les jeunes adultes, mais elle ne cause

pas d'épidémie. Toutefois l'infection asymptomatique à *E. histolytica* est fréquente dans les pays en développement, pouvant atteindre jusqu'à 10% des personnes saines. L'examen des échantillons doit être réalisé par un expert en microscopie car il s'agit de faire une distinction entre cet organisme, les amibes non pathogènes et les globules blancs qui sont parfois confondus avec des trophozoïtes amibiens. Dans certaines épidémies de dysenterie imputables à Sd1, *E. histolytica* a été identifié et, au départ, on pensait que cet organisme était effectivement la cause de la flambée de cas. A cause de ce diagnostic incorrect, des personnes souffrant de dysenterie ont été traitées avec des antiamibiens, ce qui a engendré une transmission continue de Sd1 et une mortalité excessive que l'on aurait pu éviter. Le fait de trouver *E. histolytica* dans des selles sanglantes pendant une épidémie de dysenterie ne signifie pas que c'est la cause de l'épidémie ni même d'ailleurs que c'est la cause de la dysenterie chez un patient pris individuellement.

E. coli O157:H7 a déclenché au moins une flambée de cas de dysenterie en Afrique australe. On pense qu'il en a causé d'autres, mais il n'existe pas de preuves microbiologiques pour le confirmer. *E. coli* O157:H7 est traité dans ce manuel pour que les agents de laboratoire aient connaissance de cet organisme et soient en mesure, le cas échéant, de l'identifier. En effet, il peut à nouveau émerger et provoquer d'autres épidémies et les laboratoires doivent y être préparés.

Des détails supplémentaires sur l'épidémiologie, les antécédents historiques, les manifestations cliniques et le traitement de Sd1 sont présentés au chapitre 7.

B. Rôle des laboratoires en santé publique

Les laboratoires cliniques jouent un rôle de plus en plus important au niveau de la santé publique au moment des épidémies. Dans un contexte épidémique, il peut n'exister dans tel ou tel pays qu'un seul laboratoire capable de fournir rapidement l'information nécessaire pour amener la bonne stratégie de prise en charge d'une épidémie. Dans des pays aux ressources plus rares, le rôle du laboratoire est d'utiliser ces ressources pour fournir la meilleure information possible pour cette stratégie de prise en charge plutôt que de se concentrer sur le diagnostic des cas individuels des divers patients. Lors d'une épidémie de choléra ou de dysenterie, le laboratoire assume quatre rôles majeurs:

- Identification initiale de l'agent étiologique de l'épidémie
- Détermination initiale des profils de sensibilité aux agents antimicrobiens
- Suivi des changements dans les profils de sensibilité aux agents antimicrobiens
- Détermination de la durée et de l'étendue géographique de l'épidémie

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande aux pays à risque de mettre en œuvre un comité de lutte contre l'épidémie. Comme le laboratoire joue un rôle important au niveau de l'identification de l'agent causal de

l'épidémie et des mesures de lutte contre celles-ci, il faudra prévoir la présence d'un microbiologiste au sein du comité de lutte contre l'épidémie.

1. Identification initiale de l'agent étiologique de l'épidémie

Préparation/réseau de laboratoires

Le premier rôle qui incombe à un laboratoire est de se préparer à l'épidémie dans les pays à risque d'épidémie de dysenterie ou de choléra. Cela signifie qu'il doit notamment disposer de l'équipement (ou avoir accès facilement à cet équipement) nécessaire pour identifier *V. cholerae* O1/O139 et *Shigella*. Les Annexes A et B de ce manuel établissent une liste des fournitures de laboratoire indispensables pour l'isolement, l'identification et les tests de résistance aux antimicrobiens. Il convient de créer un réseau national de laboratoires de santé publique (voir Annexe C). Tous les pays devraient être équipés au moins d'un laboratoire national ou central capable d'identifier *V. cholerae* et *Shigella* spp., de déterminer la sensibilité aux antimicrobiens et d'envoyer des souches à un laboratoire de référence international (Annexe D).

Afin de déterminer de manière exacte et reproductible les profils de résistance aux antimicrobiens des pathogènes bactériens, un laboratoire doit investir pour s'équiper de l'infrastructure adéquate. Ces investissements sont les suivants : approvisionnement régulier en matériel et en fournitures nécessaires pour réaliser les tests ; personnel qualifié, approprié, possédant l'expérience pour réaliser les tests et disposant du temps nécessaire, du matériel et des fournitures pour maintenir son expertise ; contrôle de qualité du personnel, des fournitures et des réactifs. Les épreuves de sensibilité aux antimicrobiens faisant appel à une importante utilisation des ressources, l'OMS recommande de réaliser les épreuves de résistance aux antimicrobiens seulement dans un ou deux laboratoires du pays. Les laboratoires périphériques peuvent effectuer un premier travail d'isolement de *Vibrio* spp. ou *Shigella* spp. et ensuite les faire parvenir au laboratoire central ou national pour une confirmation finale et une détermination de la sensibilité aux antimicrobiens. Les laboratoires périphériques peuvent également réaliser des études ciblées pour déterminer la nature des agents étiologiques responsables de l'épidémie. Les laboratoires de premier niveau devraient disposer de milieux de transport et de l'équipement nécessaire pour envoyer les spécimens au laboratoire de niveau supérieur ou au laboratoire central.

Diagnostic des épidémies

Si l'on suspecte une épidémie, le laboratoire déterminera le germe qui en est responsable et sa sensibilité aux antimicrobiens. Une épidémie peut être suspectée à partir de bases cliniques : par exemple, le système de surveillance fondé sur le diagnostic clinique de la diarrhée peut noter une augmentation des cas de diarrhée. Le laboratoire devra être mobilisé dès que possible pour identifier l'agent responsable. Tout cela n'est possible que s'il existe une bonne

communication entre le laboratoire, les épidémiologistes, les cliniciens et les agents des services sanitaires.

Il arrive que le laboratoire soit le premier à suspecter une épidémie. Les techniciens du laboratoire notent un accroissement du nombre d'exams de selles demandés, de la proportion de spécimens de selles contenant du sang ou la présence d'un nouveau germe. Si un technicien de laboratoire suspecte une épidémie, il doit contacter au plus vite les cliniciens et les autorités sanitaires compétentes.

Une fois que le germe responsable de l'épidémie a été identifié, il n'est pas nécessaire d'examiner un nombre important de spécimens de selles. Les patients peuvent être traités en fonction de leurs syndromes.

Diagnostic d'une épidémie de dysenterie

Lorsqu'on soupçonne une épidémie de dysenterie, la cause la plus courante dans la plupart des pays est Sd1. Lors d'une flambée de cas ou d'une épidémie de dysenterie, Sd1 sera isolé bien plus souvent que les autres organismes responsables de la dysenterie. Par conséquent, le laboratoire doit utiliser raisonnablement ses ressources et, selon les directives de l'OMS, une fois que le rôle de Sd1 vis à vis de l'épidémie est confirmé, les patients atteints de dysenterie qui viennent consulter dans les services de santé devront être traités initialement comme s'ils étaient infectés par Sd1. Aussi, n'est-il pas nécessaire pour le laboratoire d'examiner les selles de tous ces patients, ce qui serait un gaspillage de ressources. Il vaut mieux prélever des spécimens d'un petit groupe de patients pendant une épidémie ou de conduire une surveillance périodique des microorganismes en cause dans la dysenterie (voir ci-après).

Si Sd1 n'est pas isolé, le laboratoire doit faire des tests de détection de *E. coli* O157:H7. Si aucun de ces germes n'est isolé, des mesures doivent être prises pour envoyer les spécimens de selles à un laboratoire de référence.

Outre Sd1 et *E. coli* O157:H7, un certain nombre d'organismes contribuent, dans des proportions plus ou moins grandes, à la morbidité liée aux dysenteries dans un pays. Les principales causes de dysenterie varient selon le lieu géographique et la période de l'année. Des pics saisonniers peuvent se produire et refléter des changements dans les proportions des divers organismes responsables. Il serait bon pour les laboratoires d'effectuer des enquêtes périodiques sur les organismes responsables de dysenterie afin de suivre les profils de sensibilité aux agents antimicrobiens et ainsi, d'aider les cliniciens et les responsables de la santé publique à formuler des directives rationnelles pour le traitement empirique. L'Annexe E contient les procédures à suivre pour réaliser de telles enquêtes.

Diagnostic d'une épidémie de choléra

Si l'on soupçonne une épidémie de choléra, la cause la plus courante à rechercher est *V. cholerae* O1. Si *V. cholerae* O1 n'est pas isolé, alors le laboratoire doit faire des tests de détection de *V. cholerae* O139. Si aucun de ces organismes n'est isolé, il faut envoyer les spécimens de selles à un laboratoire de référence.

L'infection causée par *V. cholerae* O139 doit être traitée et notifiée de la même manière que celle qui a été causée par *V. cholerae* O1. Les maladies diarrhéiques connexes doivent être appelées choléra et doivent être notifiées comme cas de choléra auprès des autorités sanitaires compétentes.

2. Détermination des profils de sensibilité aux antimicrobiens des germes responsables de l'épidémie

Il faut tester la sensibilité aux antibiotiques sur les 30 à 50 premiers germes identifiés par le laboratoire en début d'épidémie. Ce nombre permettra de dégager une information suffisante pour formuler la stratégie de traitement. Ensuite, le laboratoire devra effectuer des enquêtes périodiques pour détecter les changements des profils de résistance aux antimicrobiens (voir Annexe E).

Le laboratoire ne devrait pas tester d'antimicrobiens non disponibles dans le pays ou non recommandés par l'OMS comme efficaces pour traiter le choléra ou la dysenterie (voir chapitres 3 et 5). De plus, si pendant la première série d'examen, tous les germes sont résistants à un antimicrobien donné (par exemple, résistance de Sd1 à l'ampicilline ou au sulfaméthoxazole-triméthoprime), il est inutile de retester cet antimicrobien ultérieurement.

Une fois les germes isolés et les profils de résistance aux antimicrobiens testés, ces résultats devront être communiqués aussi rapidement que possible aux services nationaux de santé et d'épidémiologie. En effet, ils seront utilisés pour orienter les choix concernant la stratégie thérapeutique.

Il est utile d'envoyer de 10 à 20 isolements initiaux à un laboratoire de référence international pour confirmation de l'identification et des profils de résistance aux antimicrobiens (Annexe D).

3. Suivi des modifications dans la sensibilité aux antimicrobiens

Au cours de l'évolution de l'épidémie, il faudra réaliser des enquêtes périodiques sur 30 à 50 isolements de l'organisme épidémique pour détecter des changements dans les profils de résistance aux antimicrobiens du germe responsable de l'épidémie. Ces études doivent être faites soit bimestriellement soit semestriellement, selon les conditions et les ressources. Tout changement remarqué doit être communiqué aux services d'épidémiologie et de santé publique afin que la politique de traitement par antimicrobiens soit modifiée. Si les changements sont importants, il est utile d'envoyer les souches à un laboratoire de référence international pour confirmation (Annexe D).

4. Définition de la durée de l'épidémie

Le laboratoire peut aider à déterminer la fin de l'épidémie, en particulier lorsqu'il s'agit de choléra. Au cours d'une épidémie, le nombre de cas peut diminuer pour différentes raisons : variation saisonnière, transition vers un état endémique ou disparition du choléra d'une zone. Le choléra peut disparaître presque entièrement lorsqu'il fait froid et réapparaître quand la chaleur revient. Le laboratoire peut aider à déterminer si l'épidémie a effectivement pris fin en analysant périodiquement des échantillons de selles provenant de patients atteints de diarrhée aqueuse aiguë. Pour qu'une région soit déclarée exempte de choléra par l'OMS, il faut qu'une période d'incubation d'une durée totale de 10 jours se soit écoulée avec absence de traces de *V. cholerae* O1/O139. Mais, étant donné les variations saisonnières, il faut maintenir la surveillance pendant au moins 12 mois.

La dysenterie épidémique varie également selon les saisons. Le laboratoire peut analyser périodiquement les échantillons de selles provenant de patients souffrant de cette maladie pour déterminer si Sd1 est toujours présent dans une zone donnée.

5. Autres fonctions d'un laboratoire pendant une épidémie

Outre les principales fonctions citées ci-dessus, le laboratoire peut soutenir d'autres activités se rapportant à l'épidémie.

Études épidémiologiques

Parfois, le laboratoire pourra apporter une contribution lors d'une enquête épidémiologique nécessitant la réalisation d'études en laboratoire. Combinant des données épidémiologiques et biologiques, les études sur les modes de transmission ou sur les facteurs de risque de la maladie peuvent être plus précises et dégager une information utile pour lutter contre l'épidémie.

Définir l'ampleur de l'épidémie et améliorer les données de surveillance

Les cultures effectuées chez un certain nombre de patients qui répondent à la définition d'un cas pendant une épidémie peuvent déterminer la valeur prédictive de cette définition. De telles études confirmeront l'exactitude de la définition des cas utilisée pour la surveillance et brosseront un tableau plus exact de l'ampleur de l'épidémie.

De plus, le laboratoire devra probablement intervenir pour soutenir d'autres activités, par exemple le suivi environnemental de *V. cholerae* O1/O139. Ces demandes peuvent obérer les ressources du laboratoire ; il est donc important que le microbiologiste participe à la prise de décisions afin de déterminer si le laboratoire dispose des capacités nécessaires et s'il s'agit effectivement d'un emploi judicieux de ses ressources.

Références

Équipe spéciale sur la lutte contre le choléra. Guidelines for cholera control. Genève : Organisation mondiale de la Santé ; 1992. Publication no. WHO/CDD/SER/80.4 Rev4.

Organisation Mondiale de la Santé. Guidelines for the control of epidemics due to *Shigella dysenteriae*1. Genève : OMS ; 1995. Publication no. WHO/CDR/95.4.

Organisation Mondiale de la Santé. Prevention and control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Rapport d'une consultation de l'OMS. Genève, Suisse, 28 avril-1^{er} mai 1997. WHO/FSF/FOS/97.6.

Organisation Mondiale de la Santé. Epidemic diarrhoeal disease preparedness and response : training and practice. Manuel du participant. Genève : OMS ; 1997. Publication no. WHO/EMC/DIS/97.3.

Chapitre 2

Prélèvement et transport des échantillons de matières fécales

Les échantillons de matières fécales devront être prélevés lors des premiers stades d'une maladie entérique, quand les pathogènes sont généralement présents en nombre élevé dans les selles et avant que les antibiotiques ne soient administrés (Tableau 2-1).

Tableau 2-1. Prélèvement et transport des échantillons pour le diagnostic de laboratoire

Quand faut-il faire les prélèvements	Quand le patient a la diarrhée, dès que la maladie commence (de préférence pendant les 4 jours suivant le début de la maladie) et avant que le traitement par antibiotiques ne soit administré.
Comment faut-il prélever	Écouvillonnage rectal ou écouvillon de selles fraîches dans le milieu de transport.
Milieu de transport	Cary-Blair ou autre milieu de transport approprié (pour <i>V. cholerae</i> , NE PAS UTILISER de soluté salin tamponné glycérolé).
Conservation après prélèvement	Réfrigérer à 4°C si les échantillons sont reçus par le laboratoire dans les 48 heures, sinon congeler à -70°C. Les échantillons de patients que l'on pense atteints de choléra peuvent être transportés à température ambiante et gardés plus longtemps si nécessaire, mais il vaut mieux que les selles soient réfrigérées pendant le transport.
Transport	Fermer les tubes/récipients pour éviter les fuites ; les placer dans des récipients hermétiques pour les protéger de la glace humide ou sèche. Envoyer dans des boîtes étanches contenant de la glace (sèche ou humide) par service postal rapide.

Des spécimens de selles ou d'écouvillonnage rectal devront être prélevés auprès de 10 à 20 personnes répondant aux conditions suivantes :

- Avoir une diarrhée aqueuse (choléra) ou une diarrhée sanglante (dysenterie) au moment du prélèvement
- Le début de la maladie remonte à moins de 4 jours avant la collecte des échantillons
- Le patient n'a pas encore commencé de traitement antibiotique pour la maladie diarrhéique

A. Recueil des selles

Il faut recueillir les selles dans un récipient propre, sans résidus de désinfectant ou de détergent et pourvu d'un couvercle bien adapté et hermétique. Les échantillons ne doivent pas être prélevés à partir des vidoirs d'hôpital (bassins de lit) car ils peuvent contenir des restes de désinfectants ou d'autres contaminants. Les échantillons de selles doivent être réfrigérés si possible et traités dans un délai maximum de deux heures après le prélèvement. Les échantillons qui ne peuvent pas être traités dans les deux heures doivent être placés dans un milieu de transport et réfrigérés immédiatement.

1. Placer les échantillons de selles dans des milieux de transport

On peut recueillir une petite quantité de matières fécales en introduisant un écouvillon dans l'échantillon et en lui imprimant un mouvement de rotation. Si du mucus ou des lambeaux d'épithélium sont présents, il faut toujours les inclure dans le milieu de transport. Insérer immédiatement l'écouvillon dans le milieu de transport. (Ce milieu devra être réfrigéré pendant une ou deux heures si possible.) Introduire l'écouvillon jusqu'au fond du tube et couper la partie supérieure de la tige que les doigts ont touchée. Revisser à fond le bouchon et placer le tube dans un réfrigérateur ou une glacière.

2. Écouvillonnage rectal

L'écouvillonnage peut se faire de la manière suivante : humidifier l'écouvillon dans un milieu de transport stérile, l'introduire dans le sphincter rectal sur 2 à 3



Figure 2-1. Le milieu de transport semi-solide de Cary-Blair

cm (1-1,5 pouces), tourner et retirer. Vérifier la présence de traces de matières fécales sur l'écouvillon. Insérer immédiatement l'écouvillon dans le milieu de transport réfrigéré tel que décrit dans le paragraphe ci-dessus et placer le tube dans un réfrigérateur ou une glacière.

Le nombre d'écouvillons nécessaires à l'ensemencement dépend du nombre de boîtes de Petri à ensemencer. En général, si on cherche à détecter plusieurs pathogènes, il faut collecter au moins deux échantillons de selles ou écouvillons rectaux par patient et les deux écouvillons doivent être insérés dans le même tube de milieu de transport.

3. Milieu de transport

Milieu de transport de Cary-Blair

Le milieu de transport de Cary-Blair peut être utilisé pour le transport de nombreux pathogènes entériques, notamment *Shigella*, *V. cholerae* et *E. coli* O157:H7 (Figure 2-1). Sa consistance semi-solide permet un transport facile et le milieu de Cary-Blair est stable et peut être stocké après préparation, à température ambiante pendant une durée maximale de un an dans des récipients fermés hermétiquement. Son pH étant élevé (8,4), c'est le milieu de choix pour le transport et la conservation de *V. cholerae*.

Préparation et contrôle de qualité du milieu de Cary-Blair

Le préparer en suivant les instructions du fabricant. [Note : Il existe plusieurs formules déshydratées de Cary-Blair disponibles dans le commerce. Certaines demandent que l'on ajoute du chlorure de calcium, d'autres n'en ont pas besoin. Le milieu de Cary-Blair peut également être préparé à partir de produits séparés.] Quand le milieu de Cary-Blair est préparé, il doit être mis dans des récipients en quantité suffisante pour que les écouvillons soient recouverts de 4 cm au moins de milieu de transport. Par exemple, des quantités de 5 à 6 ml doivent être versées dans des tubes à bouchon vissé de 13 x 100 mm. Dévisser les bouchons et les stériliser en les chauffant (ne pas mettre dans l'autoclave) à 100°C pendant 15 minutes. Revisser le capuchon après stérilisation. Le milieu de Cary-Blair est assez stable s'il est conservé dans des récipients fermés hermétiquement, dans un endroit sec pour que le milieu ne se dessèche pas. Il peut être utilisé pendant au maximum un an et tant que l'on n'observe pas de perte de volume, de contamination ou de changement de couleur.

Autres milieux de transport

Les milieux Amies et Stuart sont d'autres milieux similaires à celui de Cary-Blair. Ces deux milieux de transport sont acceptables pour *Shigella* et *E. coli* O157:H7 mais ils ne sont pas aussi bons que le Cary-Blair pour le transport de *V. cholerae*.

L'eau peptonée alcaline (APW) peut être utilisée pour le transport de *V. cholerae* pendant de brèves périodes mais c'est un milieu de transport d'une

qualité inférieure à celui de Cary-Blair et que l'on utilisera uniquement si ce dernier est indisponible. L'APW ne devra pas être utilisée si le repiquage est différé de plus de 6 heures après la réalisation du prélèvement, car d'autres organismes et germes vont proliférer et masquer les vibrions.

Le soluté salin tamponné glycérolé (BGS) est un milieu de transport qui convient pour *Shigella* spp., mais par contre, il est inapproprié pour le transport de *V. cholerae*. Le BGS a un autre inconvénient, il ne peut être utilisé que pendant un mois après sa préparation et, comme c'est un milieu liquide, il a plus de risque d'être répandu ou renversé pendant le transport.

4. Conservation des échantillons dans le milieu de transport

Si le milieu de transport doit être gardé à température ambiante, il devrait être réfrigéré si possible pendant une ou deux heures avant son utilisation. Les échantillons préservés dans le milieu de transport devraient être réfrigérés jusqu'à leur traitement. Si les échantillons sont gardés au-delà de 2 à 3 jours avant d'être mis en culture, il vaut mieux les congeler immédiatement à -70°C . Il sera éventuellement possible de récupérer des pathogènes d'échantillons réfrigérés au plus tard 7 jours après le prélèvement, mais le rendement diminue après les deux premiers jours. Il est particulièrement important de procéder à un ensemencement rapide ou à une congélation immédiate dans le milieu Cary-Blair pour l'isolement de *Shigella* qui est plus fragile que les autres organismes entériques. Les échantillons de selles qui ont été collectés auprès de patients atteints de choléra n'ont pas besoin d'être réfrigérés dans un milieu de transport à moins qu'ils ne risquent d'être exposés à des températures élevées ($>40^{\circ}\text{C}$).

5. Échantillons non préservés

Quand des milieux de transport ne sont pas disponibles, on peut, lorsque l'on suspecte la présence de *V. cholerae*, tremper du papier filtre, de la gaze ou du coton dans les selles liquides puis les placer dans un sachet en plastique. Le sachet doit être hermétiquement fermé pour que l'échantillon reste humide et ne se dessèche pas. L'adjonction de quelques gouttes de sérum physiologique stérile dans le sachet aide à maintenir l'échantillon humide. La réfrigération de l'échantillon pendant le transport est souhaitable, mais pas indispensable. Cette méthode n'est pas appropriée pour le transport de *Shigella* ou *E. coli* O157:H7 et c'est également un moyen moins efficace pour préserver *V. cholerae*.

B. Préparation des échantillons pour le transport

Les tubes contenant les échantillons doivent porter une étiquette qui les identifie clairement et qui indique le numéro de l'échantillon et si possible le nom du patient et la date du prélèvement. Il faut inscrire les numéros sur la partie dépolie du tube en utilisant un stylo indélébile. S'il n'existe pas de partie dépolie, inscrire l'information sur un ruban de sparadrap et le mettre sur le tube. Il faut également inscrire l'information concernant le patient sur une fiche de données,

joindre une copie de cette fiche aux échantillons et en conserver une. Un exemple de fiche de données est présenté dans l'Annexe F.

Si les tubes sont envoyés par voie aérienne, consultez les réglementations afférentes à l'emballage qui sont présentées dans la publication *Dangerous Goods Regulations (DGR). International Air Transport Association (IATA)*. Ces réglementations sont résumées au chapitre 13, « Emballage et expédition des échantillons cliniques et agents étiologiques. » Même si les échantillons sont envoyés par un autre moyen, ces réglementations sont d'excellentes directives pour emballer et préparer pour le transport tout matériel infectieux ou susceptible de l'être.

1. Échantillons réfrigérés

Il serait préférable de transporter les échantillons réfrigérés au laboratoire en les emballant dans une boîte hermétiquement fermée contenant des pains réfrigérés ou de la glace. S'il s'agit de glace humide, il faut placer les tubes ou les containers dans des récipients hermétiques, par exemple des sacs en plastique, pour protéger les échantillons de l'eau quand la glace fond.

2. Échantillons congelés

Les échantillons congelés doivent être transportés dans de la carboglace (ou glace sèche) en utilisant les mesures de précaution suivantes :

- Placer les tubes dans des récipients ou les envelopper dans du papier pour les protéger de la glace. Le contact direct avec la carboglace peut briser les tubes en verre.
- Si les échantillons ne sont pas encore mis dans des récipients hermétiques, il faut les protéger du gaz carbonique en fermant les capuchons à fond ou en mettant les tubes dans un sac en plastique qui sera hermétiquement fermé avec de l'adhésif. Le gaz carbonique va faire baisser le pH du milieu de transport et affecter la survie des organismes.
- Vérifier que la glacière est remplie de carboglace au minimum au tiers. Si les échantillons sont envoyés par avion et si on utilise plus de 2 kg de carboglace, il faut conclure des accords spéciaux avec la compagnie aérienne. Les compagnies aériennes n'acceptent que les paquets contenant moins de 2 kg de carboglace.
- L'adresse doit être marquée bien lisiblement avec le nom et le numéro de téléphone du laboratoire de destination. Il faut marquer en majuscules **ÉCHANTILLONS MÉDICAUX URGENTS : APPELER L'EXPÉDITEUR À L'ARRIVÉE, MAINTENIR RÉFRIGÉRÉ (ou CONGELÉ si tel est le cas)**. Ne pas oublier de mettre toutes les étiquettes ou fiches nécessaires, par exemple celles qui sont exigées par l'IATA, à l'extérieur du paquet.

Références

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the collection of laboratory specimens associated with outbreaks of gastroenteritis. MMWR 1990 ; 39 (No. RR-14).

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgie : CDC, 1994.

Chapitre 3

Épidémiologie de la dysenterie bacillaire à *Shigella*

Généralement, dans les pays en développement, la dysenterie épidémique est imputable à *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (Sd1) qui est un pathogène entérique très virulent et qui entraîne une mortalité élevée. C'est la cause la plus courante des grandes épidémies de dysenterie. Ces dernières années, Sd1 a causé de telles épidémies en Amérique centrale, en Asie du Sud et en Afrique centrale et australe. L'épidémie qui a sévi en Amérique centrale de 1969 à 1973 a causé plus de 500 000 cas et 20 000 décès. L'épidémie en Afrique centrale et australe a commencé en 1979 affectant d'abord l'Est du Zaïre, le Rwanda et le Burundi. Au début des années 90, elle s'est déplacée vers le Sud, touchant d'abord la Zambie, puis le Malawi, le Mozambique, le Zimbabwe et l'Afrique du Sud. Une nette augmentation du nombre de cas liée aux camps de réfugiés a été notée en Afrique centrale en 1994.

A. Épidémiologie de la shigellose

Il existe quatre espèces de *Shigella* : *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*. Chacune de ces espèces à l'exception de *S. sonnei* comporte plusieurs sérotypes (Tableau 3-1). En général, *S. sonnei* est plus courant dans les pays développés et *S. flexneri* et *S. dysenteriae* sont plus courants dans les pays en voie de développement. Les proportions de chaque organisme varient d'un pays à un autre. Sd1 se distingue des autres *Shigella* spp. de plusieurs manières :

- Seul Sd1 est la cause des grandes et longues endémies de dysenterie.
- La résistance aux antimicrobiens se développe plus rapidement et plus fréquemment avec Sd1 qu'avec d'autres espèces de *Shigella*.
- L'infection par Sd1 est responsable de maladies plus graves, plus longues et plus souvent mortelles que l'infection par d'autres espèces de *Shigella*.

Tableau 3-1. Espèces et sérogroupes de *Shigella*

Espèces	Désignation du séro groupe	Sérotypes
<i>S. dysenteriae</i>	sérogroupe A	1-15 ^{ab}
<i>S. flexneri</i>	sérogroupe B	1-6
<i>S. boydii</i>	sérogroupe C	1-19 ^b
<i>S. sonnei</i>	sérogroupe D	1

^a *S. dysenteriae* de type 1 a une signification spéciale car il est très virulent et cause des dysenteries endémiques ou épidémiques à forte mortalité. Un antisérum monovalent (absorbé) est nécessaire pour identifier *S. dysenteriae* type 1.

^b Des sérotypes supplémentaires ont été notifiés mais les antisérums spécifiques de ces nouveaux sérotypes n'étaient pas disponibles sur le marché au moment de la mise sous presse du présent manuel.

B. Manifestations cliniques

La diarrhée sanglante (dysenterie) est la principale caractéristique de l'infection par Sd1. *Shigella* cause la dysenterie en envahissant et détruisant les cellules qui tapissent l'intestin, causant une ulcération des muqueuses, des exsudats inflammatoires hémorragiques et une diarrhée sanglante. Outre les selles sanglantes, les patients souffrant de dysenterie ont souvent de la fièvre, des crampes abdominales et des douleurs rectales. Cependant, la réponse clinique à l'infection couvre une vaste gamme allant de la diarrhée bénigne à la diarrhée grave sanglante ou non. Dans presque la moitié des cas, *Shigella* cause une diarrhée aiguë non sanglante qui ne peut pas être distinguée cliniquement de la diarrhée causée par d'autres pathogènes entériques. La sévérité des symptômes semble être dose-dépendante. Des infections asymptomatiques peuvent se présenter mais pas avec le même ordre d'importance que pour les infections à *V. cholerae* O1. Il n'existe pas de porteur chronique bien que les organismes puissent être excrétés pendant plusieurs semaines. Les infections par Sd1 sont souvent les plus graves ou fatales chez les jeunes enfants, les personnes âgées et celles qui souffrent de malnutrition. Bien que la plupart des patients se remettent sans complications en l'espace d'une semaine, une diarrhée persistante peut occasionnellement s'installer.

Les infections par Sd1 sont parfois accompagnées de complications telles que des convulsions, une septicémie, un prolapsus rectal, un mégacôlon toxique. Une complication plus fréquente est le syndrome hémolytique et urémique (HUS) caractérisé par la triade classique de l'anémie hémolytique, la thrombopénie et l'insuffisance rénale. HUS peut être bénin avec une récupération rapide ou peut être grave et mener rapidement à l'insuffisance rénale ou à la mort.

C. Traitement

Le principal traitement de l'infection par Sd1 repose sur une thérapie antimicrobienne appropriée, qui diminue le risque de complications graves et de décès. D'autres mesures doivent être également utilisées.

Les agents antimicrobiens suivants sont recommandés actuellement par l'OMS pour le traitement des infections à Sd1 :

- Ampicilline
- Sulfaméthoxazole-triméthoprime
- Acide nalidixique
- Pivmecillinam
- Ciprofloxacine
- Norfloxacine
- Enoxacine

Le choix du traitement antimicrobien devra être fait à partir d'antibiogrammes récents des souches Sd1 de la région ou des régions voisines si Sd1 est nouveau

dans la région (voir Annexe E). La mise en place d'une stratégie de traitement doit reposer sur les facteurs suivants : l'agent antimicrobien choisi doit être efficace contre 80% au moins des souches locales Sd1, il doit être administré par voie buccale, il doit être d'un prix abordable et doit pouvoir être obtenu rapidement localement. Malheureusement, la résistance de Sd1 à l'ampicilline et au sulfaméthoxazole-triméthoprimine est devenue assez répandue. L'acide nalidixique, utilisé auparavant comme médicament de réserve pour traiter la shigellose, est actuellement le médicament de choix dans la plupart des endroits, bien que la résistance commence à se répandre un peu partout. La Pivmecillinam (amidinopénicilline pivoxil) reste efficace pour la plupart des souches de Sd1 mais il est parfois difficile d'obtenir le produit. Les fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine, enoxacine) ne devraient être envisagées que si les souches de Sd1 sont résistantes à l'acide nalidixique. Les fluoroquinolones sont souvent chères et pas toujours faciles à obtenir.

Actuellement, les souches Sd1 sont généralement résistantes à l'ampicilline, au sulfaméthoxazole-triméthoprimine, au métronidazole, à la streptomycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol, et aux sulfonamides. De plus, Sd1 semble sensible à certains antimicrobiens *in vitro* mais l'antimicrobien n'a pas d'efficacité documentée *in vivo* : nitrofuranes (nitrofurantoïne, furazolidone), aminoglycosides (gentamicine, kanamycine), céphalosporines de première et deuxième générations (céphalexine, céfamandole) et amoxicilline.

Référence

Organisation Mondiale de la Santé. Guidelines for the control of epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. Genève : OMS ; 1995. Publication no. WHO/CDR/95.4.

Chapitre 4

Isolement et identification de *Shigella*

L'isolement et l'identification de *Shigella* peuvent être grandement améliorés si on dispose de milieux de culture et de techniques optimales. Les méthodes présentées ici sont de nature à économiser les ressources et permettent aux techniciens de laboratoire de choisir dans une certaine mesure le protocole et les milieux. Les laboratoires qui ne disposent pas de ressources suffisantes pour utiliser les méthodes décrites dans ce chapitre devraient envoyer les échantillons ou les souches à d'autres laboratoires qui ont l'habitude de réaliser ces techniques.

A. Méthodes d'isolement

La Figure 4-1 présente la procédure d'isolement de *Shigella* à partir des échantillons de selles. Voir l'Annexe B pour la liste de fournitures nécessaires à l'identification en laboratoire de *Shigella*.

Pour un isolement optimal de *Shigella*, deux milieux sont généralement recommandés : un milieu général faiblement sélectif, comme la gélose MacConkey (MAC) et une gélose plus sélective comme la gélose xylose-lysine-désoxycholate (XLD). La gélose désoxycholate-citrate (DCA) et la gélose Hektoen entérique (HE) sont d'autres alternatives à la gélose XLD en tant que milieu de culture de sélectivité moyenne à forte. **Ne pas utiliser la gélose SS car elle inhibe fréquemment la culture de *S. dysenteriae* type 1.**

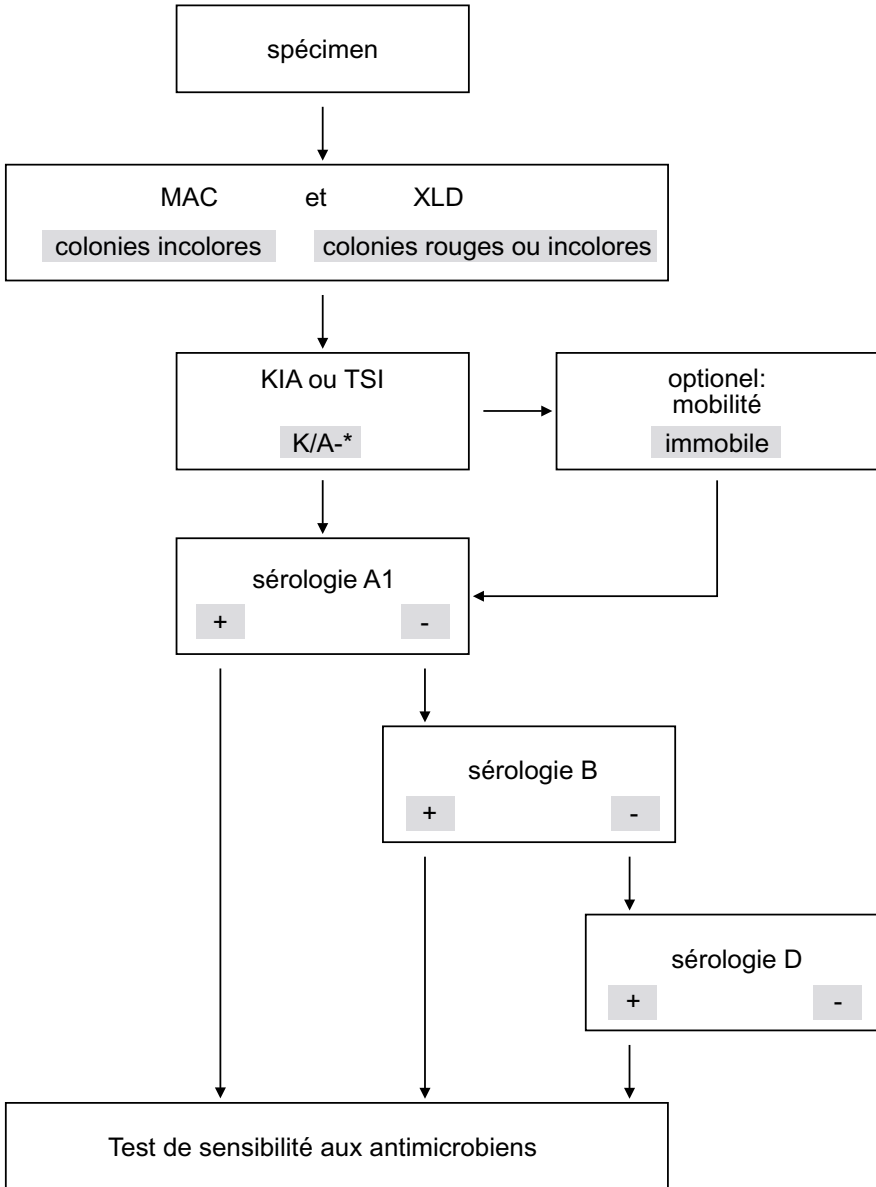
Si les milieux sélectifs ou différentiels ne sont pas correctement préparés, les réactions des organismes sur ces milieux peuvent être affectées. Par conséquent, il est utile de consulter la section D « Milieux pour l'isolement et l'identification de *Shigella* » pour discuter de ces milieux, de leur préparation et des souches utilisées pour contrôler la qualité.

Il n'existe pas de techniques d'enrichissement de *Shigella* meilleures que l'ensemencement direct du milieu pour fournir un taux de récupération optimal.

1. Inoculation de boîtes de Pétri contenant un milieu sélectif

Les échantillons devront être ensemencés aussi rapidement que possible dès leur arrivée au laboratoire. Les boîtes de Pétri peuvent être inoculées avec une seule goutte de selles liquides ou de suspension fécale. On peut également utiliser un écouvillonnage rectal ou fécal. Si on l'utilise pour inoculer des milieux sélectifs, une surface d'environ 2,5 cm (1 inch) de diamètre est déposée sur les boîtes de Pétri et l'inoculum doit être ensemencé en stries (Figure 4-2). Des milieux très sélectifs tels que XLD demandent un ensemencement en stries croisées plus fines que les milieux peu sélectifs. Quand on ensemence des échantillons primaires sur une boîte pour réaliser un isolement, il est important d'utiliser toute la surface de la gélose afin d'augmenter les chances d'obtenir

des colonies bien isolées. Incuber ensuite les boîtes de Pétri pendant 18 à 24 heures à une température comprise entre 35 et 37°C.



* K = alcalin (rouge) ; A = acide (jaune) ; - = pas de production d'H₂S

Figure 4-1. Procédure d'isolement de *Shigella* à partir d'un échantillon de selles

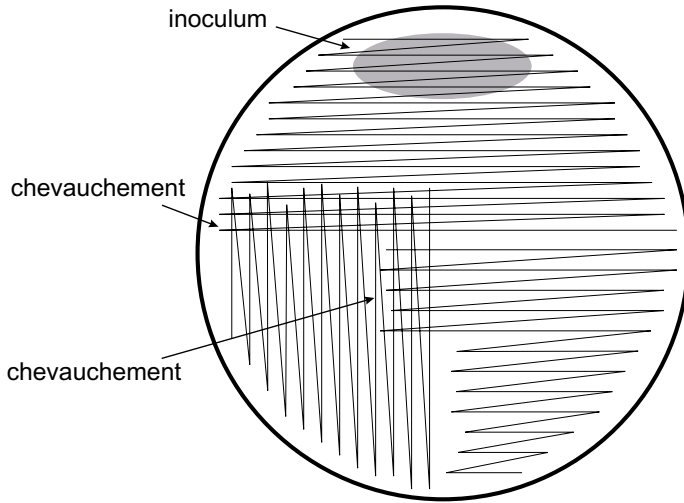


Figure 4-2. Méthode d'ensemencement d'une boîte pour l'isolement de *Shigella*

2. Isolement lors d'une suspicion de *Shigella*

Après incubation, noter la quantité et le type de culture (fermentant le lactose ou ne le fermentant pas) sur chaque isolement et ce pour chaque échantillon du patient (un exemple de fiche est présenté sur la Figure 4-3). Les colonies de *Shigella* sur MAC apparaissent comme des colonies convexes incolores d'un diamètre de 2 à 3 mm environ. Les colonies de *S. dysenteriae* 1 peuvent être plus petites (Tableau 4-1). Les colonies de *Shigella* sur la gélose XLD sont des colonies lisses et transparentes, de couleur rose ou rouge avec un diamètre de 1 à 2 mm. Les colonies de *S. dysenteriae* 1 sont souvent minuscules sur la gélose XLD, contrairement à d'autres espèces de *Shigella*. Les Figures 4-4 à 4-7 montrent l'apparence typique de *Shigella* sur géloses XLD et MAC. Il faut prendre les colonies suspectes des boîtes de Pétri MAC et XLD et les inoculer sur un milieu de différenciation tel que la gélose au fer de Kligler (KIA) et le milieu TSI (triple sugar/iron/agar).

Table 4-1. Aspect des colonies de *Shigella* lors de cultures sur milieux sélectifs

Gélose sélective	Couleur des colonies	Taille des colonies
Gélose MAC	Incolore	2-3 mm ^{a,b}
Gélose XLD	Rouge	1-2 mm ^{a,c}
Gélose DCA	Incolore	2-3 mm ^a
Gélose HE	Vert	2-3 mm ^a

^a Les colonies de *S. dysenteriae* type 1 risquent d'être plus petites.

^b Voir section D pour une discussion des différentes formulations de gélose commerciale déshydratée MacConkey et de la manière dont la sélectivité est affectée pour l'isolement de *Shigella*.

^c Les colonies de *S. dysenteriae* dans les géloses XLD sont généralement très petites, contrairement aux autres espèces de *Shigella*.

B. Tests de différenciation biochimique

L'identification de *Shigella* spp. suppose l'utilisation simultanée des tests biochimiques et sérologiques. Il est généralement conseillé d'utiliser un milieu de différenciation biochimique pour éviter de gaspiller les antisérums. La plupart des laboratoires utilisent les milieux KIA ou TSI pour identifier les souches pouvant être du genre *Shigella*. Si l'on souhaite faire un test supplémentaire, un milieu de mobilité peut être utilisé pour dépister les souches avant de réaliser une épreuve sérologique. La section D du présent chapitre décrit ces milieux plus en détails.

1. Gélose Kligler-fer (KIA) et triple sugar/iron/agar (TSI)

Note : la gélose Kligler est une gélose en tube additionnée de fer (iron en anglais) et ayant séché en pente, on parle de Kligler Iron Agar ou KIA.

Pour obtenir de véritables réactions sur KIA ou TSI, il faut y ensemer une culture pure. Choisir attentivement dans chaque gélose des colonies suspectes et les mettre sur une gélose Kligler (KIA) et un milieu TSI (triple sugar/iron/agar). Placer au moins une colonie bien isolée de chaque type sur chaque gélose. À l'aide d'une anse, toucher légèrement le centre même de la colonie. Ne pas prendre toute la colonie et ne pas la traverser. Ne pas toucher la gélose. Ainsi on évite de récupérer des contaminants qui peuvent se trouver en surface. Si on a du mal à identifier une colonie pure et isolée, on peut la purifier en la repiquant sur une autre gélose afin d'obtenir des colonies pures, isolées à partir desquelles on pourra inoculer les cultures en tubes KIA ou TSI.

KIA et TSI sont inoculés de la manière suivante : ensemer le fond du tube (culot) en piquant verticalement la gélose puis ensemer la pente en opérant des stries en zigzag. Après une incubation de 18 à 24 heures à une température comprise entre 35° et 37° C, on observe les géloses en pente en vue de détecter

Feuille de travail pour *Shigella*

NUMÉRO DE SPÉCIMEN	MILIEU	XYL/ LAC- ^a	XYL/ LAC+ ^b	COLONIE	KIA/TSI	OPTIONNEL			SÉROLOGIE SUR LAME			IDENTIFICATION	
						MOB. ^c	URÉE	LIA	A1	B	D		
	XLD			X1									
				X2									
				X3									
	MAC			M1									
				M2									
				M3									
	XLD			X1									
				X2									
				X3									
	MAC			M1									
				M2									
				M3									
	XLD			X1									
				X2									
				X3									
	MAC			M1									
				M2									
				M3									

^a XYL/LAC- = colonies négatives pour Xylose ou Lactose ^b XYL/LAC+ = colonies positives pour Xylose ou Lactose ^c mob. = mobilité

Figure 4-3. Feuille de travail pour *Shigella*

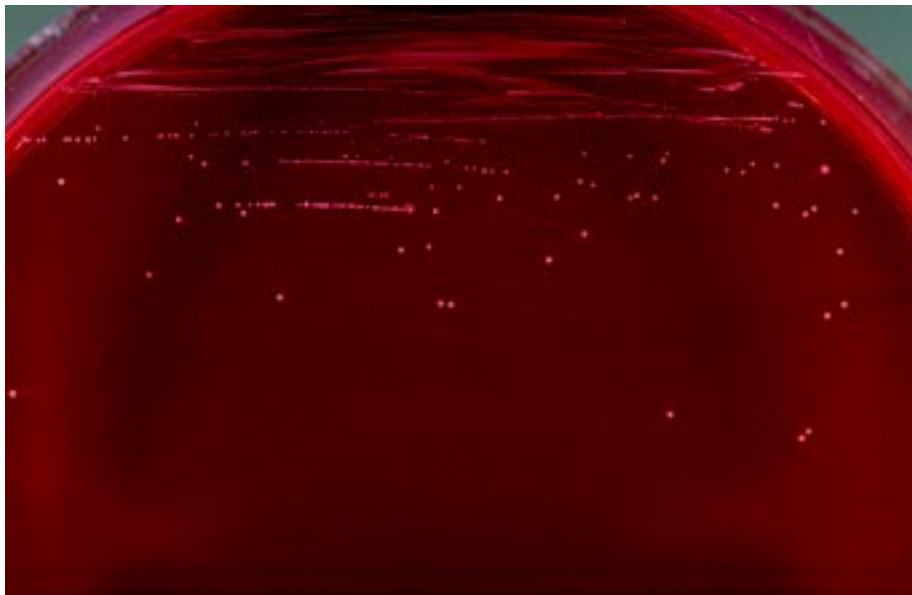


Figure 4-4. Colonies de *S. dysenteriae* 1 sur XLD

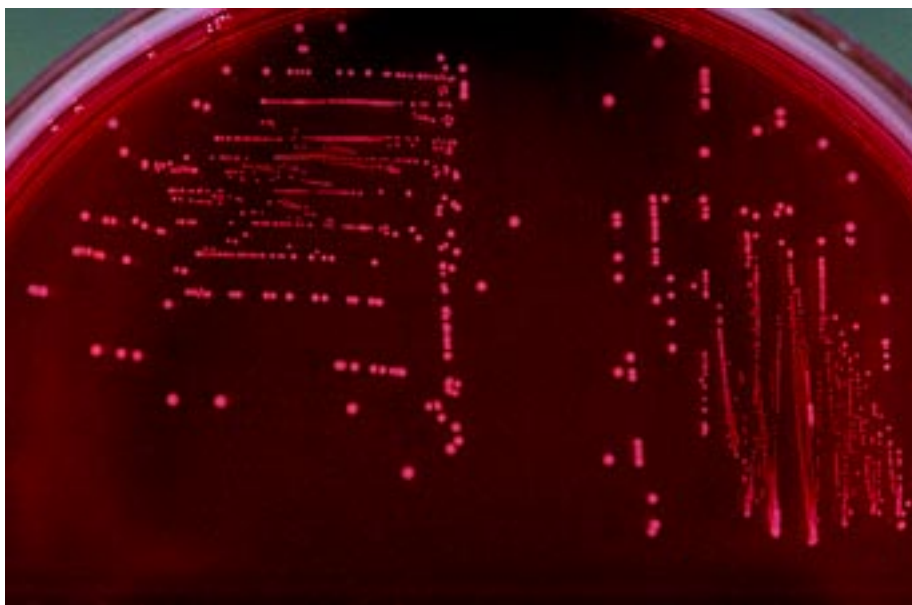


Figure 4-5. Colonies de *S. flexneri* sur XLD



Figure 4-6. Colonies de *S. flexneri* et *E. coli* sur XLD. Les colonies de *S. flexneri* sont incolores ou rouges alors que les colonies de *E. coli* sont jaunes.



Figure 4-7. Colonies de *S. flexneri* et *E. coli* sur MAC. Les colonies *E. coli* sont roses à rouges.

Tableau 4-2. Réactions de *Shigella* dans les épreuves biochimiques

Milieu de détection	Réactions <i>Shigella</i>
KIA	K/A, pas de gaz (pente rouge/culot jaune) ^a
TSI	K/A, pas de gaz (pente rouge/culot jaune) ^a
H ₂ S (sur KIA ou TSI)	Négatif
Mobilité	Négatif
Urée	Négatif
Indole	Positif ou négatif
LIA	K/A (pente violette/culot jaune) ^b

^aK = alcaline (rouge) ; A = acide (jaune) ; certaines souches de *S. flexneri* 6 et de *S. boydii* produisent du gaz à partir du glucose.

^bK = alcaline (violet) ; A = acide (jaune). Une réaction alcaline (violet) dans le culot de la culture indique que la lysine est décarboxylée. Une réaction acide (jaune) dans le culot de la culture indique que la lysine n'a pas été décarboxylée.

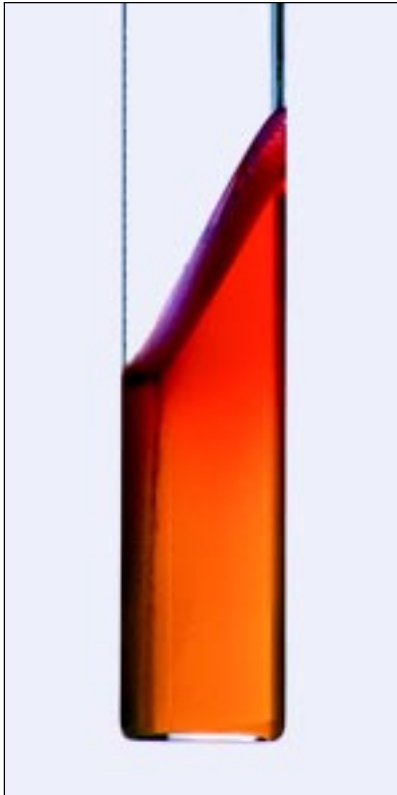


Figure 4-8. Réaction typique de souches de *Shigella* sur KIA (pente alcaline et culot acide)

des réactions typiques du genre *Shigella*. Lors de l'incubation, les bouchons de tous les tubes doivent être dévissés avant d'être mis dans l'incubateur. Cela est particulièrement important pour les milieux KIA et TSI. Si les bouchons sont vissés à fond et s'il existe donc des conditions anaérobies, les réactions caractéristiques de *Shigella* risquent de ne pas apparaître et cela donnerait un faux résultat. Il est également important que les milieux KIA et TSI soient préparés pour que les tubes aient un culot profond et une longue pente (voir section D).

Généralement, *Shigella* produit une pente alcaline (rouge) et un culot acide (jaune), pas de gaz et pas de H₂S (Tableau 4-2 ; Figure 4-8). Quelques souches de *S. flexneri* sérotype 6 et de très rares souches de *S. boydii* produisent du gaz dans les milieux KIA ou TSI.

2. Milieu de mobilité

On peut ensemencer un tube de gélose pour l'épreuve de mobilité en réalisant une piqûre sur 1 à 2 cm. Le milieu de mobilité peut être inoculé avec une culture issue de KIA ou TSI indiquant une réaction typique du genre *Shigella*. On peut également inoculer ce dernier en même temps que les pentes KIA ou TSI en utilisant la même aiguille d'inoculation sans toucher à nouveau la colonie. Le milieu gélosé pour mettre en évidence la mobilité doit être inoculé en premier puis en second on inocule KIA ou TSI en piquant à deux reprises plutôt qu'en une seule fois comme on le fait habituellement. Ne pas choisir une seconde



Figure 4-9. Milieu de mobilité montrant un organisme non mobile dans le tube de gauche et un organisme mobile à droite

colonie pour inoculer le KIA ou TSI après avoir inoculé le milieu mobilité car on pourrait mettre en évidence un autre organisme.

Observer, après environ 12 heures d'incubation à une température comprise entre 35° et 37°C. La mobilité est indiquée par la présence d'une culture diffuse (ressemblant à une culture brouillée) loin de la ligne d'inoculation (Figure 4-9). Les organismes non mobiles ne se développent qu'au niveau de la ligne d'inoculation. Les milieux pour l'étude de la mobilité ne sont pas toujours faciles à lire par le technicien de laboratoire non expérimenté. Toutes les réactions doivent être comparées avec les souches témoins positives et négatives. *Shigella* est toujours immobile (Tableau 4-2).

La surface de la gélose pour l'épreuve de mobilité doit être sèche lors de son utilisation. Si de l'humidité s'accumule à l'intérieur du tube, elle peut causer le développement d'un organisme immobile sur le côté de la gélose en créant un développement trouble avec une fausse apparence de mobilité (voir section D).

Le milieu SIM (Sulfide-indole-mobilité) est une combinaison disponible dans le commerce sous forme déshydratée (voir section D). Elle peut être utilisée à la place du milieu de mobilité.

3. Autres épreuves de différenciation biochimique

On peut utiliser d'autres tests biochimiques tels le bouillon pour la mise en évidence de l'uréase ou encore la gélose de lysine au fer pour un test supplémentaire des isollements avant les épreuves sérologiques mais il faudra évaluer la valeur de ces tests supplémentaires avant de les employer en routine (Tableau 4-2, Annexe G). La préparation de ces milieux ainsi que les souches proposées pour le contrôle de qualité, sont décrits à la section D.

Bouillon pour mise en évidence de l'uréase

Ce milieu détecte des organismes produisant de l'uréase tels que *Klebsiella* et *Proteus*. Inoculer le tube sur toute la surface de la pente. Desserrer les capuchons avant d'incuber pendant une nuit entière à une température entre 35° et 37°C. Les cultures positives pour l'uréase produisent une réaction alcaline dans le tube caractérisée par une couleur rosâtre-rouge (Figure 4-10). Des organismes négatifs pour l'urée ne changent pas la couleur de la culture qui est d'un jaune-rose pale. *Shigella* est toujours négatif pour l'urée (Tableau 4-2).

Gélose de lysine au fer

La gélose de lysine au fer (LIA) est utile pour le dépistage d'*Hafnia* spp. et certaines souches de *E. coli*, *Proteus* et *Providencia*. Inoculer la gélose LIA en piquant le fond du culot puis par stries sur la pente. Après une incubation de 18 à 24 heures à une température entre 35 et 37°C, les organismes qui produisent une lysine-décarboxylase sur LIA provoquent une réaction alcaline (couleur violette) dans la totalité du milieu (Figure 4-11). La production d'hydrogène sulfuré noircit le milieu. Les bactéries qui n'ont pas de lysine-décarboxylase

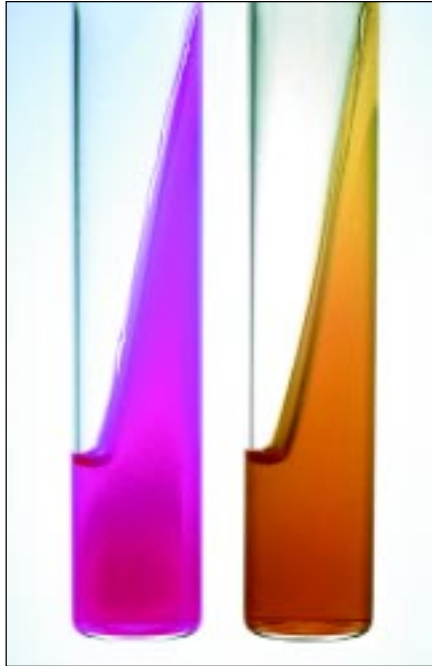


Figure 4-10. Une couleur rose apparaît dans la réaction positive de l'uréase (tube de gauche)

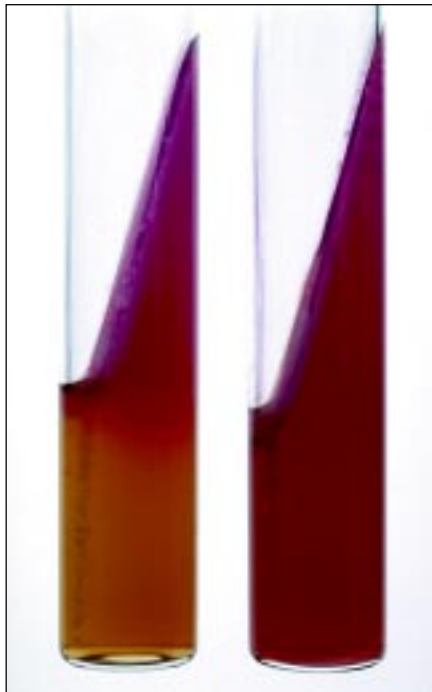


Figure 4-11. Les organismes positifs pour la lysine décarboxylase produisent une couleur violette sur l'ensemble de la culture LIA (tube de droite). Les organismes négatifs pour la lysine produisent une couleur jaune (acide) dans le culot du tube (tube de gauche).

présentent généralement une pente alcaline (violette), un culot acide (jaune), pas de gaz et pas de H₂S. *Proteus* et *Providencia* spp. présentent souvent une pente rouge due à la désamination de la lysine. La gélose LIA doit être préparée de façon à obtenir la formation d'un culot profond (voir section D).

Shigella spp. ne produit pas de lysine-décarboxylase et présente généralement une pente alcaline (violette) et un culot acide (jaune). Elle ne produit ni gaz ni H₂S (Tableau 4-2).

C. Identification sérologique de *Shigella*

Il est nécessaire d'effectuer des épreuves sérologiques pour identifier les souches de *Shigella*. Le genre *Shigella* se divise en 4 groupes sérologiques dont chacun comprend une espèce avec des antigènes différents. Les sérogroupes A, B, C et D correspondent respectivement à *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*. Sur les quatre, trois, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* et *S. boydii* sont composés d'un certain nombre de sérotypes (voir chapitre 3, Tableau 3-1).

L'identification sérologique est généralement faite par agglutination sur lame avec des sérums polyvalents anti-antigènes O somatiques, suivie, dans certains cas, de l'agglutination avec un antisérum monovalent pour identifier un sérotype spécifique. Un antisérum monovalent anti *S. dysenteriae* type 1 est nécessaire pour identifier ce sérotype qui est la cause la plus fréquente de dysenterie épidémique grave. Quand une colonie provenant d'une gélose a été identifiée comme *Shigella*, aucune autre colonie issue du même spécimen n'a besoin d'être testée.

Les techniciens de laboratoire doivent se rappeler que certains antisérums commerciaux pour *Shigella* ont une appellation ou un conditionnement différents. Par exemple, *Shigella* polyvalent A qui comprend des antisérums des sérotypes 1 à 7, est également appelé polyvalent A1. Autre source de confusion : l'antisérum monovalent peut avoir une étiquette pouvant faire croire qu'il s'agit d'un antisérum polyvalent. Par exemple, l'antisérum monovalent à *S. dysenteriae* 1 peut être appelé *Shigella* A1 au lieu de *S. dysenteriae* type 1. Quand il utilise des antisérums achetés depuis peu, le technicien de laboratoire doit lire attentivement la notice de la boîte ou demander des renseignements supplémentaires au fabricant si les étiquettes ne sont pas claires.

1. Agglutination sur lame

Comme *S. dysenteriae* 1, suivi de *S. flexneri* et *S. sonnei*, est l'agent le plus commun de la dysenterie épidémique, les souches qui réagissent lors des épreuves biochimiques doivent être étudiées en priorité avec l'antisérum monovalent A1, puis avec l'antisérum polyvalent B et finalement avec l'antisérum polyvalent D.

Les tests d'agglutination peuvent être réalisés dans une boîte de Pétri ou sur une lame propre. On utilise une anse, une aiguille d'inoculation, un applicateur ou encore un cure-dent stérile pour retirer une partie de la culture de la surface

d'un KIA, d'un TSI, de la gélose d'infusion de cœur (HIA) ou d'une autre gélose non sélective. La sérologie ne peut pas être effectuée sur une culture provenant d'un milieu sélectif tel que MacConkey ou XLD car cela peut donner des résultats faussement négatifs. Réaliser deux suspensions en émulsionnant la culture dans deux petites gouttes de solution salée physiologique et bien mélanger. Ajouter une petite goutte d'antisérum à l'une des suspensions. En général, on mélange des volumes plus ou moins égaux d'antisérum et de suspension de la culture mais le volume de suspension peut être le double du volume de l'antisérum. Pour économiser l'antisérum, on peut abaisser la quantité de ces volumes à 10 microlitres lors de leur utilisation. On peut se servir d'une anse d'inoculation calibrée pour dispenser de très petites quantités d'antisérum si on dispose pas de micropipettes automatiques (Figure 4-12). Bien mélanger la suspension et l'antisérum et incliner la lame alternativement d'un côté et de l'autre pour observer l'agglutination. Si la réaction est positive, des agglutinats vont apparaître dans un laps de temps compris entre 30 secondes et une minute (Figure 4-13). Examiner attentivement la suspension saline pour vérifier qu'elle ne contient pas de grumeaux dus à un phénomène d'autoagglutination. Si des grumeaux se forment, la culture est dite rugueuse et il est impossible de la sérotyper.

Les cultures qui réagissent sérologiquement et qui n'ont pas de résultats contradictoires aux tests biochimiques sont notifiées comme positives pour *Shigella*. Des souches négatives lors de l'épreuve sérologique, et qui sont identifiées par voie biochimique comme étant du genre *Shigella* peuvent être envoyés à un laboratoire de référence.

2. Contrôle de qualité des antisérums

Tous les lots d'antisérums doivent faire l'objet d'un contrôle de qualité avant l'utilisation. Le chapitre 11 traite du contrôle de qualité des antisérums.

D. Milieux pour l'isolement et l'identification de *Shigella*

Cette section comprend la description de tous les milieux mentionnés dans le présent chapitre ainsi que leurs caractéristiques, préparation et souches adéquates en vue du contrôle de qualité de leur préparation. Le numéro du lot du milieu déshydraté commercialisé ou chaque numéro de lot des ingrédients individuels utilisés pour la fabrication devront faire l'objet d'un contrôle de qualité avant utilisation. Voir le chapitre 11 pour une description des méthodes adéquates de contrôle de qualité.

1. Gélose désoxycholate-citrate (DCA)

La gélose DCA est un milieu sélectif servant à isoler des pathogènes intestinaux notamment *Shigella* et *Salmonella*. Les souches fermentant le lactose produisent des colonies roses entourées d'une zone de précipitation de bile. Les organismes des souches ne le fermentant pas sont incolores.

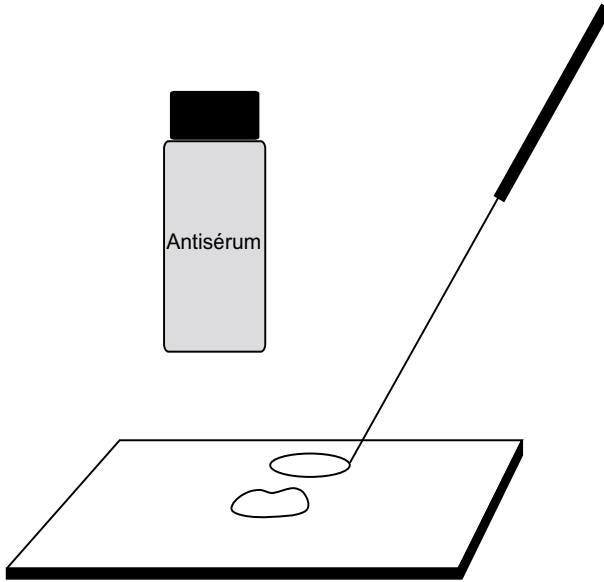


Figure 4-12. Une anse sert à dispenser de petites quantités d'antisérum pour des tests d'agglutination sur lame.

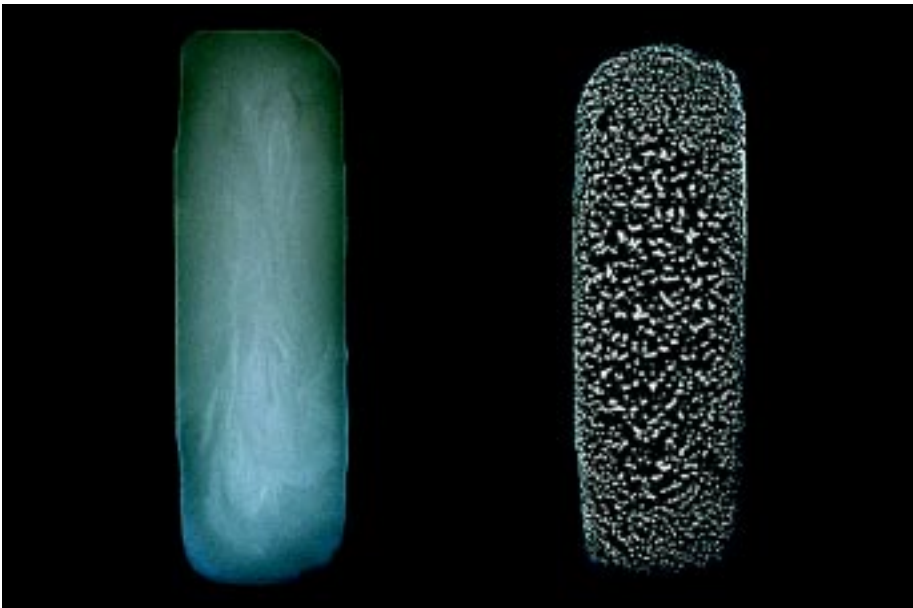


Figure 4-13. Les sérums anti-*Shigella* vont agglutiner les souches du même séro groupe/sérotype (droite). La solution salée n'agglutine pas les *Shigella* (gauche).

Plusieurs formulations de gélose DCA, éventuellement variables concernant leur sélectivité, sont disponibles auprès de divers fabricants.

Préparation et contrôle de qualité

Préparer selon les instructions du fabricant. (Note : On peut également les préparer à partir d'ingrédients individuels mais cela donnera une différence plus importante entre les lots par rapport aux préparations commerciales déshydratées.) Le milieu DCA est très sensible à la chaleur et il faut éviter de le porter à ébullition. Ne pas autoclaver. Les boîtes de Pétri peuvent être conservées à 4°C pendant une semaine au maximum.

Pour le contrôle de qualité de la DCA, les organismes suivants devront être adaptés à la confirmation des caractéristiques de croissance sélective et inhibitrice. *E. coli* peut être plus ou moins inhibé mais produira des colonies roses entourées d'une zone de bile précipitée. *S. flexneri* et *S. dysenteriae* 1 produiront un assez bon développement de colonies incolores.

2. Gélose Hektoen entérique (HE)

La gélose HE est un milieu sélectif différentiel utile pour l'isolement de *Salmonella* et *Shigella*. C'est un système d'indicateur H₂S pour repérer les *Salmonella* productrices d'H₂S et se présentant sous la forme de colonies bleues et vertes avec un centre noir. Les colonies *Shigella* sont vertes alors que celles qui fermentent le lactose comme *E. coli* sont de couleur rose ou orange avec une zone de précipitation de la bile.

Préparation et contrôle de qualité

Préparer selon les instructions du fabricant. (Note : Plusieurs marques commerciales de milieu HE sont disponibles. Ce milieu peut être également préparé à partir d'ingrédients séparés mais les résultats risquent d'être bien différents de ceux obtenus à partir de la formule déshydratée commerciale.) Chauffer en faisant bouillir pour dissoudre mais éviter de surchauffer. Ne pas autoclaver. Quand la préparation est assez froide pour être versée, mettre dans les tubes. Les tubes peuvent être conservés à 4°C pendant une semaine maximum.

Pour le contrôle de qualité du milieu HE, les micro-organismes suivants sont adaptés à la confirmation des caractéristiques de croissance sélective ou inhibitrice : *E. coli* devra produire des colonies roses ou oranges entourées d'une précipitation de bile ; *S. flexneri* devra produire un assez bon développement de colonies vertes mais les colonies de *S. dysenteriae* 1 seront probablement plus petites.

3. Gélose au fer de Kligler (KIA) et milieu TSI (Triple sugar/iron/agar)

KIA et TSI sont des milieux de différenciation contenant des hydrates de carbones utilisés pour isoler des pathogènes intestinaux, dont *Shigella*. Ces

milieux font la distinction entre les organismes qui fermentent le lactose et ceux qui ne le fermentent pas et possèdent un indicateur de sulfure d'hydrogène. Les organismes produisant H_2S noirciront le milieu KIA et TSI.

KIA contient du glucose et du lactose. Les organismes fermentant le glucose produiront un culot acide (jaune) ; certains produisent également du gaz. Les organismes fermentant le lactose auront une pente acide (jaune) et les organismes qui ne le fermentent pas auront une pente alcaline (rouge).

TSI contient du saccharose en plus des ingrédients du KIA. La fermentation du glucose par les micro-organismes se traduira par l'acidification du culot qui sera jaune avec une éventuelle production de gaz. Avec les micro-organismes fermentant le lactose, la pente sera acidifiée (jaune). En l'absence de fermentation du lactose, cette pente restera alcaline (rouge).

Préparation et contrôle de qualité

Préparer selon les instructions du fabricant. (Note : Il existe plusieurs formules déshydratées de KIA et de TSI disponibles dans le commerce. Ces milieux peuvent être également préparés à partir d'ingrédients séparés mais cela risque de provoquer des variations d'un lot à l'autre.) Placer une quantité du milieu dans des récipients adaptés afin que le volume soit suffisant pour donner un culot profond et une longue pente. Mettre 6,5 ml de milieu dans des tubes de 16 x 125 mm avec des bouchons hermétiques (les bouchons ne doivent pas être serrés à fond) et stériliser à l'autoclave puis laisser les tubes se solidifier de façon à obtenir un culot de 3,5 cm et une pente de 2,5 cm. Visser les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois au maximum.

Pour le contrôle de la qualité de KIA ou de TSI, les organismes suivants sont adaptés pour confirmer les caractéristiques de réponses biochimique : *E. coli* devra donner une pente et un culot acides avec production de gaz mais pas de H_2S ; *S. flexneri* devra donner une pente alcaline et un culot acide sans production de gaz ou de H_2S (Figure 4-8) ; une souche de *Salmonella* produisant de l' H_2S peut être utilisée pour contrôler cette réaction.

4. Gélose de lysine au fer

Les organismes qui produisent une décarboxylation de la lysine dans LIA donnent une réaction alcaline (couleur violette) sur le culot et la pente du milieu (Figure 4-11). La production de H_2S est indiquée par un noircissement du milieu. Les organismes ne décarboxylant pas la lysine, tels que *Shigella*, produisent généralement une pente alcaline (violette) et un culot acide (jaune), pas de gaz et pas d' H_2S (Tableau 4-2). *Proteus* et *Providencia* spp. produisent souvent une pente rouge suite à la désamination de la lysine. LIA doit être préparé afin que le volume du milieu contenu dans le tube soit suffisant pour donner un culot profond. Il est important que les tubes de LIA aient un culot profond car la réaction de décarboxylation ne se produit que dans des conditions d'anaérobiose.

Préparation et contrôle de qualité

Préparer le milieu selon les instructions du fabricant qui figurent sur la bouteille. (Note : Il existe plusieurs sociétés qui vendent du LIA déshydraté. LIA peut également être préparé à partir d'ingrédients séparés mais il peut y avoir des différences d'un lot à l'autre.) Mettre 6,5 ml de milieu dans des tubes de 16 x 125 mm avec des bouchons pouvant être vissés à fond (laisser les bouchons desserrés). Stériliser à l'autoclave. Laisser les tubes se solidifier afin d'obtenir un culot de 3,5 cm et une pente de 2,5 cm. Une fois le milieu refroidi et solidifié, serrer les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois maximum.

Pour le contrôle de qualité de LIA, on peut utiliser les organismes suivants : *S. flexneri* devra donner une pente alcaline et un culot acide sans production de H₂S. On peut utiliser une souche de *Salmonella* produisant de l'H₂S pour contrôler la réaction H₂S et visualiser la présence d'une probable lysine-décarboxylase donnant une réaction alcaline dans le culot du tube.

5. Gélose de MacConkey

La gélose de MacConkey (MAC) est un milieu recommandé pour l'isolement et la différenciation entre les germes intestinaux gram négatifs qui ne fermentent pas le lactose et ceux qui le fermentent. Les colonies de *Shigella* dans la gélose de MacConkey apparaissent convexes et incolores avec un diamètre de 2 à 3 mm. Les colonies de *S. dysenteriae* type 1 peuvent être plus petites.

Il existe plusieurs marques disponibles dans le commerce de gélose de MacConkey. La plupart des fabricants préparent des gélose de MacConkey dont la sélectivité varie, ce qui se répercute sur l'isolement de *Shigella*. Par exemple, certaines formulations de MacConkey ne contiennent ni cristal violet, un agent sélectif, ces milieux ne devraient pas être utilisés pour l'isolement de *Shigella*. Oxoid MacConkey Agar No 3, Difco Bacto MacConkey et BBL MacConkey Agar conviennent parfaitement.

Préparation et contrôle de qualité

Préparer selon les instructions du fabricant. (La gélose MAC peut également être préparée à partir d'ingrédients séparés mais cela donne des résultats bien différents de ceux que l'on obtient avec une formulation déshydratée commerciale.) Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 50°C et verser dans des boîtes de Pétri. Laisser les couvercles légèrement ouverts pendant 20 minutes pour que la surface de la gélose sèche. Fermer le couvercle et conserver à 4°C pendant un mois maximum. Si on veut conserver les boîtes pendant plus de quelques jours, mettre les tubes dans des sachets en plastique hermétiquement fermés afin que le milieu ne se dessèche pas.

Pour le contrôle de qualité de MAC, les organismes suivants sont adaptés pour confirmer les caractéristiques de croissance sélective et inhibitrice : *E. coli* devra produire des colonies roses à rouges avec une culture allant de bonne à excellente. *S. flexneri* devra produire des colonies incolores avec un

développement relativement bon mais les colonies de *S. dysenteriae* 1 peuvent être plus petites.

6. Gélose pour mise en évidence de la mobilité

Comme *Shigella* spp. est toujours immobile, le milieu de mise en évidence de la mobilité représente un test de dépistage utile. La mobilité est indiquée par la présence d'une culture diffuse (comme si elle se brouillait) loin de la ligne d'inoculation (Figure 4-9). Les organismes immobiles ne se développent pas en dehors de la ligne d'inoculation.

Préparation et contrôle de qualité

Suivre les instructions du fabricant pour la réhydratation du milieu en poudre. (Note : Il existe plusieurs formulations de milieux déshydratés disponibles dans le commerce pour mettre en évidence la mobilité. Ce milieu peut également être préparé à partir de produits disponibles au laboratoire.) Chauffer en faisant bouillir pour être sûr que le milieu est entièrement dissous. Mettre environ 4 à 5 ml de milieu par tube de dimension 13 x 100 mm avec un bouchon laissé desserré mais pouvant être fermé à fond, et stériliser à 121°C pendant 15 minutes. Laisser la culture se solidifier. Après solidification et refroidissement de la gélose, laisser le bouchon desserré jusqu'à ce que la surface du milieu soit sèche. Visser le bouchon à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois maximum.

Pour le contrôle de qualité du milieu de mise en évidence de la mobilité, on peut utiliser les organismes suivants : *E. coli* qui est mobile et *Shigella* spp. qui est immobile. La surface du milieu doit être sèche lors de son utilisation. Si de l'humidité s'accumule à l'intérieur du tube, il faut la retirer soigneusement avant d'ensemencer le tube. L'humidité peut causer le développement d'un organisme immobile sur le côté de la gélose créant un développement trouble avec une fausse apparence de mobilité.

7. Milieu SIM (Sulfure-indole-mobilité)

Le milieu SIM combine trois tests en un seul tube – production de sulfure d'hydrogène, production d'indole et visualisation de la mobilité. La réaction d'indole n'est pas nécessaire pour dépister des souches suspectes du genre *Shigella* car les réactions des souches sont variables. Il est ensemencé comme le milieu de mise en évidence de la mobilité en utilisant une aiguille pour piquer sur une profondeur d'environ 1 à 2 cm puis il est incubé à 35° C pendant 18 heures. La réaction de mobilité est lue de la même manière que pour le milieu de mise en évidence de la mobilité. La production de sulfure d'hydrogène est indiquée par le noircissement du milieu, comme pour KIA ou TSI. La production d'indole peut être testée par la méthode du papier filtre ou en ajoutant dans le tube quelques gouttes de réactif de Kovac.

Préparation et contrôle de qualité

Suivre les instructions du fabricant pour la réhydratation du milieu. Chauffer jusqu'à ébullition afin que le milieu soit entièrement dissous. Mettre dans des tubes et stériliser en passant à l'autoclave pendant 15 minutes à 121° C.

Pour le contrôle de qualité du milieu SIM, on peut utiliser les organismes suivants : *E. coli* est positif pour l'indole, H₂S négatif et positif pour la mobilité. Une souche de *Salmonella* produisant de l'H₂S peut être utilisée pour contrôler la réaction. Elle sera probablement mobile et négative pour l'indole. *Shigella* spp. est négatif pour la mobilité, H₂S-négatif mais variable concernant la réaction pour l'indole.

8. Milieu du test de l'uréase

Les cultures positives à l'uréase produisent une réaction alcaline (couleur rouge) dans le milieu (Figure 4-10). Les organismes négatifs à l'uréase ne changent pas la couleur du milieu qui est d'un jaune-rose pale. *Shigella* est toujours négatif à l'uréase (Tableau 4-2).

Préparation et contrôle de qualité

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation. (Note : Il existe dans le commerce plusieurs marques de milieu pour le test de l'uréase dont certaines demandent la préparation d'un bouillon stérile qui est ajouté à la gélose autoclavée. Certains fabricants ont des concentrés d'urée stérile prêts à l'emploi.)

Préparer la base de gélose à l'urée comme indiqué sur la bouteille. La stériliser à 121°C pendant 15 minutes. Laisser refroidir à une température de 50 à 55°C, et ajouter ensuite le concentré d'urée en suivant les indications du fabricant. Avant d'ajouter l'urée à la gélose, vérifier que la gélose est froide car l'urée est thermolabile. Mélanger et verser dans des tubes stériles. Incliner le milieu pour qu'un culot profond se forme.

Pour le contrôle de qualité du milieu pour la recherche de l'uréase, on peut utiliser les organismes suivants : *Proteus* spp. est positif à l'uréase. *E. coli* est négatif à l'uréase.

9. Gélose de xylose-lysine-désoxycholate (XLD)

Ce milieu différentiel sélectif convient bien à l'isolement direct de *Shigella* et de *Salmonella* dans les échantillons de selles. La différenciation de ces deux espèces par rapport à des bactéries non pathogènes se fait à l'aide de la fermentation du xylose et du lactose, la décarboxylation de la lysine et la production de sulfure d'hydrogène.

Les colonies *Shigella* sur la gélose XLD sont des colonies transparentes et lisses d'une couleur rose ou rouge avec un diamètre de 1 à 2 mm (Figure 4-5). Les colonies de *Shigella dysenteriae* type 1 dans la gélose XLD sont souvent

Chapitre 5

Étiologie et épidémiologie du choléra

Les isollements de *V. cholerae* O1 se divisent en deux biotypes, El Tor et classique, sur la base de plusieurs caractéristiques phénotypiques. Actuellement le biotype El Tor est responsable de pratiquement tous les cas de choléra au monde et des isollements du biotype classique ne sont pas retrouvés en dehors du Bangladesh. De plus, *V. cholerae* O1 se divise en deux sérotypes, Inaba et Ogawa, selon l'agglutination de l'antisérum. Un troisième sérotype possible, Hikojima, est décrit bien qu'il soit très rare pendant une flambée ou une épidémie. Il est intéressant de noter le biotype et le sérotype de l'isolement mais il n'est pas nécessaire de connaître cette information pour répondre de manière appropriée à une épidémie.

Dans les sérogroupes O1 et O139, la capacité de produire la toxine cholérique (TC) est un déterminant important de la virulence. En général, des isollements de *V. cholerae* O1 et O139 sont jugés très virulents et susceptibles de déclencher des épidémies de choléra (Tableau 5-1). La plupart des souches de *V. cholerae* isolées pendant des flambées de cas appartiendront aux sérogroupes toxinogènes O1 et O139. Mais certaines souches de *V. cholerae* ne produisent pas de TC et ne peuvent pas être à l'origine du choléra épidémique. Quand on trouve ces souches, on doit les étudier dans leur contexte clinique et épidémiologique. Les souches non toxinogènes risquent d'être associées à des diarrhées sporadiques.

A. Historique

On pense que le choléra est originaire du delta du Gange en Inde. Au 19^e siècle, différentes pandémies de choléra se sont répandues dans de nombreuses parties du monde. En 1961, une épidémie massive a sévi en Asie du Sud-Est. Cette épidémie est reconnue à présent comme le début de la septième pandémie cholérique. Cette pandémie a été causée par le biotype El Tor de *V. cholerae* O1 toxinogène. Il a rapidement gagné l'ensemble de l'Asie du Sud, du Moyen-Orient et de l'Europe du Sud-Est, arrivant en Afrique en 1970. En janvier 1991, le choléra épidémique est apparu en Amérique du Sud dans plusieurs villes côtières du Pérou se propageant rapidement aux pays voisins. A la fin de 1996, le choléra avait gagné 21 pays d'Amérique latine, causant plus d'un million de cas et près de 12 000 décès. Le nombre de cas de choléra notifiés ailleurs dans le monde s'est accru pendant les années 90. En Afrique, au début des années 90, le choléra sévissait essentiellement en Afrique australe. Mais, à la fin de cette décennie, le principal foyer de choléra s'est déplacé en Afrique de l'Ouest. D'un point de vue général, c'est dans les années 90 que l'Afrique a notifié le plus de cas par rapport aux décennies précédentes.

Le séro groupe O139 de *V. cholerae*

V. cholerae O139 est apparu fin 1992 en Inde. Il s'est rapidement répandu au Bangladesh et dans d'autres pays d'Asie bien que le rythme ait ralenti depuis les premières flambées de cas. Jusqu'en 1998, 11 pays avaient officiellement notifié à l'OMS la transmission de *V. cholerae* O139. Des cas importés ont été notifiés par les États-Unis et d'autres pays. Pour le moment, *V. cholerae* semble confiné en Asie.

Tableau 5-1. Comparaison de souches de *V. cholerae* associées et non associées aux épidémies

Types	Associés aux épidémies	Non associés aux épidémies
Sérogroupe	O1, O139	Non O1/non O139 (plus de 150 sérogroupe existent)
Biotypes du séro groupe O1	Classique et El Tor (non applicables au séro groupe O139)	Biotypes ne s'appliquent pas aux souches non O1
Séro types du séro groupe O1	Inaba, Ogawa et Hikojima (non applicables au séro groupe O139)	Ces 3 séro types ne sont pas applicables aux souches non O1
Production de toxine	Produit de la toxine cholérique ^a	Ne produisent généralement pas la toxine cholérique mais produisent parfois d'autres toxines

^a Existence de souches O1 non toxigènes qui sont rarement associées aux épidémies.

Les caractéristiques épidémiologiques du séro groupe O139 semblent identiques à celles du séro groupe O1. Les caractéristiques d'isolement et d'identification du séro groupe O139 sont identiques à celles du séro groupe O1 sauf qu'il faut l'antisérum O139 pour l'identification. Des tests de biotypes pour *V. cholerae* O1 ne sont pas valables pour *V. cholerae* O139 ni pour les autres sérogroupe non O1/non O139.

B. Manifestations cliniques

Le choléra est une maladie diarrhéique sécrétoire. L'entérotoxine produite par *V. cholerae* O1 et O139 provoque la sécrétion de quantités importantes de

liquides et d'électrolytes dans les intestins. Cela entraîne rapidement une diarrhée aqueuse, une diminution de la circulation et du volume sanguin, des acidoses métaboliques, une perte de potassium et par la suite un collapsus cardio-vasculaire et la mort. Dans des cas plus graves, la diarrhée peut rapidement causer la perte de 10% minimum du poids du corps, suivi d'un choc hypovolémique précédant le décès. Cependant, 75% ou plus des infections initiales avec *V. cholerae* O1 ou O139 peuvent être asymptomatiques, suivant la dose infectieuse. Sur les 25% de cas symptomatiques, la plupart ont une maladie bénigne. Environ 5% des patients ont une maladie modérée surveillée médicalement mais pour laquelle l'hospitalisation n'est pas nécessaire. Chez environ 2% des patients, la maladie évolue vers un choléra grave et mortel. Les personnes avec un groupe sanguin O ont plus de risque de contracter un choléra grave que celles qui ont un autre groupe sanguin.

C. Traitement

La réussite du traitement des patients atteints de choléra dépend de la vitesse de remplacement des pertes en liquide et en électrolytes. Grâce à un traitement correct, la mortalité est inférieure à 1% des cas. Les liquides et les électrolytes peuvent être rapidement remplacés soit par voie orale soit par voie intraveineuse. Le traitement intraveineux est nécessaire pour les patients qui sont arrivés en état de choc ou ceux qui ne peuvent pas boire.

Le traitement à base d'antibiotiques est utile mais pas essentiel pour traiter les patients atteints de choléra. Les agents antimicrobiens diminuent la durée de la maladie, le volume des selles et la durée d'émission des vibrions dans les selles. Il est très important d'utiliser un agent antimicrobien auquel l'organisme est sensible. Les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour traiter les patients atteints de choléra sont les suivants : tétracycline, doxycycline, furazolidone, sulfaméthoxazole-triméthoprime, érythromycine ou chloramphénicol. La ciprofloxacine et la norfloxacine sont également efficaces. Comme la résistance aux agents antimicrobiens devient un problème grandissant dans de nombreuses parties du monde, il faut suivre la sensibilité des souches de *V. cholerae* O1 aux agents antimicrobiens au début d'une épidémie puis à intervalles de temps réguliers (voir Annexes C et E).

Pour *V. cholerae*, les résultats de la méthode de diffusion en gélose pour l'ampicilline, les sulfonamides, la tétracycline et le sulfaméthoxazole-triméthoprime (sensible, intermédiaire et résistant) sont bien liés aux résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI) déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide. Les épreuves de diffusion en gélose ne doivent pas être utilisées pour la doxycycline et l'érythromycine car les résultats de ces médicaments sont souvent inexacts pour les souches *V. cholerae* O1 et O139. Mais le test de diffusion en gélose pour la tétracycline peut être utilisé pour prédire la sensibilité possible des souches à la doxycycline. Des détails supplémentaires sur les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens sont donnés au chapitre 9.

D. Épidémiologie

Quand le choléra apparaît à l'origine sous la forme d'une épidémie dans une population non exposée, il peut affecter tous les groupes d'âge. Par contre, dans des régions où la maladie est fortement endémique, la plupart de la population adulte a acquis une certaine forme d'immunité naturelle suite à des maladies ou des infections asymptomatiques répétées. Dans un tel environnement, la maladie se présente essentiellement chez les jeunes enfants qui sont exposés pour la première fois à l'organisme et chez les personnes plus âgées dont la production d'acide gastrique diminue et dont le système immunitaire s'affaiblit. Les épidémies apparaissent en général à la fin de l'été et en automne. Ce sont les personnes pauvres qui courent le plus de risques car elles manquent souvent d'eau potable, n'ont pas de mesures d'hygiène correcte à la maison et achètent de la nourriture et de l'eau chez les vendeurs de rue.

De nombreuses enquêtes ont fait le lien entre la transmission du choléra et l'eau provenant des puits ou des rivières. Mais il faut savoir que la nourriture est également un facteur important de transmission de cette maladie. Les produits de la mer sont également à l'origine de la maladie, surtout les produits crus ou peu cuisinés récoltés dans des endroits contaminés par des eaux d'égout ou dans d'autres environnements où existe *V. cholerae* O1. Bien que *V. cholerae* O1 et O139 puissent être neutralisés par la dessiccation ou par la lumière du soleil et l'acidité, ils se développent bien sur les aliments humides dans lesquels la cuisson a éliminé les autres organismes compétitifs. Le riz cuit est un milieu de culture propice au même titre que les lentilles, le mil et autres aliments ayant un pH neutre. Les fruits et légumes cultivés près des égouts et mangés sans être cuits ou non traités par d'autres procédés de décontamination sont des facteurs possibles de transmission du choléra. La congélation des aliments ou des boissons ne prévient pas la transmission.

Aucun fait n'indique que le choléra puisse se propager par le contact direct d'une personne à une autre, par exemple en se donnant la main ou en soignant un patient. Les flambées de cas dans les hôpitaux sont probablement dues à une alimentation ou à une eau contaminée. De même, les flambées de cas suivant l'enterrement d'un patient atteint de choléra sont généralement causées par la consommation d'aliments contaminés servis lors du repas de cérémonie et préparés par les personnes qui ont embaumé le corps.

E. Vaccin contre le choléra

Ces quinze dernières années, des progrès très importants ont été faits pour mettre au point de nouveaux vaccins oraux contre le choléra. Deux d'entre eux, testés auprès de volontaires des pays industrialisés et dans des régions où le choléra est endémique, sont disponibles dans le commerce de quelques pays : vibrions cholériques tués combinés à un recombinant purifié B de sous-unités de toxine cholérique (Wc/rBS) et vaccin atténué vivant contenant la souche génétiquement modifiée *V. cholerae* O1 CVD 103-HgR. L'apparition de *V.*

cholerae O139 a entraîné de nouveaux efforts pour mettre au point un vaccin anticholérique efficace et pratique. Aucun des vaccins actuels n'est efficace contre cette nouvelle souche.

Références

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgie : CDC, 1994.

Global Task Force on Cholera Control. Guidelines for cholera control. Genève : Organisation Mondiale de la Santé ; 1992. Publication no. WHO/CDD/SER/80.4. Rev.4.

Chapitre 6

Isolement et identification de *V. cholerae* O1 et O139

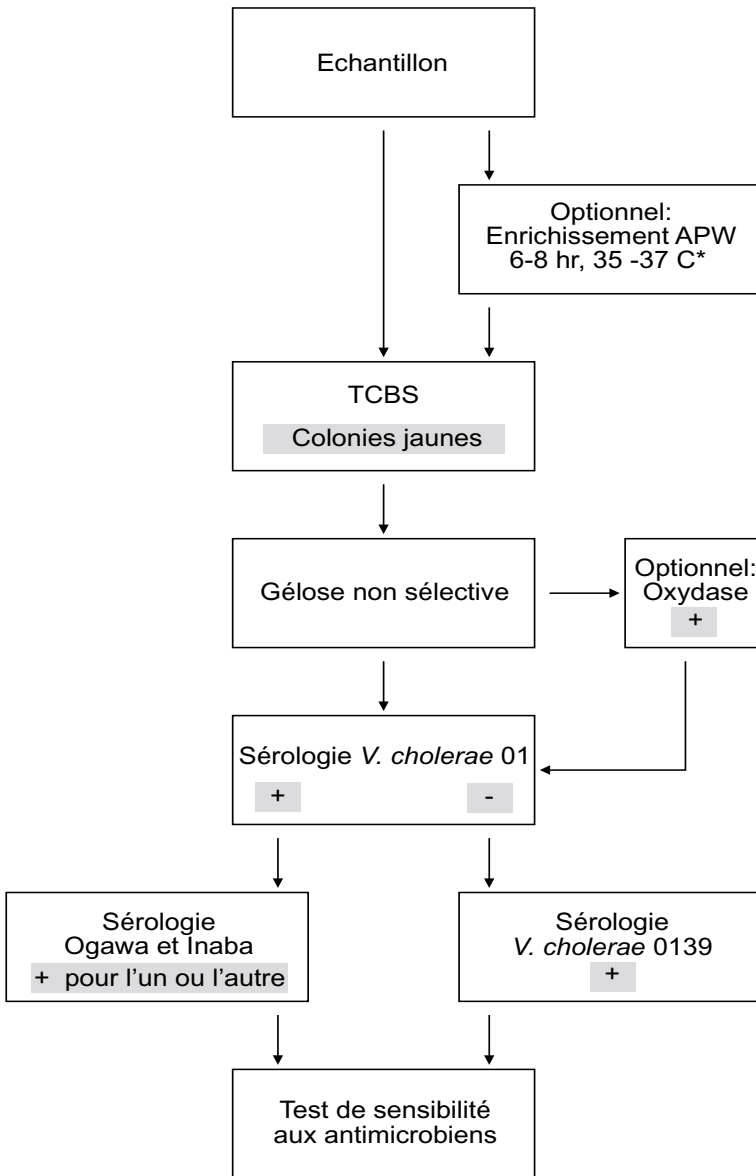
L'isolement et l'identification de *V. cholerae* O1 et O139 peuvent être améliorés si on dispose de laboratoires et de techniques de pointe. Les méthodes présentées ici sont de nature à économiser les ressources et permettent aux techniciens de laboratoire de choisir dans une certaine mesure le protocole et les milieux. Les laboratoires qui ne disposent pas de ressources suffisantes pour adopter les méthodes décrites ici et dans les chapitres suivants ne doivent pas essayer d'isoler et d'identifier ces pathogènes. Ils doivent envoyer les échantillons ou les souches à d'autres laboratoires qui ont l'habitude de réaliser les procédures en question.

A. Méthodes d'isolement

Avant 1992, sur les quelques 150 sérogroupes de *V. cholerae* qui ont été identifiés, seul le séro groupe O1 était associé au choléra épidémique et pandémique. Mais à la fin de 1992 et au début de 1993, on signalait des flambées de cas de choléra imputables à un séro groupe nouvellement décrit, O139, en Inde et au Bangladesh. Cette souche, de même que celles du séro groupe O1 de *V. cholerae*, produit de la toxine cholérique. Les caractéristiques culturelles et biochimiques de ces deux sérogroupes sont identiques. Les deux doivent être identifiés par un antiserum spécifique. L'Annexe A donne une liste du matériel et des réactifs nécessaires pour la confirmation en laboratoire et le test de la sensibilité aux agents antimicrobiens de *V. cholerae*.

Bien que *V. cholerae* se développe dans beaucoup de milieux communs, l'isolement dans les échantillons de selles se fera plus facilement à l'aide de milieux spécifiques. L'eau peptonée alcaline (APW) est recommandée comme bouillon d'enrichissement et la gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS) est le milieu sélectif de choix (Figure 6-1). Dans certains cas (par exemple, quand le patient se trouve aux premiers stades de la maladie), il peut s'avérer nécessaire d'enrichir les échantillons et/ou d'utiliser des géloses sélectives. Mais le bouillon d'enrichissement et le milieu sélectif devront toujours être utilisés avec des patients convalescents, en cas d'infections asymptomatiques soupçonnées, avec des échantillons environnementaux et quand il existe un nombre élevé d'organismes compétitifs susceptibles de se trouver dans l'échantillon.

Veillez consulter la section C « Milieux et réactifs pour *V. cholerae* » avant de préparer ces milieux car des préparations incorrectes peuvent affecter les réactions des organismes. Le chapitre 11 traite des méthodes de contrôle de qualité des milieux de culture choisis et des antisérums.



* Si on ne peut étaler l'APW en stries après 6 à 8 heures d'incubation, repiquer après 18 heures dans un tube d'APW, incuber pendant 6 à 8 heures et repiquer ensuite en stries sur une gélose TCBS

Figure 6-1. Procédure d'identification de *V. cholerae* O1 et O139 dans les échantillons de selles

1. Enrichissement dans l'eau peptonée alcaline (APW)

L'enrichissement dans l'eau peptonée alcaline peut faciliter l'isolement de *V. cholerae* quand peu de micro-organismes sont présents, comme par exemple lors d'échantillons provenant de patients convalescents ou de porteurs asymptomatiques. *Vibrio* spp. se développe très rapidement dans APW et sera présent au bout de 6 à 8 heures en quantité plus importante que les organismes n'appartenant pas au genre *Vibrio*.

L'APW peut être ensemencée avec des selles liquides, une suspension fécale ou avec un écouvillon rectal. L'inoculum de selles ne doit pas représenter plus de 10% du volume du bouillon. Incuber le tube, bouchon dévissé, à une température comprise entre 35 et 37°C, pendant 6 à 8 heures. Après cette durée d'incubation, repiquer une ou plusieurs anses de l'APW sur une gélose TCBS en prélevant à la surface du milieu liquide car les vibrions ont tendance à se développer dans la partie supérieure du milieu. Ne pas mélanger ou agiter le tube avant de repiquer. Si le bouillon ne peut pas être repiqué sur gélose après 6 à 8 heures d'incubation, repiquer quelques gouttes après 18 heures dans un tube d'APW. Repiquer ce second tube sur un milieu solide au bout de 6 à 8 heures d'incubation (Figure 6-1).

2. Isolement avec la gélose sélective TCBS

La gélose TCBS est disponible dans le commerce. Elle est facile à préparer, ne demande pas de stérilisation à l'autoclave et elle est très différentielle et sélective (voir section C). La culture sur ce milieu ne convient pas pour la réaction d'agglutination avec les sérums anti-*V. cholerae* O1 et anti-*V. cholerae* O139.

Inoculation du TCBS

La Figure 6-1 présente la procédure d'isolement de *V. cholerae* dans les échantillons de selles. Inoculer la gélose TCBS comme décrit au chapitre 4 (Figure 4-2). Après 18 à 24 heures d'incubation à une température de 35 à 37°C, la quantité et le type de culture (fermentant le saccharose ou ne le fermentant pas) sur la gélose TCBS devront être notés sur les fiches de données (Figure 6-2). Les colonies soupçonnées d'appartenir à l'espèce *V. cholerae* apparaîtront sur la gélose TCBS sous la forme de petites colonies d'un diamètre de 2 à 4 mm (Figure 6-3). La couleur jaune provient de la fermentation du saccharose dans le milieu. Des organismes ne le fermentant pas tel que *V. parahaemolyticus* produisent des colonies vertes ou bleues-vertes.

Isolement des colonies suspectes de V. cholerae

Choisir au minimum une colonie de chaque type fermentant le saccharose à partir de la gélose TCBS et l'ensemencer sur la pente de la gélose d'infusion de cœur (HIA) ou d'un autre milieu non sélectif. Ne pas utiliser de gélose nutritive car elle n'a pas de sel ajouté et ne favorise pas une croissance optimale de *V. cholerae*. À l'aide d'une aiguille d'inoculation, toucher légèrement le centre même de la colonie. Éviter de prendre entièrement la colonie et de toucher la

Fiche de travail pour *V. cholerae*

NUMÉRO DE SPÉCIMEN	MILIEU	SAC+ ^a	SAC- ^b	COLONIE	OPTIONNEL			SÉROLOGIE SUR LAME			IDENTIFICATION	
					TEST OXYDASE	TEST DU FIL	GRAM ou ED	O1	INABA	OGAWA		O139
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								
	TCBS Direct			T1								
				T2								
				T3								
	APW-TCBS			AT1								
				AT2								
				AT3								

^a Sac + = colonies saccharose positives ^b Sac - = colonies saccharose négatives

Figure 6-2. Fiche de travail pour *V. cholerae*



Figure 6-3. Culture de *V. cholerae* sur un milieu d'isolement TCBS

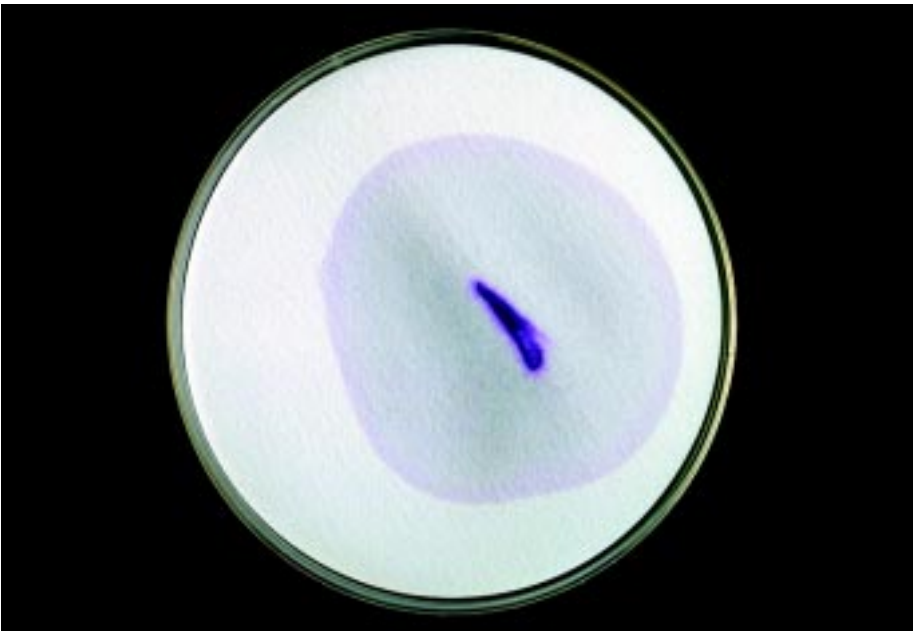


Figure 6-4 Test d'oxydase positif (voir ci-dessus) qui donne une couleur violette foncée en l'espace de 10 secondes. *V. cholerae* est positif à l'oxydase.

surface de la boîte. Cela évite de prendre des matières contaminantes pouvant se trouver sur la surface de la gélose. En cas de doute, ré-isoler la colonie suspecte en l'étalant par stries sur une autre gélose.

Incuber les géloses en pentes HIA à 35-37°C pendant une période maximum de 24 heures, cependant 6 heures peuvent suffire pour disposer d'une culture suffisante pour la réaction d'agglutination sur lame. Cette agglutination avec les sérums anti-O1 ou anti-O139 est suffisante pour l'identification présomptive. (Voir la section B ci-après pour une description de l'identification par séroagglutination.)

3. Tests de dépistage pour les isoléments suspects de *V. cholerae*

Généralement, pour les isoléments suspects de *V. cholerae* dans les échantillons de selles, il n'est pas nécessaire de procéder à des épreuves biochimiques avant de réaliser la réaction d'agglutination avec les sérums anti anti-O139. Mais si les réserves d'antisérums agglutinants sont limitées, le test de l'oxydase peut s'avérer utile pour une détection supplémentaire, avant l'agglutination des germes.

Test de l'oxydase

Faire le test de l'oxydase à partir d'une culture fraîche issue d'une gélose en pente HIA ou de toute autre milieu de culture ne contenant pas d'hydrate de carbone. Ne pas utiliser de culture provenant d'une gélose TCBS car des résultats faussement négatifs ou positifs peuvent être obtenus. Mettre 2 à 3 gouttes de réactif d'oxydase (1% de tétraméthyl-p-phénylénédiamine) sur un morceau de papier filtre placé dans une boîte de pétri. Étaler la culture sur le papier filtre imbibé avec une anse en platine (pas de nichrome), un applicateur en bois ou un cure-dent stérile. Dans le cas d'une réaction positive, la culture bactérienne devient immédiatement violet foncé (Figure 6-4). Les organismes négatifs à l'oxydase resteront incolores ou deviendront violets après 10 secondes. Il ne faut pas tenir compte des colorations apparaissant au-delà de ce temps. Les témoins positifs et négatifs seront testés en même temps. Des organismes du genre *Vibrio* (y compris *V. cholerae*, Tableau 6-1), *Neisseria*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* et *Alcaligenes* sont tous positifs à l'oxydase. Toutes les *Enterobacteriaceae* sont négatives à l'oxydase.

Tableau 6-1 Réaction de *V. cholerae* dans les tests de détection

Test de détection	Réactions de <i>V. cholerae</i>
Test de l'oxydase	Positive
String Test (fil)	Positive
KIA	K/A ^a (pente rouge/culot jaune)
TSI	A/A ^a (pente jaune/culot jaune)
LIA	K/K ^{a,b} (pente violette/culot violet)
Coloration de Gram	Petits bâtonnets recourbés à Gram négatif
Préparation à l'état frais	Petits bâtonnets recourbés avec mobilité en flèche

^a K = alcaline, A = acide

^b Réaction alcaline (violette) dans le culot du milieu indique une décarboxylation de lysine. Une réaction acide (jaune) dans le culot du milieu indique qu'il n'y a pas eu de décarboxylation de lysine.

Autres tests biochimiques de détection

La réaction du string test ou « fil », la gélose en pente au fer de Kligler (KIA) ou le milieu TSI (Triple sugar/iron/agar), la coloration de Gram ou l'examen à l'état frais sont des tests possibles pour un dépistage supplémentaire des souches avant l'agglutination avec les antisérums (Tableau 6.1). La valeur de ces tests doit être mesurée pour déterminer leur utilité avant de les appliquer régulièrement. Voir section C pour des instructions sur la préparation de ces milieux de culture et les souches adéquates de contrôle de la qualité.

String test ou test du fil

Le string test, avec une culture fraîche à partir d'une gélose non sélective, est utile pour éliminer la présence de microorganismes n'appartenant pas au genre *Vibrio*, surtout *Aeromonas* spp. Le string test peut être réalisé sur une lame de microscope en verre ou dans une boîte de pétri en plastique avec une suspension bactérienne mélangée dans une goutte de solution aqueuse à 0,5% de désoxycholate de sodium. Si le résultat est positif, les cellules bactériennes sont lysées par le désoxycholate de sodium, la suspension perd immédiatement son aspect trouble et l'ADN est libérée par les cellules lysées causant un aspect visqueux au mélange. Il se forme un « fil » mucoïde quand l'anse d'inoculation est retirée lentement de la suspension (Figure 6-5). La plupart des *Vibrio* (y compris *V. cholerae*, Tableau 6-1) sont positifs alors que les souches d'*Aeromonas* sont généralement négatives. D'autres *Vibrio* spp. peuvent avoir une réaction positive ou faible au string test.

La gélose en pente au fer de Kligler (KIA) et le milieu TSI (triple sugar/iron/agar)

La gélose en pente au fer de Kligler (KIA) et le milieu TSI (triple sugar/iron/agar) peuvent être utilisés pour éliminer *Pseudomonas* spp. et certaines *Enterobacteri-*

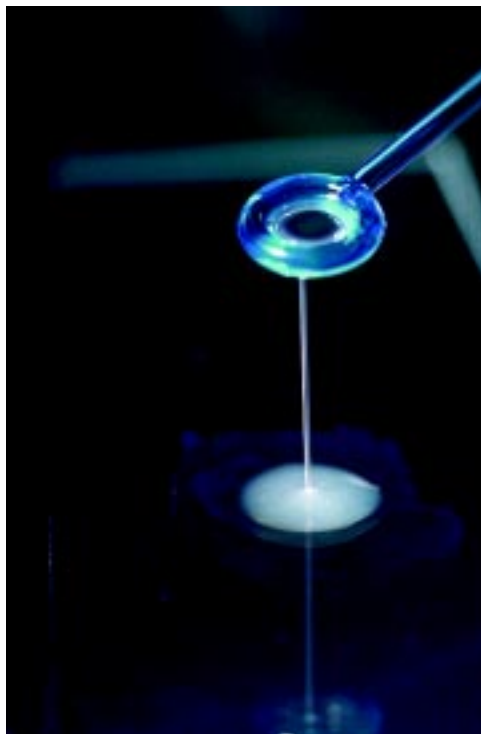


Figure 6-5. String test positif avec *V. cholerae*

aceae. Les réactions de *V. cholerae* sur KIA qui contient du glucose et du lactose sont identiques à celles des *Enterobacteriaceae* ne fermentant pas le lactose (pente alcaline (rouge), culot acide (jaune), pas de gaz, pas de H₂S) (voir Tableau 6-1 et Figure 6-6). Le milieu TSI qui contient du saccharose en plus du glucose et du lactose donne des réactions de type A/A (pente alcaline, culot acide), sans gaz, ni H₂S.

Inoculer les pentes des géloses KIA ou TSI en piquant le culot et en ensemençant en stries la surface du milieu. Incuber à une température comprise entre 35 et 37°C et les examiner après 18-24 heures. Les bouchons de chaque tube ne doivent pas être serrés à fond pendant l'incubation, et cela est particulièrement important pour les pentes KIA ou TSI. Lorsque les bouchons sont trop serrés, des conditions anaérobies apparaissent dans le tube de KIA ou TSI, et les réactions caractéristiques de *V. cholerae* risquent de ne pas se produire. Il en résultera alors une réaction inexacte.

Gélose de lysine au fer (LIA)

La gélose de lysine au fer (LIA) est utile pour détecter *Aeromonas* et certains *Vibrio* spp. qui, contrairement à *V. cholerae*, ne provoquent pas de décarboxylation de la lysine. Ensemencer la gélose LIA en piquant le culot puis

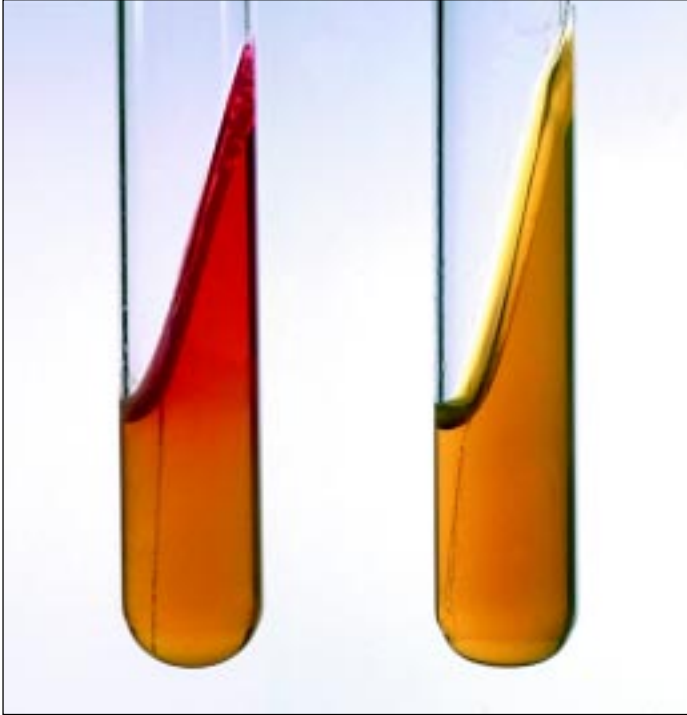


Figure 6-6. Réactions de *V. cholerae* dans une gélose en pente au fer de Kligler (gauche) et dans un milieu TSI ou triple sugar/iron/agar (droite)

en réalisant des stries sur la pente. Après une incubation de 18 à 24 heures à une température entre 35 et 37°C, examiner les géloses LIA pour rechercher les réactions typiques de *V. cholerae*. Des organismes qui produisent une lysine-décarboxylase sur LIA entraînent une réaction alcaline (couleur violette) dans le culot du tube (Voir chapitre 4, Figure 4-11). Les organismes sans l'enzyme produisent souvent une couleur jaune (acide) dans le culot du tube. La production d'hydrogène sulfuré est indiquée par un noircissement du milieu. Avec *V. cholerae*, la gélose LIA présente en général une pente alcaline (violette), un culot alcalin (violet), une absence de gaz et d'H₂S (Tableau 6-1). *Proteus* et *Providencia* spp. produiront souvent une pente rouge causée par la désamination de la lysine.

Il est important que les milieux KIA, TSI et LIA soient préparés de sorte que les tubes aient un culot profond et une longue pente. En effet si le culot n'est pas assez profond, des réactions erronées seront obtenues dans ces milieux. Dans la gélose LIA, la décarboxylation de la lysine ne se fait que dans des conditions anaérobies et une réaction faussement négative peut survenir si le milieu est présent en quantité insuffisante dans le tube (section C).

Coloration de Gram

L'examen de la culture d'une pente HIA par la coloration de Gram montrera de petits bâtonnets recourbés à Gram négatif (Tableau 6-1). La coloration au cristal violet est une technique plus rapide et montrera quand même la morphologie des cellules qui sont très typiques de *Vibrio* spp.

Examen direct

La microscopie sur fond noir et la microscopie en contraste de phase sont utilisées pour détecter des colonies suspectes d'appartenir à l'espèce *V. cholerae*. En utilisant ces techniques, des suspensions salines sont examinées au microscope pour détecter la présence d'organismes en petits bâtonnets recourbés de mobilité de type polaire en flèche (« étoile filante ») (Tableau 6-1).

B. Identification sérologique de *V. cholerae* O1 et O139

1. Identification de présomption utilisant les sérums anti-O1 et anti-O139

Une culture fraîche suspecte de *V. cholerae* dans un milieu gélosé non sélectif peut être testée avec un anti-sérum polyvalent anti-O1 ou anti-O139. Il ne faut pas faire de réaction d'agglutination à partir de cultures sur gélose TCBS car des réactions faussement négatives pourraient résulter. Généralement, après 5 à 6 heures d'incubation, la culture sur la surface de la gélose est suffisante pour faire une agglutination sur lame avec les antisérums. Sinon il faut à nouveau incuber. Si la réaction est négative avec l'antisérum O1, il faut tester l'antisérum O139. S'il est positif avec l'antisérum polyvalent O1, il faut le tester avec les antisérums monovalents anti-Ogawa et anti-Inaba. Une fois qu'une colonie prélevée sur une boîte de Pétri a été identifiée comme *V. cholerae* O1 ou O139, il n'est plus nécessaire de faire un test avec d'autres colonies de la même boîte.

2. Confirmation de *V. cholerae* O1 en utilisant les antisérums Inaba et Ogawa

Le sérotype O1 de *V. cholerae* est encore une fois divisé en trois sérotypes : Inaba, Ogawa et Hikojima (très rare). L'identification des sérotypes se fonde sur l'agglutination avec les antisérums spécifiques du sérotype (voir Tableau 6-2). L'identification de ces sérotypes n'est valide qu'avec les souches du sérotype O1. C'est la raison pour laquelle il est déconseillé d'utiliser les antisérums Inaba et Ogawa avec des souches qui sont négatives avec les antisérums polyvalents O1.

Les souches qui sont faiblement ou lentement agglutinés avec le sérum spécifique du sérotype O1 mais qui ne sont agglutinés ni avec le sérum anti-Inaba ni avec le sérum anti-Ogawa ne sont pas considérés comme appartenant au sérotype O1. Des souches d'un sérotype ont souvent une réaction croisée lente et faible avec le sérum spécifique de l'autre sérotype, suivant le degré d'absorption des antisérums spécifiques des sérotypes. Les réactions

d'agglutination avec les deux antisérums Inaba et Ogawa devront être examinés simultanément et la réaction la plus forte et la plus rapide indique le sérotype. Avec des antisérums pareillement absorbés, les souches qui sont agglutinées très fortement et de manière égale avec les deux antisérums Ogawa et Inaba sont extrêmement rares, tant est qu'elles soient jamais rencontrées. Si l'on soupçonne de telles réactions, il faut procéder à l'envoi de ces souches à un laboratoire de référence pour examen supplémentaire et seront appelés « sérotype possible Hikojima. »

Se référer au chapitre 11 pour une discussion sur le contrôle de qualité des antisérums.

Tableau 6-2. Sérotypes de *V. cholerae* séro groupe O1

Sérotypes	Agglutination par sérum absorbé	
	sérum anti-Ogawa	sérum anti-Inaba
Ogawa	+	-
Inaba	-	+
Hikojima	+	+

3. Réaction d'agglutination sur lame

Les tests d'agglutination pour les antigènes somatiques O de *V. cholerae* peuvent être réalisés dans une boîte de Pétri ou sur une lame propre. On utilise une anse ou une aiguille d'inoculation, un applicateur stérile ou encore un cure-dent stérile pour retirer une partie de la culture de la surface d'un KIA, TSI, de la gélose d'infusion de cœur (HIA) ou d'une autre gélose non sélective. Émulsionner la culture dans deux petites gouttes de sérum physiologique et bien mélanger. Ajouter une petite goutte d'antisérum à l'une des suspensions. Généralement, des volumes plus ou moins égaux d'antisérum et de suspension de la culture sont mélangés mais le volume de suspension peut être le double du volume de l'antisérum. Pour économiser l'antisérum, on peut utiliser des volumes aussi petits que 10 microlitres. Bien mélanger la suspension avec l'antisérum et incliner la lame alternativement d'un côté et de l'autre pour observer l'agglutination. Si la réaction est positive, des agglutinats vont apparaître dans un délai compris entre 30 secondes et une minute. Examiner attentivement la suspension saline pour vérifier qu'elle ne contient pas de grumeaux dus à un phénomène d'auto-agglutination. Si des grumeaux se forment, la culture est appelée rugueuse et il est impossible de la séro grouper.

4. Confirmation de *V. cholerae* O139

Un isolat suspecté *V. cholerae* qui réagit dans un sérum anti-O139 mais qui ne réagit pas avec un sérum anti-O1 polyvalent devra être envoyé à un laboratoire

de référence. La confirmation de *V. cholerae* O139 repose sur le test de production de l'entérotoxine cholérique et la vérification de l'antigène O139. Aucun sérotype n'a été identifié dans le séro groupe O139.

C. Milieux et réactifs pour *V. cholerae*

1. Eau peptonée alcaline (APW)

(Note : Il existe plusieurs formules publiées pour ce milieu.)

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Eau distillée	1 litre

Incorporer les ingrédients à l'eau et ajuster le pH à 8,5 avec une solution de NaOH 3N. Répartir en tube et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Conserver à 4°C pendant six mois en vérifiant que les bouchons sont serrés à fond pour éviter une baisse du pH.

Pour le contrôle de qualité, *V. cholerae* O1 devra fournir une bonne culture 6 à 8 heures après inoculation dans l'APW.

2. Gélose au fer de Kligler (KIA) et milieu TSI (Triple sugar/iron/agar)

(Note : Il existe plusieurs formulations déshydratées disponibles dans le commerce de KIA et de TSI. Ces milieux peuvent également être préparés à partir d'ingrédients séparés mais l'on risque d'avoir une variation entre les lots.)

Préparer selon les instructions du fabricant. Le volume de milieu doit être suffisant pour obtenir un culot profond et une pente longue. Mettre 6,5 ml de milieu dans des tubes de 16 x 125 mm possédant des bouchons hermétiquement fermés (les bouchons ne doivent pas être serrés à fond). Autoclaver. Les tubes doivent être préparés de façon à obtenir un culot de 3,5 cm et une pente de 2,5 cm. Serrer les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois.

La qualité de chaque nouveau lot doit être contrôlé avant l'utilisation. *E. coli* doit avoir une pente et un culot acides avec production de gaz mais pas de H₂S. *S. flexneri* doit avoir une pente alcaline, un culot acide sans production de gaz ni de H₂S. (Note : Certaines souches de *S. flexneri* 6 produisent du gaz.)

3. Gélose de lysine au fer

(Il existe plusieurs sociétés qui vendent du LIA déshydraté. LIA peut également être préparé à partir d'ingrédients séparés mais on risque d'avoir des variations entre les lots).

Préparer le milieu selon les instructions du fabricant. Mettre une certaine quantité de milieu dans le tube afin d'avoir un culot profond et une longue pente. Mettre par exemple 6,5 ml de culture dans des tubes de 16 x 125 mm avec des bouchons pouvant être vissés à fond (laisser les bouchons desserrés) et, après la

stérilisation à l'autoclave, laisser le milieu gélosé se solidifier de manière à avoir un culot de 3 cm et une pente de 2 cm de long. Une fois le milieu refroidi et solidifié, serrer les bouchons à fond et conserver à 4°C pendant 6 mois maximum.

Chaque nouveau lot de culture déshydratée doit être contrôlé avant l'utilisation. *S. flexneri* doit donner une pente alcaline et un culot acide, sans production de H₂S. Les souches de *Salmonella* produisant de l'H₂S doivent donner une pente alcaline et un culot alcalin avec noircissement du milieu imputable à H₂S. Les souches de *V. cholerae* sont positives à la lysine et produisent une réaction alcaline dans le culot de LIA.

4. Réactif de l'oxydase

Dichlorhydrate de <i>N, N, N', N'</i> -tétraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine	0,05 g
Eau distillée	5,0 ml

Dissoudre le réactif dans de l'eau purifiée (ne pas chauffer pour dissoudre). Préparer une solution fraîche tous les jours.

Des contrôles positifs et négatifs devraient être testés chaque fois que le réactif est préparé. *V. cholerae* est positif à l'oxydase et *E. coli* est négatif à l'oxydase.

5. Réactif de désoxycholate de sodium (0,5 %) pour le string test

Désoxycholate de sodium	0,5 g
Eau stérile distillée	100,0 ml

Ajouter de l'eau stérile distillée au désoxycholate de sodium et bien mélanger. Conserver à température ambiante pendant un maximum de 6 mois.

Chaque nouveau lot doit être contrôlé avant utilisation. La souche *V. cholerae* O1 doit être utilisée comme témoin positif. *E. coli*, comme souche de référence négative.

6. Gélose thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose (TCBS)

(Note : Il existe plusieurs marques différentes dans le commerce de gélose TCBS. Ce milieu peut être préparé avec des ingrédients séparés mais donnera des résultats bien plus variables qu'avec l'emploi d'une formulation déshydratée commerciale.)

Suivre les instructions du fabricant pour peser et réaliser la suspension du milieu déshydraté. Chauffer en agitant. Le milieu doit être entièrement dissous. Laisser refroidir la gélose dans un bain-marie réglé à 50-55°C avant de la couler dans des boîtes de Pétri. Laisser les couvercles ouverts pendant 20 minutes pour que la surface de la gélose puisse sécher. Fermer les couvercles et conserver les boîtes à 4°C pendant une semaine maximum.

Chaque nouveau lot devra être contrôlé avant utilisation car le TCBS a des variations de sélectivité en fonction du lot et de la marque. *V. cholerae* O1 donne

des colonies jaunes. *E. coli*, soit ne pousse pas, soit pousse faiblement en donnant de pauvres colonies translucides.

Références

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory methods for the diagnosis of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Georgie : CDC ; 1994.

Kay BA, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. Dans : Wachsmuth IK, Blake PA et Olsvik O, ed. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington, DC : ASM Press ; 1994 : 3-4. Worksheet.

McLaughlin JC. *Vibrio*. Dans : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC et Tenover FC, ed. Manual of clinical microbiology. Washington, DC : ASM Press ; 1995 : 465-476.

Organisation Mondiale de la Santé. Manuel pour l'étude au laboratoire des infections intestinales aiguës. Genève : Organisation Mondiale de la Santé ; 1987. Publication no. OMS/CDD/83.3 rev1.

Chapitre 7

Épidémiologie d'*E. coli* O157:H7

E. coli O157:H7 est un pathogène reconnu depuis peu comme étant responsable de dysenterie. La maladie est généralement une diarrhée sanglante, souvent sans fièvre importante, avec complication possible sous forme de syndrome hémolytique et urémique. On le trouve essentiellement dans les pays développés. Seule une épidémie confirmée a été retrouvée dans un pays en voie de développement—au Swaziland en 1992—quand 20 000 personnes ont été affectées par une flambée de cas importante. D'autres flambées de cas se sont produites, mais n'ont pas été confirmées.

Les principaux modes de transmission sont les suivants : viande bovine insuffisamment cuite, lait non pasteurisé ou aliments en contact avec la viande. Des flambées de cas transmis par l'eau ont été signalées au même titre que d'autres cas consécutifs à des baignades dans des lacs contaminés.

L'organisme produit des toxines identiques à celles qui sont produites par *Shigella dysenteriae* sérotype 1. Le traitement avec un agent antimicrobien ne s'est pas avéré utile pour endiguer l'évolution de l'infection par *E. coli* O157:H7. Ainsi, le traitement par antimicrobiens pourrait aggraver la situation. Vu qu'aucun traitement n'est recommandé, il n'est pas nécessaire de tester la sensibilité aux antimicrobiens des souches de *E. coli* O157:H7.

Les laboratoires doivent être informés de cet organisme et doivent faire des tests de détection périodiques dans les selles des patients atteints de diarrhée sanglante. Il n'est pas nécessaire d'examiner toutes les selles présentées au laboratoire pour détecter cet organisme. Il faut également le rechercher lors d'épidémies de dysenterie quand *Shigella* spp. n'est pas isolé dans les selles des patients souffrant de diarrhée sanglante. Les fournitures de laboratoire nécessaires pour le diagnostic de *E. coli* O157:H7 sont données en Annexe H.

Référence

Organisation Mondiale de la Santé. Prevention and control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Rapport d'une consultation de l'OMS. Genève, Suisse, 28 avril-1^{er} mai 1997. WHO/FSF/FOS/97.6.

Chapitre 8

Isolement et identification d'*E. coli* sérotype O157:H7

L'isolement et l'identification d'*E. coli* sérotype O157:H7 seront nettement meilleurs si on dispose de laboratoires et de techniques de pointe. Les méthodes présentées ici ont pour but d'économiser les ressources et permettent aux techniciens de laboratoire de choisir dans une certaine mesure le protocole et les milieux. Les laboratoires qui ne disposent pas de ressources suffisantes pour adopter les méthodes décrites ici et dans les chapitres suivants ne doivent pas essayer d'isoler et d'identifier ces pathogènes. Ils doivent de préférence envoyer les échantillons ou les isoléments à d'autres laboratoires qui ont l'habitude d'exécuter les procédures en question. Les fournitures de laboratoire nécessaires pour le diagnostic de *E. coli* O157:H7 sont données en Annexe H.

A. Méthodes d'isolement et d'identification

E. coli O157:H7 fermente rapidement le lactose et ne se distingue pas de la plupart des autres *E. coli* dans des milieux traditionnels contenant du lactose. Mais contrairement à environ 80% des autres *E. coli*, pratiquement toutes les souches de *E. coli* O157:H7 ne fermentent pas le D-sorbitol ou le fermentent lentement. La gélose MacConkey (SMAC) au sorbitol a été mise au point pour profiter de cette caractéristique en remplaçant le lactose par du sorbitol dans la gélose MacConkey et c'est le meilleur milieu pour l'isolement de *E. coli* O157:H7. Des colonies négatives au sorbitol apparaîtront incolores sur le SMAC (Figure 8-1).



Figure 8-1. Les colonies *E. coli* O157 sont incolores sur SMAC. Les colonies non *E. coli* O157 sont roses.

L'enrichissement d'*E. coli* O157:H7 n'est en principe pas nécessaire pour l'isolement d'organismes provenant de patients gravement malades.

La Figure 8-2 montre comment identifier *E. coli* O157:H7 à partir d'échantillons de selles. Inoculer SMAC selon le protocole décrit au chapitre 4 (Figure 4-2). Incuber de 8 à 24 heures à une température entre 35 et 37°C. Voir Figure 8-2 pour la procédure d'isolement de *E. coli* O157:H7. Après 18 à 24 heures d'incubation, la quantité et le type de culture (par exemple, sorbitol positif ou sorbitol négatif) sur SMAC doivent être notés sur des fiches de données pour les échantillons de chaque patient (Figure 8-3). Les colonies supposées être de l'*E. coli* O157:H7 se manifesteront sous forme de colonies incolores d'un diamètre de 2 à 3 mm (Figure 8-1).

Tester les colonies sorbitol négatives choisies sur une gélose SMAC avec un antisérum *E. coli* O157 ou des réactifs au latex (latex avec anticorps O157 et latex témoin) selon les procédures recommandées par le fabricant. Ces colonies suspectes peuvent être testées avec un antisérum directement à partir du SMAC ou bien repiquées sur un milieu non sélectif (HIA par exemple) et testées le lendemain (certains fabricants de réactifs O157 latex préconisent de tester seulement les colonies provenant directement de la gélose). Si les colonies sont testées directement à partir du SMAC, les colonies positives avec le sérum O157 doivent être transférées sur un autre milieu pour des tests ultérieurs. Une fois qu'une colonie d'une gélose a été identifiée comme positive pour O157, il n'est plus nécessaire de tester d'autres colonies de la même gélose.

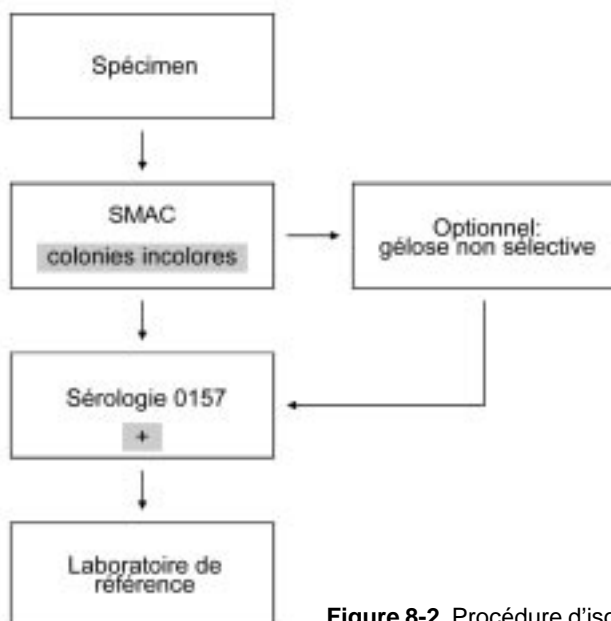


Figure 8-2. Procédure d'isolement d'*E. coli* O157 à partir des échantillons de selles

Fiche *E. coli* O157:H7

NUMÉRO DE SPÉCIMEN	MILIEU	SORBITOL -	SORBITOL +	COLONIE	SÉROLOGIE		IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE <i>E. Coli</i> OUI/NON	IDENTIFICATION PRESOMPTIVE
					LATEX O157	LATEX CONTRÔLE		
	SMAC			SM1				
				SM2				
				SM3				
	SMAC			SM1				
				SM2				
				SM3				
	SMAC			SM1				
				SM2				
				SM3				
	SMAC			SM1				
				SM2				
				SM3				
	SMAC			SM1				
				SM2				
				SM3				

Figure 8.3. Fiche *E. coli* O157:H7

Si on utilise des réactifs au latex O157, il est important de tester les souches avec le latex témoin pour détecter une agglutination non spécifique des organismes avec le latex. Les fabricants des réactifs au latex O157 recommandent de chauffer les souches qui agglutinent avec le latex témoin et le latex réactif et ensuite de les tester à nouveau avec les anticorps O157 et les réactifs du latex témoin. Toutefois, dans une étude qui a utilisé ce procédé, aucune des souches avec agglutination non spécifique n'a été identifiée par la suite comme *E. coli* O157:H7.

On doit envoyer les isollements positifs pour O157 pour confirmation à un laboratoire de référence. La confirmation de *E. coli* O157 consiste en l'identification des souches par l'étude des caractères biochimiques des *E. coli*, les souches de plusieurs espèces pouvant présenter une réaction croisée avec l'antisérum O157. L'identification de l'antigène flagellaire H7 est également nécessaire pour la confirmation. Lors de présence de souches qui sont non mobiles ou qui sont négatives pour l'antigène H7, la production de toxines Shiga devrait être recherchée, afin d'identifier les souches pathogènes. L'identification biochimique, le test de détection de l'antigène H7 et le test de la toxine Shiga sont disponibles dans les laboratoires de référence.

Il n'est pas nécessaire de tester la sensibilité aux agents antimicrobiens des souches *E. coli* O157:H7 (voir chapitre 7).

B. Préparation et contrôle de qualité de la gélose sorbitol-MacConkey

Préparer suivant les instructions du fabricant. (Note : Il existe plusieurs marques disponibles dans le commerce de gélose de sorbitol-MacConkey. Ce milieu peut être préparé avec des ingrédients séparés mais on obtiendra des résultats bien plus variables que si l'on utilise une formulation déshydratée commerciale.) Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 50°C et verser dans des boîtes de Pétri. Laisser les couvercles légèrement ouverts pendant 20 minutes pour que la surface de la gélose puisse sécher. Fermer le couvercle et conserver à 4°C pendant un mois maximum. Si on veut conserver le milieu pendant plusieurs jours, mettre les tubes dans des sachets en plastique hermétiquement fermés afin que le milieu ne se dessèche pas.

E. coli devrait produire une culture bonne à excellente de colonies roses à rouges. *E. coli* O157:H7 devrait produire des colonies incolores.

Références

Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella* et *Salmonella*. Dans : Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, ed. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. Washington, DC : ASM Press ; 1999 : 459-47.

Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA, Barrett TJ. Overview of detection and subtyping methods. Dans : Kaper JB, O'Brien AD, ed. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington, DC : ASM Press ; 1998 : 331-356.

Chapitre 9

Sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en milieu gélosé)

La méthode de diffusion en milieu gélosé présentée dans ce chapitre a été standardisée par le Comité national des normes pour laboratoires cliniques (NCCLS) et elle est exécutée exactement comme l'indique le protocole ci-après. Elle peut prévoir avec certitude l'efficacité *in vivo* du médicament en question. Mais, tout changement dans la méthode risque de rendre les résultats non valables. C'est la raison pour laquelle, si les laboratoires manquent de ressources pour réaliser la procédure de diffusion en gélose exactement telle qu'elle est décrite, il leur est vivement conseillé d'envoyer les souches à d'autres laboratoires pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens.

A. Divers aspects à prendre en compte pour la méthode de diffusion en gélose

Dès lors que la résistance aux antimicrobiens augmente partout dans le monde, il devient de plus en plus important de suivre la résistance aux antimicrobiens de *Shigella* et *V. cholerae* O1 et O139. En revanche, comme le traitement par agents antimicrobiens de l'infection à *E. coli* O157 s'est montré inefficace et non sans risque, sauf dans des cas de cystite et de pyélonéphrite, la détermination du type de sensibilité aux antimicrobiens pour *E. coli* O157 n'est généralement pas très utile.

Voir les chapitres 3 et 5 pour un débat sur le choix des antimicrobiens pour le traitement de la dysenterie et du choléra. Les essais avec *Shigella*, *V. cholerae* et *E. coli* O157:H7 et certains antimicrobiens peuvent être à l'origine d'une mauvaise interprétation quand les résultats *in vitro* ne sont pas corrélés à l'activité *in vivo*. Par exemple, *Shigella* spp. est généralement sensible aux aminoglycosides (gentamicine, kanamycine, etc.) dans la méthode de diffusion en gélose mais le traitement avec ces médicaments n'est souvent pas efficace. Une concertation sur les caractéristiques spéciales pour le test de sensibilité de *V. cholerae* est présentée dans la section B ci-après. Le tableau 9-1 indique les antimicrobiens proposés pour le test de résistance de *Shigella* et de *V. cholerae*.

B. Procédure de diffusion en gélose

La Figure 9-1 reprend la méthode de diffusion en gélose pour le test de sensibilité. Les fournitures de laboratoire nécessaires pour cette méthode pour *Shigella* et *V. cholerae* sont indiquées dans les Annexes A et B.

1. Gélose de Mueller-Hinton

La gélose de Mueller-Hinton est le seul milieu de culture solide pour l'étude de sensibilité qui ait été validé par le NCCLS. Il est recommandé de toujours utiliser la gélose Mueller-Hinton pour les épreuves de diffusion en gélose, en fonction

des directives internationales et du NCCLS. Étant donné que la manière dont la gélose Mueller-Hinton est préparée peut affecter les résultats de la procédure de diffusion par disque, il est très important de se reporter à la section C ci-après pour des instructions sur la préparation et le contrôle de qualité de ce milieu.

Tableau 9-1 : Antimicrobiens proposés pour le test de sensibilité de *Shigella* et *V. cholerae* O1 et O139

Antimicrobiens pour <i>Shigella</i>	Antimicrobiens pour <i>V. cholerae</i>
Sulfaméthoxazole-triméthoprim	Sulfaméthoxazole-triméthoprim
Chloramphénicol	Chloramphénicol
Ampicilline	Furazolidone
Acide nalidixique ^a	Tétracycline ^b

^a Si résistant à l'acide nalidixique, tester avec ciprofloxacine.

^b Les résultats du disque de tétracycline sont utilisés pour prédire également la sensibilité à la doxycycline.

2. Préparation du standard de turbidité McFarland

Un standard de McFarland 0,5 doit être préparé et un contrôle de la qualité sera effectué avant de commencer le test de sensibilité (voir section C). S'il est hermétiquement fermé et gardé dans le noir, le standard peut être conservé pendant 6 mois. Le standard McFarland est utilisé pour ajuster la turbidité de l'inoculum pour le test de sensibilité.

3. Préparation de l'inoculum

Chaque culture doit être ensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice (gélose au sang, gélose d'infusion de cœur et de cerveau ou gélose trypticase soja) pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à une température comprise entre 35 et 37°C, choisir 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse ou une aiguille d'inoculation et les transférer dans un tube de solution salée stérile (voir section C) ou dans un bouillon non sélectif (bouillon de Mueller-Hinton, bouillon d'infusion de cœur ou trypticase soja). Émulsionner une quantité suffisante de culture bactérienne dans la solution salée ou le bouillon pour que la turbidité avoisine celle du standard McFarland 0,5. Cette comparaison peut être faite plus facilement si les tubes sont observés contre une fiche de papier blanc avec lignes noires (voir Figures 9-2 et 9-3). Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de solution saline stérile ou de bouillon.

La méthode de culture peut aussi être utilisée pour préparer l'inoculum. Quatre ou cinq colonies issues de la culture développée pendant une nuit sur la gélose sont inoculées dans le bouillon (bouillon de Mueller-Hinton, infusion de cœur ou bouillon trypticase soja). Incuber le bouillon à 35°C jusqu'à ce qu'il devienne trouble et ensuite ajuster la turbidité à la bonne densité.

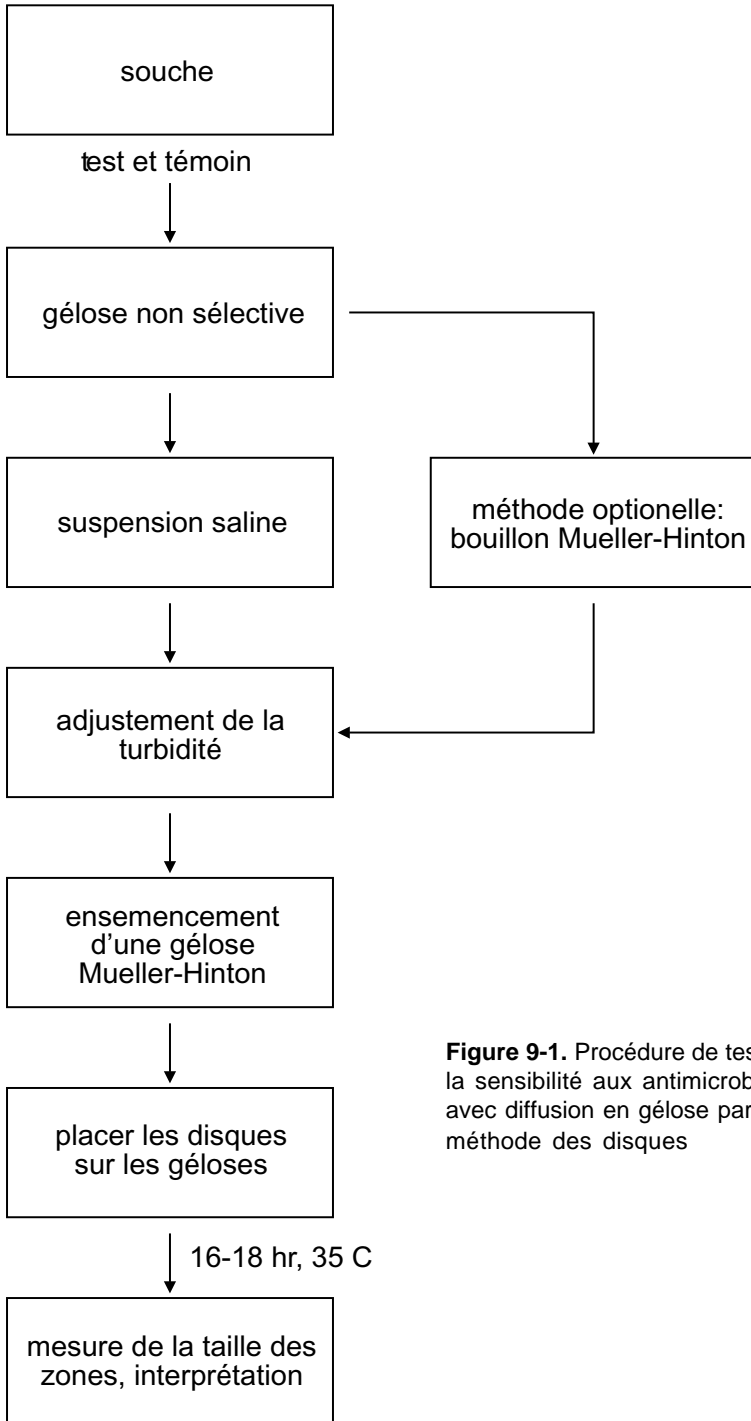


Figure 9-1. Procédure de test de la sensibilité aux antimicrobiens avec diffusion en gélose par la méthode des disques

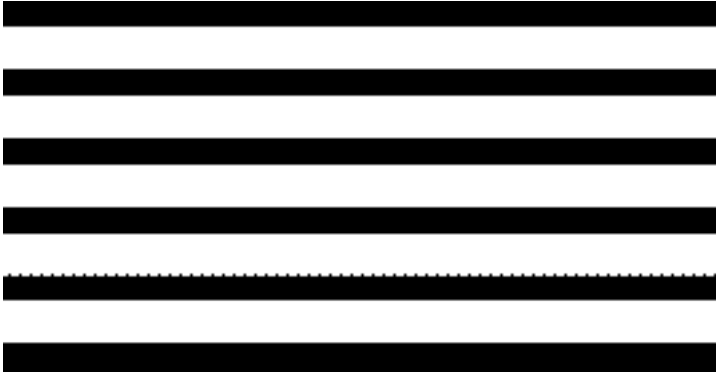


Figure 9-2. Lignes de fond pour voir la turbidité de l'inoculum



Figure 9-3. Comparaison de McFarland 0,5 avec la suspension de l'inoculum. De gauche à droite, les tubes sont le standard McFarland 0,5, *E. Coli* ATCC 25922 ajusté à la turbidité McFarland 0,5 et la solution saline non inoculée.

4. Procédure d'inoculation

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, tremper un écouvillon de coton dans la suspension. Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. (Figure 9.4). Enfin, écouvillonner partout autour du bord de la surface de la gélose.

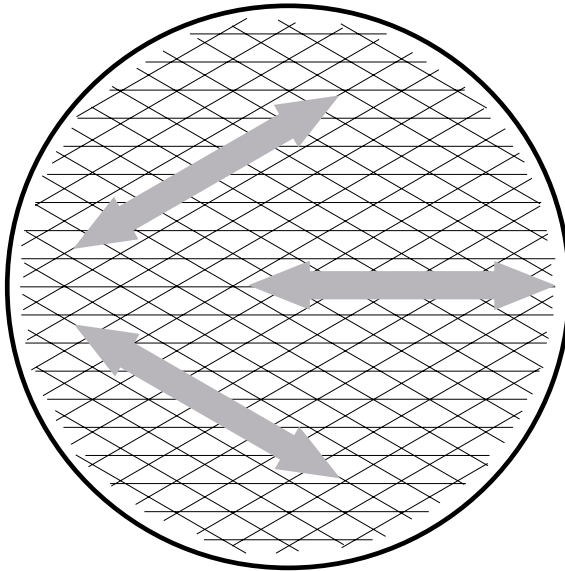


Figure 9-4. Plaque de Mueller-Hinton à ensemencer en stries avec l'écouvillon sur toute la surface du milieu à trois reprises en faisant tourner la boîte de Pétri d'un angle de 60°C après chaque application.

5. Disques imprégnés d'antibiotiques

Les réserves de disques imprégnés d'antibiotiques doivent être gardées au réfrigérateur (4°C). Une fois les disques retirés du réfrigérateur, laisser à température ambiante les récipients fermés pendant environ une heure pour permettre à la température de s'équilibrer. Cela limite la condensation qui se produit quand l'air entre en contact avec les disques. Si on utilise un distributeur, son couvercle doit fermer et parfaitement il doit être conservé au réfrigérateur. Il faut également le laisser se réchauffer à température ambiante avant l'utilisation.

Tableau 9-2. Normes d'interprétation des tailles des zones d'inhibition pour les *Enterobacteriaceae* avec des disques d'antimicrobiens choisis

Agent antimicrobien	Efficacité du disque (µg)	Diamètre de la zone (mm)			Limites de diamètre de la zone (mm) pour <i>E. coli</i> ATCC 25922
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	
Chloramphénicol ^{a,b}	30	≤12	13-17	≥18	21-27
Ampicilline ^a	10	≤13	14-16	≥17	16-22
Furazolidone ^c pour <i>V. cholerae</i>	100	<18	-	≥18	22-26
Sulfaméthoxazole-triméthoprim ^a	1.25 / 23.75	≤10	11-15	≥16	24-32
Tétracycline ^a	30	≤14	15-18	≥19	18-25
Ciprofloxacine ^{a,d}	5	≤15	16-20	≥21	30-40
Acide nalidixique ^a	30	≤13	14-18	≥19	22-28
Acide nalidixique ^c pour <i>V. cholerae</i>	30	<19	-	≥19	

^a Source : National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1998.

^b Utiliser ces résultats avec prudence car le test de diffusion en gélose par la méthode des disques peut mener à une mauvaise classification d'un grand nombre d'organismes (taux élevé d'erreurs mineures).

^c Critères d'interprétation fondés sur des études multicentriques. Les critères n'ont pas été établis pour *V. cholerae* par NCCLS.

^d Tailles des zones valides pour l'interprétation des résultats de diffusion en gélose par la méthode des disques pour *Shigella* et *Enterobacteriaceae*. Cependant, les tailles des zones pour *V. cholerae* n'ont pas été établis par NCCLS.

Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible mais pas plus de 15 minutes après l'inoculation. Placer les disques individuellement avec des pinces stériles ou avec un distributeur mécanique et les placer doucement contre la gélose. En général, il ne faut pas placer plus de 12 disques sur une boîte de 150 mm et pas plus de 4 disques sur une boîte de 100 mm. Cela évite le chevauchement des zones d'inhibition et une erreur possible de mesure. Certains antimicrobiens du disque diffusent presque immédiatement et par conséquent, une fois que le disque entre en contact avec la surface de la gélose, il ne doit plus être déplacé.

6. Lecture et interprétation des résultats

Une fois que les disques sont placés sur la gélose, il faut incuber la boîte à 35°C pendant 16 à 18 heures. Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) est mesuré en mm et noté (Figures 9-5, 9-6 et 9-7). Les mesures peuvent être prises avec une règle sur le fond de la boîte sans enlever le couvercle. Avec les sulfamides et le sulfaméthoxazole-triméthoprimine, un léger développement apparaît à l'intérieur de la zone d'inhibition. Dans ce cas, on ne tiendra pas compte de ce léger développement (inhibition 80%) et le diamètre de la zone sera mesuré dans les marges de développement important. Les zones d'inhibition doivent être comparées au tableau d'interprétation des tailles des zones (voir Tableau 9-2) et notées en fonction des catégories suivantes : sensible (S), intermédiaire (I) et résistant (R) pour chaque antibiotique testé.

Les colonies se développant dans la zone claire d'inhibition peuvent représenter des variants résistants ou un inoculum mixte. Pour ces colonies, il faudra également déterminer le diamètre d'inhibition qui sera obtenu en mesurant et en doublant la distance comprise entre les colonies les plus proches du disque et le centre du disque. Le diamètre de la zone claire extérieure doit également être mesuré et l'interprétation sera notée pour chaque diamètre. Les colonies à l'intérieur de la zone seront prélevées, ré-isolées, ré-identifiées et re-testées par l'épreuve de diffusion en gélose pour confirmer les résultats précédents. La présence de colonies dans une zone d'inhibition peut prédire une éventuelle résistance du microorganisme à cet agent.

7. Contrôle de qualité

Pour vérifier l'exactitude des résultats des tests de résistance, il est important d'inclure au moins une souche de référence (ATCC 25922 est la souche de référence *E. coli* utilisée pour le test de résistance des *Enterobacteriaceae*). Comparer les diamètres de zone obtenus pour ATCC 25922 avec les limites publiées par le NCCLS (voir Tableau 9-2 pour les diamètres des zones d'inhibition pour ATCC 25922). Si les zones observées avec les souches de référence sont en dehors des limites prévues, alors le technicien de laboratoire devra envisager les sources possibles d'erreur.

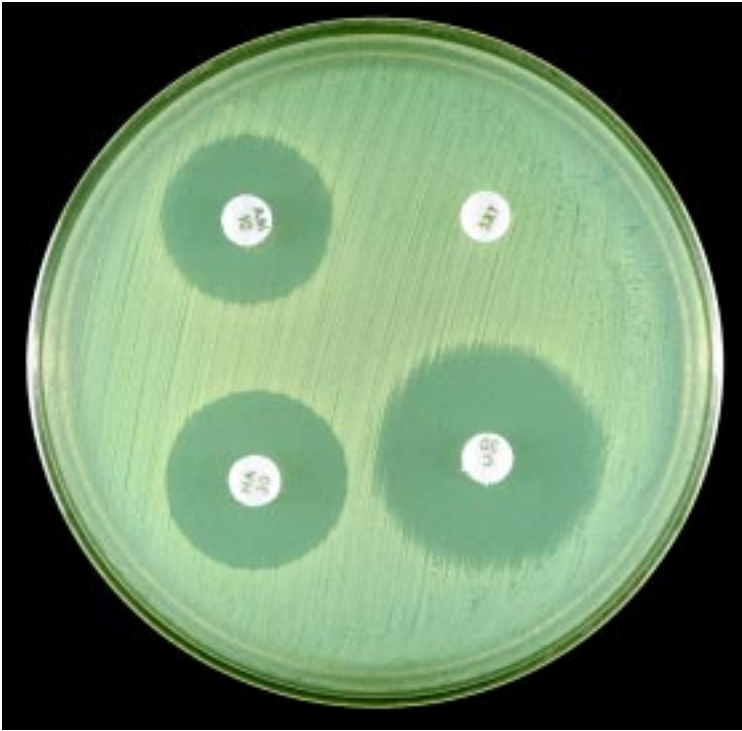


Figure 9-5. Résultats de la procédure de diffusion en gélose par la méthode des disques. Cet souche de *Shigella* est résistante au sulfaméthoxazole-triméthoprine et s'étend jusqu'au disque dont la zone est notée 6 mm.

Les tests de sensibilité sont affectés par des variations du milieu, la charge de l'inoculum, le temps d'incubation, la température et d'autres facteurs. Le milieu utilisé peut être une source d'erreur s'il n'est pas conforme aux directives recommandées par le NCCLS. Par exemple, une gélose contenant des quantités excessives de thymidine ou de thymine peut inverser les effets inhibitoires des sulfamides et du triméthoprine, d'où des zones d'inhibition plus petites et moins distinctes. Par conséquent, les organismes peuvent sembler résistants à ces médicaments alors qu'en fait, ils ne le sont pas. Si la profondeur de la gélose n'est pas de 3 à 4 mm ou si le pH n'est pas compris entre 7,2 et 7,4, la diffusion des agents antimicrobiens ou l'activité des médicaments peuvent être affectées.

Si l'inoculum n'est pas une culture pure ou s'il contient une concentration de bactéries qui n'est pas identique au standard de McFarland, les résultats du test de sensibilité seront affectés. Par exemple, un organisme résistant pourra apparaître sensible si l'inoculum est trop léger. De plus, si les colonies de la

V. cholerae - Résultats de la sensibilité aux antimicrobiens

DATE DE L'ÉPREUVE :					
NUMÉRO DE SPÉCIMEN	ORGANISME	TÉTRACYCLINE	FURAZOLIDONE	COTRIMOXAZOLE	CHLORAMPHÉNICOL
ATCC 25922					

Figure 9-6. Exemple de fiche pour noter les résultats de la procédure de diffusion en gélose par la méthode des disques pour *V. cholerae* O1 et O139

Shigella - Résultats de la sensibilité aux antimicrobiens

DATE DE L'ÉPREUVE :						
NUMÉRO DE SPÉCIMEN	ORGANISME	COTRIMOXAZOLE	CHLORAMPHÉNICOL	AMPICILLINE	ACIDE NALIDIXIQUE	CIPROFLOXACINE
ATCC 25922						

Figure 9-7. Exemple de fiche pour noter les résultats de la procédure de diffusion en gélose pour les souches de *Shigella*

gélose au sang sont utilisées pour préparer une suspension par la méthode directe d'inoculation, un effet antagoniste du triméthoprimé ou des sulfamides peut apparaître et il pourra se produire un développement des bactéries à l'intérieur des zones d'inhibition autour des disques de triméthoprimé-sulfaméthoxazole, alors qu'en fait les souches sont sensibles.

Conserver précieusement les disques imprégnés d'antibiotiques et ne pas les utiliser au-delà de la date de péremption indiquée. Une diminution de la taille de la zone d'inhibition autour de la souche de référence peut être le signe d'une baisse d'efficacité du disque.

De plus, tel que mentionné ci-dessus, le test de sensibilité de certaines bactéries à des agents antimicrobiens pourra donner des résultats induisant en erreur car les résultats *in vitro* ne correspondent pas forcément à l'activité *in vivo*. Les exemples en sont donnés avec les spectres étroits et larges des céphalosporines et des aminoglycosides testés contre *Shigella* spp. (voir chapitre 3) et l'érythromycine testée contre *V. cholerae* (voir section C ci-après).

C. Éléments particuliers dont on tiendra compte lors des tests de sensibilité de *V. cholerae*

La méthode de diffusion en gélose est la technique la plus couramment utilisée pour tester la sensibilité mais les critères d'interprétation de la zone pour *V. cholerae* O1 et O139 ont été uniquement établis pour la l'ampicilline, le chloramphénicol, les sulfonamides, la tétracycline et le sulfaméthoxazole-triméthoprimé. On s'est rendu compte que les résultats de la méthode par diffusion par disque ne sont pas exacts pour *V. cholerae* avec l'érythromycine et la doxycycline et il est donc préférable de ne pas tester ces agents avec cette méthode. Utiliser les résultats du disque de tétracycline pour prévoir la sensibilité à la doxycycline. Si elle est sensible à la tétracycline, la souche le sera également à la doxycycline. Il n'existe pas actuellement de méthode qui puisse déterminer exactement la sensibilité à l'érythromycine.

La fiabilité des résultats de la diffusion par disque pour d'autres antimicrobiens (ciprofloxacine, furazolidone et acide nalidixique) n'a pas été validée. La diffusion par disque peut être utilisée pour détecter la résistance à la ciprofloxacine en utilisant les critères d'interprétation pour *Enterobacteriaceae* comme normes provisoires des tailles de zone. Des limites préliminaires sont proposées pour l'épreuve avec le furazolidone et l'acide nalidixique pour *V. cholerae* (voir Tableau 9-2). Les résultats doivent être interprétés avec prudence quand on utilise la méthode de diffusion par disque pour ces antimicrobiens. Si les tailles des zones pour ces médicaments entrent dans la fourchette intermédiaire, elles doivent être interprétées comme pouvant être résistantes.

D. Préparation et contrôle de qualité des milieux et des réactifs

1. Gélose Mueller-Hinton

(Note : Il existe plusieurs formulations commerciales de la gélose Mueller-Hinton. Ce milieu ne devrait pas être préparé à partir d'ingrédients individuels car cela peut diminuer la qualité. La formule déshydratée de cette gélose que l'on trouve dans le commerce fait l'objet d'un contrôle attentif de la qualité avant d'être mis en vente.)

Préparer le milieu de Mueller-Hinton en suivant les instructions du fabricant. Après autoclavage, refroidir la gélose à 50°C, verser le milieu sur une épaisseur de 4 mm soit dans des boîtes de Pétri de 15 x 100 mm de diamètre (environ 25-30 ml par boîte) soit dans des boîtes de pétri de 15 x 150 mm de diamètre (environ 60-70 ml par boîte). Utiliser plus ou moins de gélose affectera les résultats de sensibilité. Si l'épaisseur de la gélose est supérieure à 4 mm, des souches pourront apparaître faussement résistantes. À l'inverse, avec une épaisseur de gélose inférieure à 4 mm, des souches pourront apparaître faussement sensibles.

Des boîtes de Pétri fraîchement préparées peuvent être utilisées le même jour ou conservées au réfrigérateur (2 à 8°C) pendant deux semaines. Si les boîtes de Pétri ne sont pas utilisées dans les 7 jours suivant la préparation, il faut les envelopper dans un sac en plastique pour minimiser les risques d'évaporation. Juste avant l'emploi, s'il existe une humidité excessive sur la surface, mettre les boîtes de Pétri dans un incubateur (35 à 37°C) jusqu'à ce que l'humidité s'évapore (généralement entre 10 et 30 minutes). Ne pas ouvrir les boîtes, car le milieu se contamine facilement.

Contrôler la qualité de chaque nouveau lot avant leur utilisation en faisant un test avec des souches standard d'*E. coli* ATCC 25922 et/ou de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ces dernières sont utilisées pour les tests d'*Enterobacteriaceae* et les aérobies Gram positives respectivement. Le pH de chaque nouveau lot de Mueller-Hinton devra se situer entre 7,2 et 7,4. S'il se trouve en dehors de cette fourchette, il ne faut pas ajuster le milieu pH en ajoutant de l'acide ou une base. Il faut jeter les boîtes de Pétri et en préparer de nouvelles. Si le pH de tous les lots est trop élevé ou trop faible, le lot entier de milieu déshydraté doit être renvoyé au fabricant.

2. Standards de turbidité (McFarland)

Les standards de turbidité McFarland 0,5 sont disponibles auprès de divers fabricants. Ou alors, on peut préparer une solution en ajoutant 0,5 ml de dihydrate de chlorure de baryum ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 1,175 % (p/v) à 99,5 ml d'acide sulfurique à 1 %. La solution est ensuite mise dans des tubes de test identiques à ceux qui ont été utilisés pour préparer la suspension de l'inoculum. Fermer hermétiquement avec de la cire ou de la paraffine ou tout autre moyen évitant l'évaporation. Réfrigérer ou conserver à température ambiante (22-25°C) dans

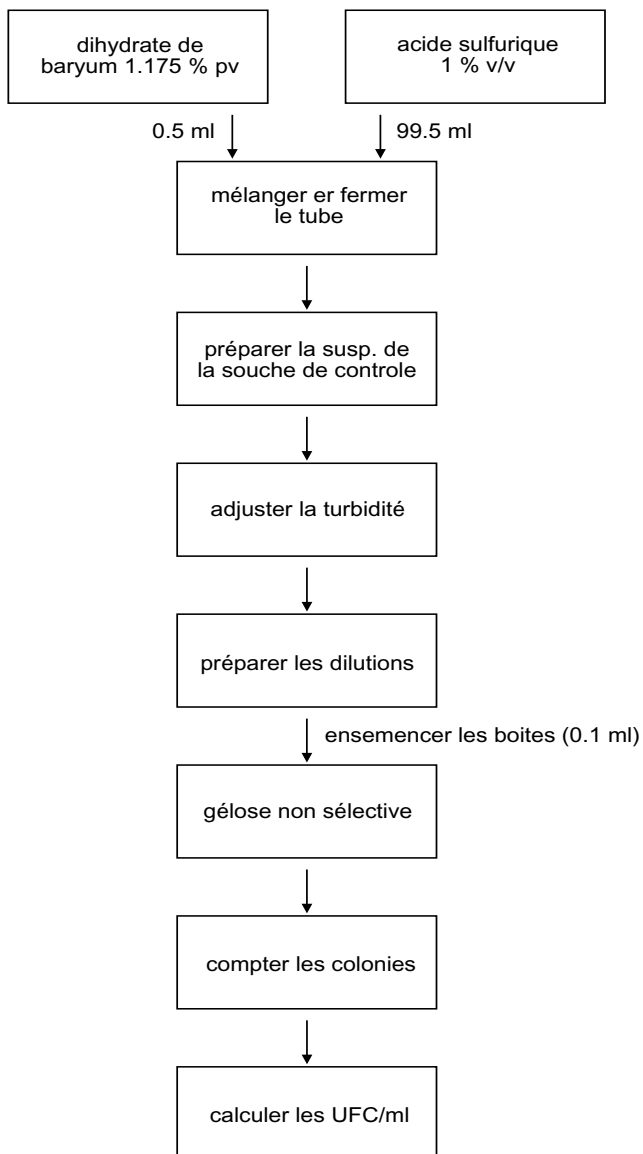


Figure 9-8. Procédure pour la préparation et le contrôle de qualité du standard McFarland 0,5

l'obscurité pendant 6 mois maximum. La jeter au-delà de ces 6 mois ou avant si le volume diminue. Bien agiter avant chaque emploi, en mélangeant le fin précipité de sulfate de baryum dans le tube.

Contrôler l'exactitude de la densité d'un standard préparé de McFarland en utilisant un spectrophotomètre avec un trajet optique de 1 cm. Pour le standard de McFarland 0,5, l'absorbance à une longueur d'onde de 625 nm devra être comprise entre 0,08 et 0,1. Ou bien, vérifier l'exactitude du standard de McFarland en ajustant une suspension de la souche de référence à la même turbidité, en préparant des dilutions successives de 10 en 10, et en faisant la même numération (voir Figure 6-8). La suspension ajustée devra contenir 10^8 unités formant colonies/ml (UFC/ml).

3. Solution salée physiologique

NaCl	8,5 grammes
Eau distillée	1 litre

Dissoudre NaCl dans de l'eau, chauffer si nécessaire. Peut être stérilisée à l'autoclave ou par filtration sur membrane. Stocker à température ambiante pendant 6 mois maximum avec les bouchons serrés à fond pour éviter l'évaporation.

Références

Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility tests : dilution and disk diffusion methods. Dans : Murray PR, Pfaller MA, Tenover FC, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, ed. Manual of clinical microbiology, 7th ed. Washington, DC : ASM Press ; 1999 : 1526-1543.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; ninth informational supplement. Wayne, Pennsylvania : NCCLS ; 1999 : document M100-S9, Vol. 19. No. 1, Table 21.

Chapitre 10

Conservation des isolements

Des cultures de *Shigella*, *V. cholerae* ou *E. coli* O157 resteront généralement viables pendant plusieurs jours dans un milieu solide à température ambiante (22 à 25°C) jusqu'à ce que le milieu ne sèche ou ne devienne acide. Mais si on veut garder les cultures au-delà de quelques jours, il faut les préparer correctement pour les conserver. Le choix de la méthode de conservation dépend de la durée pendant laquelle on veut garder les organismes ainsi que de l'équipement et des locaux de laboratoire dont on dispose.

A. Conservation de courte durée

La gélose au sang (BAB), la gélose Trypticase-soja (TSA) et la gélose d'infusion de cœur (HIA) sont des bons milieux de conservation des organismes entériques. Il ne faut jamais conserver les souches dans un milieu contenant des hydrates de carbone car les produits acides du métabolisme diminuent rapidement la viabilité. BAB, TSA ou HIA contiennent du NaCl, qui améliore la pousse de *V. cholerae*. Ne pas employer de gélose nutritive car elle n'a pas de sel ajouté.

Préparer le milieu de conservation et placer les tubes encore chauds en position inclinée de façon à obtenir une petite pente et un culot profond. Ensemencer le culot en piquant une ou deux fois puis ensemencer la pente en stries. Incuber une nuit à une température entre 35 et 37°C. Fermer hermétiquement les tubes avec des bouchons de liège trempés dans de la paraffine chaude ou avec des bouchons à vis bien serrés. Conserver à l'obscurité à une température comprise entre 22 à 25°C.

De l'huile minérale stérile peut aussi être utilisée pour prévenir le dessèchement des géloses en pente. Recouvrir les colonies de la pente avec une couche d'huile minérale stérile pour arriver 1 cm au-dessus de l'extrémité de la pente. Repiquer si nécessaire en raclant la culture sous la couche d'huile. Les souches maintenues pures de cette manière survivent généralement pendant plusieurs années.

B. Conservation de longue durée

Les cultures bactériennes peuvent être conservées congelées ou lyophilisées dans diverses suspensions préparées à cet effet. Il existe de nombreuses formulations de suspension mais en général on utilise le lait écrémé, un milieu à base de sérum ou le milieu de polyvinylpyrrolidone (PVP) pour la lyophilisation. Pour la congélation, on utilise un bouillon de lait écrémé ou de sang ou encore un bouillon trypticase-soja avec 15 à 20 % de glycérol.

Méthode de conservation par congélation (conservation à -70°C ou dans l'azote liquide à -196°C)

On peut conserver les souches indéfiniment si elles sont gardées à une température inférieure ou égale à -70°C. La conservation à -20°C n'est pas recommandée pour une période supérieure à 12 ou 18 mois car certains microorganismes perdront leur viabilité à cette température.

- Inoculer la pente d'un milieu TSA ou HIA (ou un autre milieu de culture non inhibiteur avec du sel) et laisser incuber une nuit entre 35 et 37°C.
- Récolter les bactéries sur la pente et faire une suspension dans un milieu de congélation.
- Répartir la suspension dans des cryotubes (tubes de congélation servant à la conservation à des températures très faibles). **Attention** : Ne pas utiliser des ampoules en verre pour congeler dans de l'azote liquide car elles peuvent exploser quand on les retire du container à azote.
- Préparer un bain de carboglace (glace sèche) en plaçant de la carboglace (CO₂ congelé) dans un récipient en métal étanche et assez grand pour contenir un portoir métallique à culture puis ajouter de l'alcool éthylique pour submerger environ la moitié du cryotube. Congeler rapidement la suspension en plaçant les cryotubes fermés dans le bain de carboglace. Transférer ensuite les cryotubes dans le congélateur. S'il n'y a pas de carboglace, un récipient d'alcool peut être placé dans le congélateur pendant une nuit puis utilisé pour congeler rapidement les cryotubes.

Mise en culture des souches congelées

- Placer les cultures congelées sur de la carboglace ou dans un bain d'alcool qui en contient et transférer sous une hotte de laboratoire ou sur un autre espace propre.
- A l'aide d'une anse stérile, racler la partie supérieure de la culture et la transférer dans le milieu en faisant attention à ne pas contaminer le haut ou l'intérieur du tube.
- Refermer la fiole avant que le contenu ne soit décongelé et la remettre au congélateur. Si l'on opère soigneusement, des prélèvements peuvent être effectués à plusieurs reprises à partir du même tube.

Lyophilisation

La plupart des organismes peuvent être conservés après lyophilisation. Pour cela, on retire l'eau des suspensions bactériennes congelées par voie de sublimation sous pression réduite. Il est préférable de conserver à 4°C les tubes lyophilisés.

Chapitre 11

Contrôle de qualité des milieux et réactifs

Chaque laboratoire doit s'assurer de la qualité des milieux et des réactifs qu'il utilise. Contrôler la qualité signifie choisir des matières premières satisfaisantes, préparer les milieux selon les formules approuvées ou les instructions du fabricant et utiliser des souches de référence parfaitement caractérisées pour vérifier le milieu préparé.

A. Contrôle de qualité des milieux

1. Aspects dont on tiendra compte pour le contrôle de qualité des milieux

Chaque lot de milieu préparé avec des ingrédients séparés ou chaque numéro de lot de milieu déshydraté doit être testé pour déterminer les caractéristiques suivantes :

- Stérilité
- Capacité à permettre la croissance du pathogène cible
- Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

Stérilité

Incuber un tube ou une boîte de Pétri de chaque lot de milieu passé à l'autoclave ou stérilisé au filtre pendant toute une nuit à 35 ou 37°C et l'examiner pour détecter les contaminants.

Capacité à permettre la croissance de l'organisme cible

- Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins une souche pour tester la capacité à permettre la croissance du pathogène ciblé (par exemple, pour la gélose MacConkey (MAC), une souche de *Shigella* telle que *S. flexneri*). Il faut également noter si cette souche produit les réactions biochimiques ou des couleurs adéquates sur le milieu (voir ci-après).

Capacité à produire des réactions biochimiques appropriées

- Pour des milieux sélectifs : utiliser au moins un pathogène et un non pathogène pour tester la capacité du milieu à faire la distinction entre les organismes ciblés et les organismes en compétition (par exemple, pour MAC, un organisme qui ne fermente pas le lactose tel que *S. flexneri* et un organisme qui le fermente tel que *E. coli*).
- Pour des milieux supports de réactions biochimiques : utiliser au moins un organisme qui produira une réaction positive et au moins un autre avec réaction négative (par exemple, pour le milieu à l'urée, un organisme producteur d'uréase tel que *Proteus* et un organisme non producteur d'uréase tel que *E. coli*).

2. Méthodes de contrôle de qualité du milieu

Lorsque l'on teste les capacités de croissance, on peut préparer une suspension diluée pour ensemercer le milieu et éviter ainsi l'utilisation d'un inoculum trop important. Un petit inoculum permet de s'assurer que le milieu permet la culture d'un petit nombre de bactéries provenant d'un échantillon. Voici un exemple de protocole pour le contrôle de qualité du milieu :

- La souche témoin est inoculée dans un bouillon non sélectif (gélose trypticase soja par exemple) et elle est cultivée pendant 24 heures.
- Afin de préparer un inoculum standard pour tester des milieux sélectifs et inhibiteurs, préparer une dilution au 1:10 d'une culture d'une nuit dans un bouillon non sélectif. Si l'on teste un milieu non sélectif, préparer une autre dilution au 1:10 (pour donner une dilution au 1:100 du bouillon).
- Un tube ou une gélose de chaque milieu doivent être inoculés avec l'inoculum standardisé de la souche témoin. Lorsqu'on teste des milieux sélectifs, il faut inoculer en même temps un milieu non sélectif tel que la gélose d'infusion de cœur, afin de pouvoir effectuer une comparaison.
- Les boîtes de Pétri serontensemencées en utilisant les dilutions au 1:10 ou au 1:100 préparées comme décrit plus haut (utiliser si possible une anse calibrée), puis mises en culture par stries. La même anse peut être utilisée pour tous les contrôles de la qualité ; à défaut d'utiliser une anse calibrée, il est important de toujours utiliser la même anse pour les ensemencements.

3. Sources des souches de contrôle de qualité

On peut obtenir des souches adéquates pour le contrôle de qualité de plusieurs manières. Un laboratoire peut utiliser des souches isolées d'échantillons cliniques ou d'échantillons d'assurance de qualité, à condition que les souches soient bien caractérisées par toutes les méthodes disponibles (biochimiques, morphologiques, sérologiques, moléculaires, etc.). Un grand nombre de laboratoires achètent des souches de contrôle de qualité auprès de collections officielles de cultures, telles que la collection nationale des cultures de types ou National Collection of Type Cultures (Public Health Laboratory Service, London NW9, England) ou la collection de cultures des États-Unis ou American Type Culture Collection (ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852). Les souches de contrôle de qualité peuvent aussi être achetées à des compagnies commerciales comme Lab M (Topley House, 52 Wash Lane, Bury, BL9 6AU, England).

B. Contrôle de qualité des réactifs

Comme pour les autres produits utilisés pour les tests, les réactifs, qu'ils soient achetés ou préparés au laboratoire, doivent porter une étiquette indiquant clairement la date à laquelle ils ont été ouverts pour la première fois ainsi que si possible la date de péremption. Chaque réactif doit être testé pour vérifier

l'obtention des réactions attendues. Si le réactif est un produit rare, cher ou encore difficile à obtenir comme par exemple les antisérums agglutinants, il n'est pas obligatoire de le jeter après la date de péremption. Si l'on peut vérifier que le réactif est encore suffisamment sensible ou spécifique après des procédures normales de contrôle de qualité, le laboratoire peut alors indiquer, sur l'étiquette du réactif, la date de vérification de la qualité du réactif. Tous les réactifs doivent faire l'objet à intervalle régulier d'un contrôle de qualité pour vérifier qu'aucune détérioration n'a eu lieu.

Contrôle de qualité des antisérums : méthode d'agglutination sur lame

Pour le contrôle de qualité de l'antisérum, utiliser deux souches ou plus (l'une positive et l'autre négative) pour tester leurs caractéristiques d'agglutination. Noter les résultats de toutes les réactions. Voir ci-après un exemple de procédure typique de contrôle de qualité.

- Déposer une goutte (environ 0,05 ml) de chaque antisérum sur une lame ou une boîte de Pétri. Déposer également une goutte de sérum physiologique à 0,85 % sur chaque lame ou boîte pour tester chaque souche et voir si elle est rugueuse ou autoagglutinable.
- Pour chaque souche témoin, préparer une suspension de turbidité dense (McFarland #2 ou 3, voir Tableau 11-1) en solution saline normale avec une culture de 18 à 24 heures récoltée de manière aseptique sur une gélose non sélective (par exemple, une gélose d'infusion de cœur ou une gélose trypticase soja).
- Ajouter une goutte de suspension bactérienne à l'antisérum et à la solution saline. Bien mélanger avec un applicateur, une tige en verre ou une anse d'inoculation. Faire basculer la lame d'avant en arrière pendant une minute.
- Lire la réaction d'agglutination à la lumière indirecte et sur fond noir. Pour que le test soit interprétable, le témoin en solution saline ne doit pas agglutiner.

Le degré d'agglutination doit être lu et noté de la manière suivante :

<u>Pourcentage d'agglutination</u>	<u>Noter la réaction de la manière suivante</u>
100	4+
75	3+
50	2+
25	1+
0	négatif

C. Avantages de l'acquisition centralisée des milieux et réactifs

L'acquisition centralisée des milieux et réactifs auprès d'un laboratoire de référence ou du Ministère de la Santé présente plusieurs avantages :

- Permet l'achat de grandes quantités d'un seul lot de milieux ou de réactifs pouvant ensuite être répartis en aliquots plus petits pour distribution aux laboratoires de province ou de districts. La mesure aussi efficace par rapport aux coûts (remises pour commandes importantes, baisse éventuelle des coûts d'expédition, moins de gaspillage dû aux produits périmés).
- Le contrôle de qualité sera plus efficacement réalisé dans le laboratoire central, évitant par là la duplication du contrôle avec les laboratoires de province ou de district. Si un milieu ou un réactif est jugé inadéquat, le lot sera retourné au fabricant avant même d'avoir été distribué aux autres laboratoires.
- La standardisation des méthodes entre les laboratoires de tous les niveaux est facilitée par l'utilisation d'un seul lot de milieux.

Tableau 11-1. Composition des standards de turbidité McFarland

Standard de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de baryum (1,175 %), en ml	Acide sulfurique (1 %), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries/ml
0,5	0,5	99,5	1 . 10 ⁸
1	0,1	9,9	3 . 10 ⁸
2	0,2	9,8	6 . 10 ⁸
3	0,3	9,7	9 . 10 ⁸
4	0,4	9,6	12 . 10 ⁸
5	0,5	9,5	15 . 10 ⁸
6	0,6	9,4	18 . 10 ⁸
7	0,7	9,3	21 . 10 ⁸
8	0,8	9,2	24 . 10 ⁸
9	0,9	9,1	27 . 10 ⁸
10	1	9,0	30 . 10 ⁸

Chapitre 12

Pratiques de sécurité standard dans le laboratoire de microbiologie

Le personnel de laboratoire travaillant en contact avec des agents infectieux peut contracter des infections par le biais d'accidents ou d'incidents ignorés. Le degré de risque dépend de la virulence de l'agent biologique concerné et de la résistance de l'hôte. Les infections contractées dans le laboratoire interviennent lorsque, par inadvertance, des germes sont avalés, inhalés ou introduits dans les tissus. L'ingestion accidentelle est le plus grand risque avec des pathogènes intestinaux comme *Shigella* et *E. coli* O157:H7. Les pratiques de bio-sécurité de niveau 2 (BSL-2) doivent être appliquées pour tout travail avec des organismes présentant des risques pour le personnel et l'environnement. Ces pratiques indiquent que :

- Le personnel de laboratoire dispose d'une formation spécifique sur la manipulation des agents pathogènes et travaille sous la direction de chercheurs compétents ;
- L'accès au laboratoire est limité lors de la réalisation des manipulations ;
- Des précautions extrêmes sont prises en ce qui concerne les objets pointus contaminés ;
- Certaines manipulations produisant des aérosols infectieux ou des risques d'éclaboussures sont effectuées en utilisant des vêtements et un équipement de protection.

A. Pratiques de sécurité standard en microbiologie

Les directives de sécurité données ci-dessous s'appliquent à tous les laboratoires de microbiologie quelque soit le niveau de bio-sécurité.

Limiter l'accès au laboratoire

Mettre des pancartes ou signaux de type « biohasard » sur toutes les portes de laboratoire et sur tout l'équipement (incubateurs, hottes, réfrigérateurs, congélateurs) utilisé pour le travail de laboratoire. Ne pas faire entrer les enfants de moins de 12 ans et les animaux dans les laboratoires. Ces derniers doivent être fermés lorsqu'ils sont inutilisés. Tous les réfrigérateurs et congélateurs placés dans les couloirs doivent être fermés à clé.

Lavage des mains

Équiper chaque laboratoire d'un évier pour se laver les mains. Se laver souvent les mains est l'une des procédures les plus efficaces pour éviter de contracter des infections dans le laboratoire. Les mains doivent être lavées avec un savon bactéricide avant de sortir du laboratoire ou après avoir touché du matériel infectieux.

Repas

Il est interdit de manger, de boire ou de fumer dans les zones de travail. La nourriture doit être gardée à l'extérieur de la zone de travail dans des espaces prévus uniquement à cet effet. Ne pas laisser d'objets personnels tels que les sacs à main ou les lunettes sur les paillasses.

Prélèvement par la bouche avec la pipette

Tout pipetage par la bouche est strictement interdit. Utiliser une poire ou une propipette.

Objets pointus

Faire extrêmement attention avec des objets pointus contaminés, notamment les aiguilles et les seringues, les lames, les pipettes, les tubes capillaires et les bistouris. Jeter les objets pointus dans des récipients conçus à cet effet. Afin d'éviter les piqûres aux doigts, il ne faut pas chercher à plier ou à casser les aiguilles ou à les recapuchonner car c'est ainsi que l'on risque de se piquer les doigts. Les objets pointus non jetés doivent être mis dans un récipient clairement identifié afin de les décontaminer avant le nettoyage. Ne pas toucher de verre cassé directement avec la main mais l'enlever par des moyens mécaniques comme des brosses, pelle et balayette ou pinces.

Aérosols

Exécuter attentivement toutes les procédures pour éviter la création d'éclaboussures ou d'aérosols. Éviter les techniques qui ont tendance à produire des aérosols. Faire refroidir les anses et fils d'ensemencement en les tenant en l'air pendant 5 à 10 secondes avant de toucher les colonies ou le matériel clinique. Faire sécher à l'air chaud au-dessus du bec Bunsen les anses contenant du matériel infectieux avant de les passer à la flamme. Faire les opérations de centrifugation ou de vortex dans des récipients fermés. Utiliser de la gaze pour retirer les bouchons des échantillons de sang et placer de la gaze autour du bouchon des flacons d'hémoculture pour minimiser la production d'aérosol au moment de retirer l'aiguille. Ne jamais couper les aiguilles ou les ôter des seringues avant autoclavage. Centrifuger les liquides biologiques uniquement dans des plots comportant des bouchons de sécurité.

Pendant les procédures où il existe un grand risque de créer des aérosols infectieux ou lorsque l'on craint des éclaboussures ou pulvérisations de matériel infectieux ou dangereux, effectuer le travail en laboratoire dans un endroit sûr en se protégeant le visage (lunettes, masques ou autres moyens le protégeant). Il s'agit de toutes les opérations de centrifugation, mélange, agitation, traitement aux ultrasons, ouverture de récipients contenant du matériel infectieux dont la pression interne peut être différente des pressions ambiantes, inoculation à l'animal par le nez et collecte de tissus infectés sur des animaux ou des œufs. Il faut se protéger le visage en cas d'utilisation de concentrations élevées ou de grandes quantités d'agents infectieux.

Décontaminer le dessus des paillasses et des autres surfaces

Décontaminer régulièrement les surfaces des paillasses avec un désinfectant (désinfectant au phénol, hypochlorite de sodium à 1% (Javel) ou alcool à 70°C) après chaque manipulation d'agents infectieux ou d'échantillons cliniques, après une éclaboussure ou autre contamination avec un matériel infectieux. Les désinfectants doivent être présents sur les lieux de travail.

Évacuation du matériel contaminé

Les boîtes de Pétri, les tubes, les échantillons cliniques ou tout autre matériel contaminé, doivent être mis dans des récipients-poubelles placés près de chaque paillasse. Utiliser des boîtes spéciales pour les aiguilles et le verre contaminés pour minimiser le plus possible le risque de blessure. Éviter de trop remplir ces récipients. Porter précautionneusement les poubelles jusqu'à la laverie avant de les autoclaver.

Autoclave

Un autoclave doit être à disposition pour les laboratoires de niveau de biosécurité 2/3, il ne sera utilisé que par un personnel formé en la matière. Des tests de stérilité seront effectués régulièrement avec des bandes de spores ou autres indicateurs biologiques conçus à cet effet. Chaque autoclavage doit être suivi avec une bande sensible à la température, un thermographe ou d'autres moyens (par exemple des indicateurs biologiques).

Conduite générale au laboratoire

Garder toutes les zones du laboratoire bien propres et bien rangées. Il est inacceptable de faire une recherche biologique dans des locaux sales, poussiéreux, en désordre et encombrés. Les sols doivent être bien propres, sans entassement inutile et lavés avec un produit désinfectant et plus particulièrement après tout renversement de matériel infectieux.

Réfrigérateurs et congélateurs

Les réfrigérateurs et congélateurs doivent être inspectés régulièrement pour être sûr qu'ils ne contiennent pas de fioles ou de tubes cassés contenant des agents infectieux. Le matériel cassé doit être enlevé par une personne qui porte des gants et une blouse de protection. Nettoyer régulièrement les réfrigérateurs et les congélateurs avec un désinfectant et les décongeler pour éviter toute contamination possible ainsi qu'une remontée de la température.

Prévention des incendies

Garder tous les becs Bunsen à l'abri des lampes et des produits inflammables, les réserves de produits inflammables doivent être placées dans un lieu sûr. On peut conserver des petites quantités de ces produits inflammables dans des récipients sûrs (par exemple, l'acétate d'éthyle, l'alcool éthylique et le méthanol). Éteindre les becs Bunsen quand on ne les utilise pas. Connaître

l'emplacement des extincteurs et des douches. Les instructions à suivre en cas d'incendie et les voies d'évacuation doivent être affichées.

B. Pratiques spéciales

Transport du matériel bio-dangereux

Le transport du matériel bio-dangereux d'un établissement à un autre augmente le risque de casse ou de fuites. Observer les directives suivantes si le transport est nécessaire : le récipient primaire des agents infectieux (quelle que soit sa taille) doit être placé dans un second récipient incassable et pouvant être fermé hermétiquement (avec un bouchon que l'on peut visser ou avec un sac en plastique).

Désinfectants

Les organismes ont des sensibilités différentes aux divers désinfectants. Comme désinfectant de surface, l'alcool à 70° est généralement actif contre les entérobactéries, mais d'autres organismes sont plus résistants. Cependant, l'alcool à 70° n'est pas le désinfectant de choix pour décontaminer lors d'une fuite ou lorsque l'on a renversé un liquide contaminé. Les désinfectants phénoliques, bien que chers, sont généralement actifs contre beaucoup d'organismes. Toujours lire la notice d'utilisation ou les recommandations du fabricant pour les dilutions et le temps d'action, spécialement pour des organismes recommandant des normes de biosécurité de type 3 (comme les mycobactéries par exemple). L'hypochlorite de sodium à 1% (eau de Javel) constitue un bon désinfectant. A cette dilution, on peut l'utiliser sur les surfaces des paillasses, les hottes et tout autre matériel. Une dilution au 1:10 (10%) est corrosive et ronge le métal. Ne pas utiliser régulièrement la dilution de 10% mais l'employer pour nettoyer tout déversement de matériel infectieux en cas de forte contamination. **Préparer quotidiennement les dilutions d'hypochlorite de sodium.**

Décontamination en cas de déversement

La procédure suivante est recommandée lors des déversements : isoler les lieux afin que personne n'entre. Porter des gants et des habits de protection (blouse ou autre revêtement, masque si le déversement peut contenir un agent respiratoire ou si l'agent est inconnu). Éponger ou recouvrir le déversement avec des serviettes absorbantes. Saturer les serviettes avec un désinfectant adapté, dilué en quantité adéquate. Laisser les serviettes ainsi imbibées sur la surface pendant 15 minutes au minimum. Frotter la zone en utilisant des serviettes imbibées puis laisser sécher la zone. Placer ensuite les serviettes dans un récipient destiné au matériel contaminé. Elles doivent être traitées de la même manière que tout autre déchet infectieux.

Accidents

Toute blessure ou accident inhabituel doit être rapporté immédiatement au superviseur du laboratoire. Lorsqu'une piqûre ou une coupure a eu lieu avec des aiguilles ou autre matériel potentiellement contaminé, laver la blessure avec un savon désinfectant et de l'eau. Dans le cas d'un accident de centrifugation, quand des portoirs de sécurité n'ont pas été utilisés, prévenir les autres personnes du laboratoire afin d'éviter la zone puis en informer le superviseur.

C. Habits et équipement de protection

Blouses de laboratoire

Porter des blouses ou des uniformes de protection pendant que l'on travaille dans le laboratoire. Enlever ces vêtements de protection au moment de quitter le travail (ou la zone du laboratoire) et les laisser au laboratoire. Tous les vêtements de protection sont soit détruits au laboratoire soit nettoyés par l'institution. Ils ne doivent jamais être emportés à la maison par le personnel.

Gants

Quelque soit le type de matériel infectieux, porter des gants lors de l'exécution de procédures jugées dangereuses (par exemple, l'agglutination sur lame) quand il y a un risque d'éclaboussure ou de contamination de la peau ou encore quand le technicien de laboratoire a des coupures ou autres lésions sur la main. Les gants doivent toujours être portés lors du travail avec des échantillons cliniques, des liquides biologiques et des tissus humains ou animaux. Il faut partir du principe qu'ils peuvent être contaminés par le virus de l'hépatite B, du VIH, d'autres pathogènes transmis par le sang ou par *Mycobacterium tuberculosis*. Enlever les gants quand ils sont contaminés ou quand le travail avec le matériel infectieux est terminé. Ne pas porter les gants à l'extérieur du laboratoire. Ne pas utiliser le téléphone et ne pas ouvrir les portes avec des gants qui ont été utilisés pendant les manipulations de laboratoire. Jeter tous les gants utilisés avec le reste du matériel à usage unique destiné à être autoclavé. Les mains doivent être lavées juste après avoir enlevé les gants.

Protections

Toujours considérer les échantillons cliniques, les liquides biologiques et des tissus humains ou animaux comme potentiellement positifs pour le virus de l'hépatite B, le VIH, d'autres pathogènes transmis par le sang ou pour *Mycobacterium tuberculosis*. Ces échantillons devraient être manipulés dans des hottes de sécurité en se dotant de protections appropriées comme les lunettes, les gants, un masque ou tout autre moyen de protéger le visage des éclaboussures ou des aérosols.

Références

Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.
Biosafety in microbiology and biomedical laboratories. Washington, DC : US
Government Printing Office, stock numéro 017-040-00523-7.

Organisation Mondiale de la Santé. Laboratory biosafety manual, 2nd edition.
Genève : OMS ; 1993 : ISBN 92 4 154450 3.

Chapitre 13

Emballage et expédition d'échantillons cliniques ou d'agents étiologiques

A. Préparation d'échantillons infectieux et de cultures pour le transport

Le transport d'échantillons cliniques et d'agents étiologiques doit être fait soigneusement pour éviter au maximum les risques pour les personnes ou l'environnement ainsi que pour protéger la viabilité des pathogènes suspectés. Le transport des articles infectieux par les systèmes publics ou commerciaux de livraison doit être soumis à la réglementation locale ou internationale.

Si possible, envoyer les échantillons de manière à ce qu'ils arrivent pendant les heures de travail afin de permettre une manipulation correcte et un ensemencement immédiat des échantillons. Il est bon d'informer le laboratoire de destination aussi rapidement que possible de l'arrivée des échantillons, de préférence avant leur envoi.

Suivant les conditions locales, le transport dans le pays se fait soit par voie terrestre, soit par voie aérienne. Si les échantillons sont envoyés par un coursier, il doit connaître l'emplacement du laboratoire et la personne à contacter. L'expéditeur doit pré-identifier le moyen de transport le plus rapide et le plus fiable, que ce soit par bicyclette, par motocyclette, par ambulance ou transport public et il doit vérifier la disponibilité des fonds pour le carburant ou les frais de transport public. Pour les distances plus longues, le service de transport le plus rapide est le fret aérien ou des services de coursier rapide. Étant donné la durée limitée de la carboglace (de 24 à 48 heures seulement), conclure des arrangements pour une collecte immédiate à l'aéroport d'arrivée. Quand les échantillons sont envoyés par voie aérienne, les informations suivantes doivent être immédiatement communiquées au laboratoire récepteur : numéro de la lettre de transport aérien, numéro du vol et horaire et dates de départ et d'arrivée du vol.

B. Transport et expéditions des cultures et échantillons

1. Organismes de réglementation

Le Comité des Nations Unies des experts pour le transport des matières dangereuses recommande certaines procédures pour le transport des produits dangereux. L'Organisation de l'Aviation Civile Internationale (OACI) utilise ces recommandations pour déterminer les réglementations concernant le transport sans risques par avion de matières dangereuses. Les réglementations de l'Association du Transport Aérien International (IATA) indiquent toutes les instructions techniques de l'OACI pour le transport sans risques de ces matières. Mais l'IATA a d'autres exigences qui sont plus restrictives que celles de l'OACI. Les compagnies aériennes de l'IATA ont adopté l'utilisation des

réglementations de l'IATA pour le transport des articles dangereux et les expéditeurs doivent s'y conformer en complément de toute autre stipulation en la matière émanant du pays d'origine, de transit ou de destination.

Le transport par voie aérienne d'agents infectieux ou d'échantillons diagnostics doit être en conformité avec les réglementations locales, nationales et internationales. Ces dites réglementations pour le transport aérien international sont indiquées dans la publication de l'IATA intitulée « Dangerous Goods Regulations. » Cette référence est publiée une fois par an en janvier. Les réglementations peuvent changer d'une année à l'autre. Pour cela, il est bon d'obtenir un exemplaire des réglementations de l'IATA en anglais, en espagnol, en français ou en allemand auprès de l'un des bureaux régionaux indiqués ci-après :

Genève

IATA Centre,
Route de l'Aéroport 33
P.O. Box 416
15 - Airport
CH - 1215
Genève, Suisse
Tél : +41 22 799 2525
Fax : +41 22 798 3553

Montréal

IATA
800 Place Victoria
P.O. Box 113
Montréal, Québec, Canada
H4Z 1M1
Tél : +1 (514) 874-0202
Fax : +1 (514) 874-9632

Singapore

77 Robinson Road
#05-00 SIA Building
Singapore 068896
Tél : (65) 438-4555
Fax : (65) 438-4666

Commandes par Internet : sales@iata.org

Site Internet : www.iata.org

2. Réglementations pour le transport de substances infectieuses et d'échantillons cliniques/diagnostic

En général, tous les paquets qui sont envoyés par des transitaires commerciaux, par voie aérienne ou maritime, tels que Federal Express, sont soumis aux réglementations de l'IATA. Ces réglementations sont présentées ici comme des exemples de procédures d'emballage tolérées pour les substances infectieuses. Mais elles ne représentent peut-être pas les conditions actuelles de l'IATA pour l'emballage et l'étiquetage des substances infectieuses. Pour des informations à jour en la matière, merci de consulter les réglementations existantes au niveau national et l'édition actuelle de Dangerous Goods Regulations.

Définition d'une substance infectieuse

Les substances infectieuses sont définies comme des substances qui contiennent ou qui risquent de contenir des pathogènes. Les pathogènes sont des micro-organismes dont les parasites, les virus, les bactéries, les rickettsies et les champignons ou encore les micro-organismes recombinants, hybrides ou

mutants, dont on connaît ou dont on soupçonne la responsabilité dans des maladies infectieuses chez les humains ou les animaux.

Classement des échantillons cliniques et diagnostics

- Les échantillons (humains, animaux, nourriture, environnement) qu'on suppose contenir des pathogènes sont à présent classés comme substances infectieuses. Quand ces échantillons sont transportés, quelle que soit la raison, incluant le diagnostic initial ou la confirmation, on doit les emballer et les expédier comme des substances infectieuses.
- Les échantillons qui ont une faible probabilité de contenir des pathogènes sont classés comme des échantillons cliniques/diagnostics. Quand ces échantillons sont transportés pour des tests de routine pour détection ou un premier diagnostic autre que la détermination de la présence de pathogènes, on les emballe et on les expédie en tant qu'échantillons cliniques/diagnostics.
- Les échantillons que l'on connaît être dépourvus de pathogènes doivent être expédiés sans restrictions, ainsi le transport et l'emballage ne sont pas réglementés. Ils sont mis dans des récipients primaires imperméables et des récipients secondaires étanches.

Sauf s'il est spécifié qu'un échantillon clinique/diagnostique ne contient pas de pathogènes, on juge qu'il entre soit dans la catégorie de ceux pouvant contenir des pathogènes, soit dans ceux ayant une faible probabilité de contenir des pathogènes.

Directives pour l'emballage et l'étiquetage des substances infectieuses

Les personnes qui expédient des agents infectieux ou des échantillons diagnostiques doivent se conformer à toutes les réglementations locales et internationales se rapportant à l'emballage et à la manutention de ces articles. Ces personnes doivent vérifier que les échantillons arrivent à destination en bon état et qu'ils ne représentent aucun danger pour les personnes ou pour les animaux pendant le voyage.

L'emballage interne est le suivant :

- Un récipient intérieur primaire étanche (en verre, en métal ou en plastique fermé hermétiquement.) **Les boîtes de Pétri ne devront pas être expédiées.**
- Un récipient secondaire étanche et résistant aux chocs.
- Du matériel absorbant entre le récipient primaire et le récipient secondaire. Si de multiples récipients primaires sont placés dans un seul récipient secondaire, il faut les emballer individuellement pour éviter tout contact entre eux. Le matériel absorbant tel que la laine de coton doit être en quantité suffisante pour absorber le contenu entier de tous les récipients primaires.

- Une liste détaillée article par article doit être placée à l'intérieur entre l'emballage secondaire et l'emballage extérieur.

De multiples récipients primaires placés dans un seul emballage secondaire doivent être emballés individuellement, ou, pour des substances infectieuses transportées dans de l'azote liquide, séparées et conditionnées de telle façon qu'aucun contact entre elles ne soit possible. Il faut mettre suffisamment de matériel absorbant pour pouvoir absorber tout le contenu des emballages primaires.

L'emballage extérieur doit :

- Être suffisamment solide pour bien protéger le contenu ;
- Avoir une dimension externe dont la taille la plus petite est de 100 mm (4 inches) ;
- Porter une étiquette bien lisible et résistante à l'extérieur avec l'adresse et le numéro de téléphone de l'expéditeur. Une étiquette de mise en garde doit être apposée sur le récipient avec l'inscription suivante : « Substance infectieuse. En cas d'endommagement ou de fuites, en avertir immédiatement les autorités sanitaires publiques. » L'emballage des substances infectieuses doit être marqué avec les spécifications des Nations Unies prouvant que l'emballage a été testé et certifié pour le transport de substances infectieuses.

La Figure 13-1 indique ces recommandations d'emballage.

Directives pour l'emballage et l'étiquetage des échantillons cliniques/ diagnostiques non destinés à l'examen microbiologique

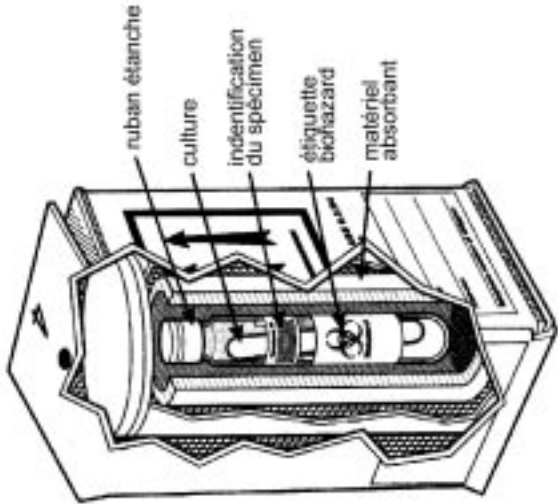
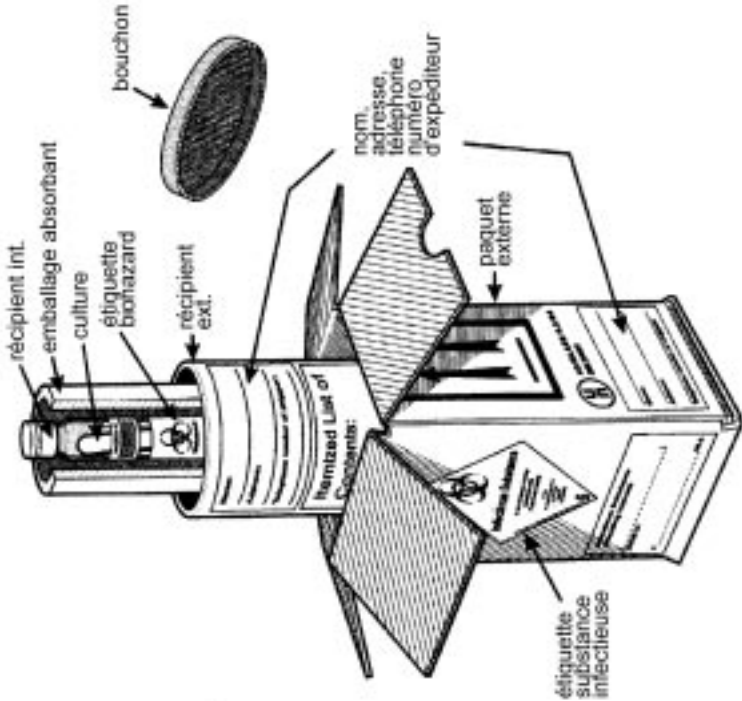
Emballer de la manière suivante les échantillons cliniques qui ne présentent guère de risque de contenir un agent infectieux et qui ne sont pas transportés pour être examinés à des fins de dépistage d'agents pathogènes :

- Avoir un triple emballage tel que décrit pour les agents infectieux ;
- Avoir un emballage qui est étanche après un test consistant à faire tomber le paquet depuis une hauteur de un mètre ;
- Mettre une étiquette stipulant « échantillons cliniques » à l'extérieur du paquet ou du conteneur ;
- Si le paquet est envoyé par avion, mettre les termes suivants « contenu ne faisant l'objet d'aucune restriction, emballé conformément à l'instruction 650 de l'IATA. »

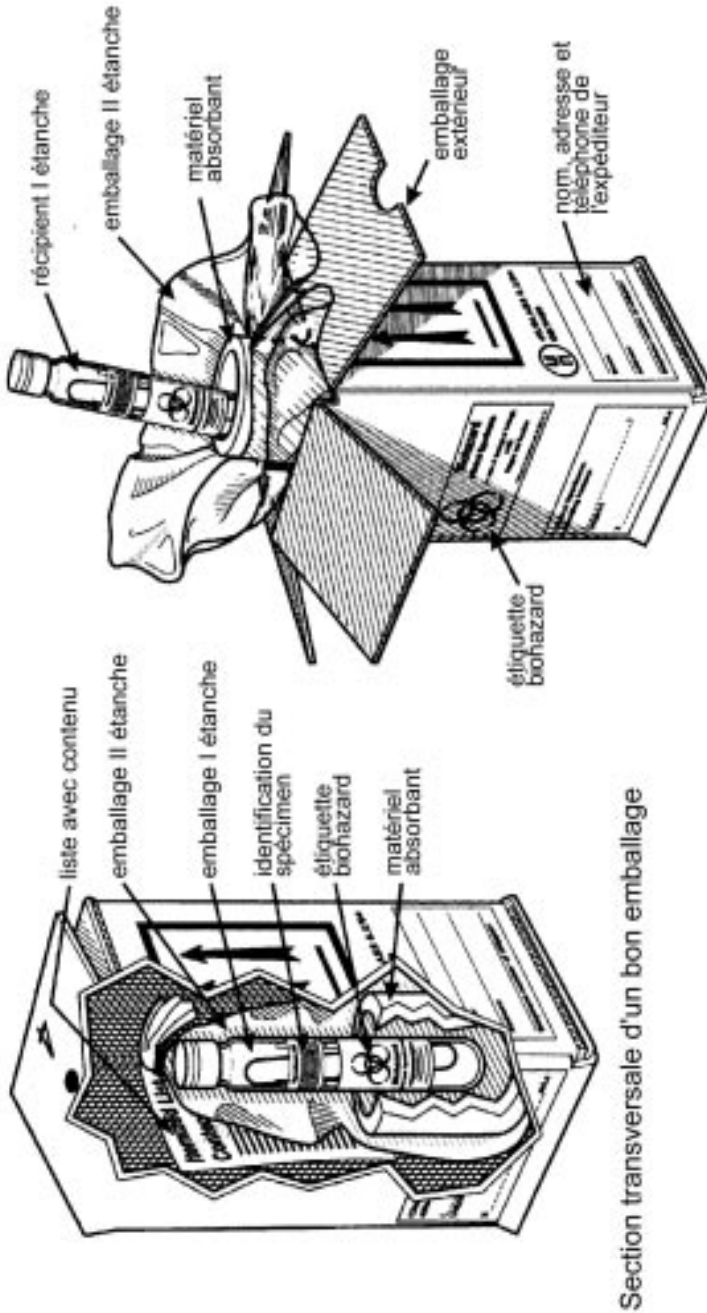
La Figure 13-2 indique ces recommandations d'emballage.

Référence

International Air Transport Association. Annual Publication. Dangerous Goods Regulations. Montréal, Québec, Canada : IATA Publications Office.



Section transversale d'un bon emballage



Section transversale d'un bon emballage

Figure 13-2. Emballage et étiquetage d'échantillons cliniques

Annexe A

Fournitures diagnostiques nécessaires pendant une année pour la confirmation de flambées de cas et la surveillance au laboratoire de la sensibilité de *Vibrio cholerae* O1/O139 aux agents antimicrobiens

Hypothèses :

- Équiper chaque district avec du matériel pour collecter et transporter 50 échantillons.
- Équiper chaque laboratoire régional pour le traitement de 100 échantillons.
- Équiper chaque laboratoire de référence pour confirmer 500 isollements.

Niveau district

Fournitures nécessaires pour chaque district

50 écouvillons en coton

50 milieux de transport de type Cary Blair en bouteilles ou en tubes

Transport des échantillons au laboratoire régional

Laboratoires régionaux

Fournitures nécessaires pour chaque laboratoire régional

100 écouvillons de coton ou de polyester stériles

500 g de milieu de Cary-Blair

500 g de milieu TCBS

25 g de désoxycholate de sodium

Lames en verre pour les agglutinations et le string test

5 g de chlorhydrate tétraméthyl-p-phénylènediamine

Papier filtre (oxydase)

Tiges en bois ou anses d'inoculation en platine pour l'oxydase

500 mg de gélose non sélective* (gélose trypticase-soja, gélose d'infusion de cœur et de cerveau)

4x2 ml d'antisérum polyvalent de diagnostic du choléra séro groupe O1

500 g de milieu de Bacto-peptone

500 g NaCl

NaOH

Papier pH ou pH mètre

500 boîtes de Pétri (9 cm)

1000 tubes de test (13 x 100 mm ou 16 x 125 mm)

Transport pour échantillons au laboratoire de référence

Matériel et timbres pour la production et la diffusion des rapports

* Ne pas utiliser de la gélose nutritive car certaines formulations n'ont pas de sel ajouté et ne permettent pas une croissance optimale de *V. cholerae*.

Laboratoires de référence

Fournitures nécessaires pour chaque laboratoire de référence à des fins de confirmation

5 x 100 écouvillons de coton ou de polyester stérile
5 x 500 g de milieu de Cary-Blair
5 x 500 g de milieu TCBS
5 x 25 g de désoxycholate de sodium
Lames de verre pour le « string test » et les sérologies
5 x 5 g de chlorhydrate tétraméthyl-p-phénylènediamine
Papier filtre
Tiges de bois ou anses d'inoculation en platine
5 x 500 mg de gélose non sélective* (gélose trypticase-soja, gélose d'infusion de cœur et de cerveau)
Antisérums pour le diagnostic
20 x 2 ml d'antisérum polyvalent de diagnostic du choléra séro groupe O1
5 x 2 ml d'antisérum de diagnostic du choléra séro groupe O139
Antisérum de diagnostic sérotype Ogawa 5 x 2 ml
Antisérum de diagnostic sérotype Inaba 5 x 2 ml
5 x 500 g de milieu de Bacto-peptone
5 x 500 g NaCl
NaOH
Papier pH ou pH mètre
5 x 500 boîtes de Pétri (9 cm)
5 x 1000 tubes de test (13 x 100 mm ou 16 x 125 mm)

Fournitures pour le test de sensibilité aux agents antimicrobiens (méthode de diffusion en gélose)

5 x 500 g de gélose de Mueller-Hinton
10 x 100 disques (2 cartouches) avec les antibiotiques suivants :

- triméthoprime-sulfaméthoxazole
- chloramphénicol
- furazolidone (si le furazolidone est envisagé pour le traitement du choléra)
- tétracycline

Escherichia coli ATCC 25922 souche de référence

Standard de turbidité 0,5 McFarland

Écouvillons de coton stériles

Solution saline stérile

Pincettes et alcool à 95 degrés pour passer les instruments à la flamme

Tableau des critères avec les tailles des zones d'inhibition

Matériel et timbres pour la production et la diffusion des rapports

* Ne pas utiliser de gélose nutritive car certaines formulations n'ont pas sel ajouté et ne permettent pas une croissance optimale de *V. cholerae*.

Annexe B

Fournitures de laboratoire pour l'isolement et l'identification présomptive de *Shigella dysenteriae* 1 pendant une flambée de cas

Hypothèses :

- Équiper chaque district de matériel pour collecter et transporter 50 échantillons.
- Équiper chaque laboratoire régional pour le traitement de 100 échantillons.
- Équiper chaque laboratoire de référence pour confirmer 500 isollements.

Niveau district (matériel pour collecter et transporter 50 échantillons)

Fournitures nécessaires pour chaque district

100 écouvillons de coton ou de polyester stériles
50 tubes de Cary-Blair ou autre milieu de transport
Transport des échantillons au laboratoire régional

Niveau régional (matériel pour traiter 100 échantillons)

Fournitures nécessaires pour chaque laboratoire régional

200 écouvillons de coton ou de polyester
100 tubes de Cary-Blair ou autre milieu de transport
500 milieux XLD
500 g de milieu MacConkey
500 g de gélose au fer de Kligler
500 g de milieu de mobilité
500 g de gélose non sélective, par exemple la gélose trypticase-soja ou la gélose d'infusion de cerveau

Antisérums pour le diagnostic :

- antisérum monovalent 4 x 2 ml *S. dysenteriae* sérotype 1 (pas le sérum polyvalent de groupe A)
- antisérum polyvalent 2 x 2 ml *S. flexneri* (groupe B)
- antisérum polyvalent 2 ml *S. sonnei* (groupe D)

Lames de verre pour sérologie

500 boîtes de Pétri jetables (9 cm)
1000 tubes de test jetables (13 x 100 mm ou 16 x 125 mm)
Transport des échantillons au laboratoire de référence
Matériel et timbres pour la production et diffusion de rapports

Laboratoire national de référence (matériel pour confirmer 500 isoléments)

Fournitures nécessaires pour chaque laboratoire de référence à des fins de confirmation

100 écouvillons de coton ou de polyester
5 x 500 g de Cary-Blair
5 x 500 g de milieu XLD
5 x 500 g milieu MacConkey
3 x 500 g de gélose au fer de Kligler
3 x 500 g de milieu de mobilité
3 x 500 g de gélose non sélective (gélose trypticase-soja, gélose d'infusion de cœur)

Antisérums pour le diagnostic :

- antisérum monovalent 20 x 2 ml *S. dysenteriae* sérotype 1 (pas le sérum polyvalent de groupe A)
- antisérum polyvalent 10 x 2 ml *S. flexneri* (groupe B)
- antisérum polyvalent 5 x 2 ml *S. sonnei* (groupe D)

Lames de verre pour sérologie

5 x 500 boîtes de Pétri jetables (9 cm)
5 x 1000 tubes de test jetables (13 x 100 mm ou 16 x 125 mm)

Fournitures pour les épreuves de sensibilité aux agents antimicrobiens pour 100 isoléments de Shigella

2 x 500 g de gélose Mueller-Hinton
200 boîtes de pétri (9 cm)
200 disques (2 cartouches) avec les antibiotiques suivants :
triméthoprim-sulfaméthoxazole
chloramphénicol
ampicilline
acide nalidixique
ciprofloxacine (une cartouche seulement)

Escherichia coli ATCC 25922 souches de référence

Standard de turbidité MacFarland 0,5

Écouvillons de coton stériles

Solution salée stérile

Pince et alcool à 95 degrés pour passer les instruments à la flamme

Tableau avec critères des tailles de zones d'inhibition

Matériel et timbres pour la production et diffusion de rapports

Annexe C

Directives pour la mise en place d'un réseau de laboratoires de santé publique pour la lutte contre le choléra

But

- Mettre en place un système de contrôle de routine pour confirmer la présence de *V. cholerae* O1 et O139.
- Suivre les profils de sensibilité aux antimicrobiens des souches de *V. cholerae* testés sur l'ensemble du pays.
- Fournir un retour d'informations pour mettre au point une politique de traitement à base d'antimicrobiens contre le choléra.

Généralités

Des données exactes sont nécessaires pour confirmer la présence de *V. cholerae* en cas de flambée de cas de diarrhées ressemblant au choléra. De plus, des données sur les profils de sensibilité aux agents antimicrobiens chez les souches de *V. cholerae* provenant de l'ensemble du pays sont nécessaires pour formuler une politique efficace de traitement à base d'agents antimicrobiens. On trouvera ci-après l'ébauche d'un système pouvant être mis en place grâce à des laboratoires régionaux et des laboratoires de référence chargés de ces activités. Les laboratoires des différents niveaux auront diverses responsabilités concernant la collecte et le transport des échantillons ainsi que l'identification et la confirmation des isoléments et le retour des informations et des résultats aux niveaux appropriés. Les rôles et les responsabilités de chaque niveau sont donnés ci-dessous ainsi que les produits de base nécessaires pour réaliser ces activités. Une liste complète des fournitures nécessaires se trouve en Annexe A.

A. Surveillance

La surveillance en laboratoire comprend deux parties :

- Confirmation initiale de l'épidémie
- Surveillance continue de la sensibilité aux antimicrobiens chez les souches de *V. cholerae*.

1. Confirmation initiale de la flambée de cas

Dans les régions où il n'existe pas de fréquentes flambées de cas, on soupçonnera le choléra si un patient âgé de plus de 5 ans est gravement déshydraté ou s'il meurt suite à une diarrhée aqueuse aiguë ou encore si on assiste soudainement à une augmentation du nombre quotidien de patients atteints de diarrhée aqueuse aiguë. Dans une telle situation, procéder à l'envoi de 5 à 10 échantillons de selles à un laboratoire régional en vue de la confirmation.

Les aspects spécifiques de la collecte et du transport des selles sont donnés au chapitre 2 et dans la publication de l'OMS intitulée « Directives pour la lutte contre le choléra. » Un exemple de fiche de données à faire parvenir avec l'échantillon de selles se trouve en Annexe F.

Une fois la flambée de cas confirmée, il n'est pas nécessaire d'obtenir d'autres échantillons de patients. Le diagnostic pour le traitement peut être fait en fonction de critères cliniques supplémentaires. En effet, le recueil et l'examen d'un nombre excessif d'échantillons de selles peuvent obérer les ressources d'un laboratoire.

Dans les régions où l'on sait que le choléra est présent, cette activité de confirmation de flambée de cas n'est pas nécessaire.

2. Surveillance de la sensibilité aux antimicrobiens chez les souches de *V. cholerae*

Les laboratoires régionaux des zones affectées par le choléra enverront trimestriellement 10 à 20 isollements de *V. cholerae* dans un laboratoire de référence pour déterminer le profil de résistance aux agents antimicrobiens. Les laboratoires des districts des régions touchées devraient envoyer suffisamment d'échantillons au laboratoire régional afin d'obtenir ce nombre pour l'envoyer au laboratoire de référence pour confirmation. Un échantillon représentatif des isollements provenant de chaque laboratoire de référence (10 à 20 au total) doit être envoyé périodiquement à un laboratoire de référence international pour confirmer le profil de résistance aux antimicrobiens et pour la réalisation d'études supplémentaires, par exemple, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ou d'autres études moléculaires. Des arrangements seront pris par le biais de l'OMS en vue d'envoyer régulièrement ces isollements à un laboratoire de référence international.

B. Rôles des laboratoires de district, régionaux et de référence

1. Niveau district

Quand une flambée de cas se déclenche, il faut la confirmer en collectant entre 5 à 10 échantillons de selles et en les envoyant au laboratoire régional pour confirmer la présence de *V. cholerae*. Le matériel de base nécessaire au niveau de district pour collecter les échantillons est le suivant :

- Milieu de transport Cary-blair (ou autre) dans des tubes
- Écouvillons stériles

Chaque district aura des fournitures suffisantes pour envoyer 50 échantillons de selles au laboratoire régional. Outre ses fournitures, le district aura besoin de trouver un moyen pour envoyer les échantillons au laboratoire régional.

2. Niveau régional

Le laboratoire régional recevra des échantillons des districts et procédera à l'isolement initial de *V. cholerae*. Chaque région aura des fournitures suffisantes pour identifier 100 isollements de *V. cholerae* et envoyer les isollements au laboratoire de référence afin de procéder à des tests supplémentaires. Le matériel de base nécessaire au niveau régional est le suivant :

- Milieu TCBS
- Eau peptonée alcaline
- Antisérum polyvalent *V. cholerae* O1
- Gélose d'infusion de cœur (HIA) ou autre milieu non sélectif
- Boîtes de Pétri
- Tubes de transport (HIA utilisé comme milieu de transport pour les isollements)

3. Niveau de référence

Le laboratoire régional enverra les souches à l'un des laboratoires de référence au niveau national pour confirmation et test de la sensibilité aux antimicrobiens. Les laboratoires de référence auront besoin de matériel suffisant pour confirmer au moins 500 isollements envoyés par le niveau régional sur l'ensemble de l'année. A cette fin, le matériel suivant est nécessaire :

- Milieu TCBS
- Eau peptonée alcaline
- Antisérum polyvalent pour le séro groupe O1 et O139 (*V. cholerae*)
- Antisérum pour l'identification du sérotype Ogawa
- Antisérum pour l'identification du sérotype Inaba
- Gélose d'infusion de cœur (HIA) ou autre gélose non sélective
- Boîtes de Pétri
- Tubes pour le transport et le stockage des isollements (milieu HIA utilisé pour cela)
- Fournitures pour le test de résistance aux antimicrobiens (voir Annexe B)

4. Envoi aux laboratoires de référence internationaux

Dans le cadre du processus de surveillance au laboratoire, envoyer périodiquement des isollements à un laboratoire de référence international pour confirmation des profils de sensibilité aux antimicrobiens. C'est particulièrement important si la souche démontre un profil de résistance aux agents antimicrobiens d'un caractère nouveau ou inhabituel. Des dispositions seront prises avec l'OMS pour envoyer de tels échantillons à un laboratoire de référence international et pour fournir un retour rapide d'informations sur les résultats.

5. Retour d'informations des résultats

Laboratoire régional au laboratoire de district, confirmation de la flambée de cas

Quand le laboratoire régional confirme la présence de *V. cholerae* O1 dans les échantillons de selles reçus du district, il contactera le district aussi rapidement que possible pour informer les autorités sanitaires que *V. cholerae* O1 a été identifié dans le district.

Laboratoires de référence aux laboratoires régionaux

Le laboratoire de référence enverra régulièrement les résultats des études faites sur les souches transmises par le laboratoire régional. Les résultats seront envoyés au laboratoire régional et au Ministère de la Santé. Il s'agit notamment des résultats des isollements envoyés pour confirmation des flambées de cas et de la surveillance routinière de *V. cholerae* faite tous les 3 mois. Ces résultats permettent de faire un contrôle interne de la qualité pour les laboratoires régionaux. De plus, de façon trimestrielle, les résultats des laboratoires de référence seront récapitulés et distribués aux laboratoires régionaux et aux personnes responsables au sein du Ministère qui les communiqueront aux autres parties concernées.

Laboratoire de référence international au laboratoire de référence

Le laboratoire de référence international fournira un retour régulier des résultats au laboratoire de référence national qui coordonne l'expédition des échantillons. Ces résultats seront partagés avec d'autres laboratoires de référence et permettront de faire un contrôle externe de la qualité pour l'identification de *V. cholerae* et pour déterminer la sensibilité aux antimicrobiens des souches de *V. cholerae*.

6. Éléments supplémentaires du réseau

Ce système peut être mis en place pour d'autres bactéries, par exemple celles qui sont à l'origine de la dysenterie. Par exemple, une enquête périodique des isollements de patients avec une diarrhée sanglante pourrait déterminer la prévalence de divers organismes causant la dysenterie et leurs profils de résistance aux antimicrobiens.

Annexe D

Laboratoires de référence internationaux

WHO Collaborating Centre for Research, Training and Control in Diarrhoeal Diseases
International Centre for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh (ICDDR,B)
G.P.O Box 128
Dhaka 100
BANGLADESH

WHO Collaborating Centre for Diarrhoeal Research and Training
National Institute of Cholera and Enteric Diseases
P-33, CIT Road Scheme XM
Beliaghata
P.O. Box 177
Calcutta 700 016
INDIA

WHO Collaborating Centre for Phage-Typing and Resistance of Enterobacteria
Central Public Health Laboratory
61 Colindale Avenue
London NW9 5HT
UK

International *Escherichia* and *Klebsiella* Centre (WHO)
Department of Clinical Microbiology
Statens Seruminstitut
Artillerivej 5, 2300 Copenhagen S
DENMARK

WHO Collaborating Centre for *Shigella*
National Reference Laboratory for *Escherichia coli* and *Shigella*
Foodborne and Diarrheal Diseases Laboratory Section
Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd., N.E., MS CO3
Atlanta, GA 30333
USA

WHO Collaborating Centre for Global Monitoring of Antimicrobial Resistant Bacteria
Nosocomial Pathogens Laboratory Branch
Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd. N.E., MS G-08
Atlanta, GA 30333
USA

Annexe D

National Reference Laboratory for *Vibrio Cholerae* O1 and O139
Epidemic Investigations and Surveillance Laboratory
Foodborne and Diarrheal Diseases Laboratory Section
Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd., N.E., MS C03
Atlanta, GA 30333
USA

Annexe E

Conception d'une étude en pour examiner la sensibilité aux agents antimicrobiens des organismes a l'origine de la diarrhée épidémique

Explication

Dans de nombreux endroits où sévissent le choléra et la dysenterie épidémique causée par Sd1, les ressources des laboratoire sont limitées. De plus, les caractéristiques de la population de patients sont telles qu'il faut commencer le traitement complet avec tel ou tel antimicrobien dès que le patient vient consulter. Le clinicien ne peut pas attendre les résultats du test. Souvent, le délai peut être d'une semaine pour obtenir les résultats nécessaires à l'identification du profil de sensibilité aux antimicrobiens.

Une des méthodes pour pallier ces problèmes, au niveau des tests de laboratoire, consiste à réaliser une étude afin de déterminer quels sont les organismes causant les diarrhées épidémiques ainsi que leurs profils de sensibilité. On utilise l'information pour choisir un agent antimicrobien approprié et pour formuler une politique de traitement en fonction du syndrome (par exemple, les patients avec dysenterie ou les patients avec une diarrhée aqueuse). Cette méthode permet de conserver les ressources et d'améliorer la prise en charge de la diarrhée.

Une description de la réalisation de cette étude est donnée ci-dessous. Le modèle devra être adapté aux conditions locales. Il est important que le laboratoire et le département d'épidémiologie travaillent ensemble dans le cadre d'études de ce type. Cela encourage la coopération, le partage des tâches et amène une expertise complémentaire.

Méthodes

Emplacement

L'étude doit être faite dans des lieux représentatifs de la population. Il faut inclure des centres de santé urbains et ruraux. Choisir des endroits facilement accessibles pour que les échantillons puissent être transportés rapidement au laboratoire qui en fait l'étude. De plus, les centres devront avoir un nombre suffisant de patients souffrant de diarrhée pour que l'agent de santé puisse collecter 10 à 20 échantillons par jour.

Durée

Si possible, effectuer cette étude au début de la saison du choléra ou de la dysenterie afin d'avoir un nombre adéquat de patients ayant une diarrhée, et, pour que l'information acquise aide à établir des consignes de traitement et donc l'achat des médicaments pour l'année à venir.

Nombre de patients

Des prélèvements doivent être faits sur un nombre suffisant de patients afin d'obtenir 40 à 50 isolements. Les taux d'isolement vont de 25 % à 75 %. Aussi, un bon objectif est d'arriver à 100 échantillons. Choisir un nombre suffisant de sites avec une circulation suffisamment élevée de patients pour atteindre cet objectif en l'espace d'une à deux semaines.

Logistique

Les patients devront être choisis de manière systématique : par exemple les 5 premiers patients de la journée ou un patient sur trois ou encore dans le cas de centres de santé avec un nombre moindre de patients, tous les patients présentant des diarrhées aqueuses ou sanglantes ce jour là. Le nombre d'échantillons collectés ne doit pas dépasser les capacités du laboratoire.

Si l'étude est faite pour la dysenterie, les patients devront être atteints, si possible, d'une diarrhée sanglante, avec une maladie sans évolution depuis moins de 4 jours et, de préférence, n'avoir pas reçu de traitement antimicrobien avant qu'un échantillon de selles soit recueilli. Examiner l'échantillon pour détecter la présence de sang. Si du sang est visible, prendre un écouvillon avec un échantillon de selles et le placer dans un milieu de transport réfrigéré (4°C). Se reporter au chapitre 2 pour des instructions sur le transport. Jeter le récipient qui contenait l'échantillon pour éviter tout risque de contaminer d'autres personnes.

Si l'étude est faite pour une présomption de choléra, les patients devront avoir une diarrhée aqueuse inférieure à 4 jours et ne pas avoir reçu d'agent antimicrobien avant que l'échantillon de selles ne soit collecté. Pour le choléra, il vaut mieux se concentrer sur les adultes et les enfants de plus de deux ans (les enfants de moins de deux ans ont souvent d'autres causes de diarrhée aqueuse et cela risque d'interférer avec les résultats).

Transporter les échantillons au laboratoire. Les examiner et tester la sensibilité aux antimicrobiens des souches de *S. dysenteriae* et de *V. cholerae* O1/O139 (voir Annexes A et B pour les fournitures de laboratoire nécessaires).

Que faire avec les résultats

Partager les résultats avec d'autres agents de santé du pays, surtout ceux qui formulent les politiques de santé ou qui s'occupent de l'achat de médicaments. Si le pays a un bulletin de santé, publier les résultats et les distribuer. Il est utile de partager les résultats avec des pays voisins et le bureau national de l'OMS ou encore avec un bureau régional de l'OMS, pour que les résultats puissent être communiqués rapidement aux autres pays de la région.

Que faut-il faire avec les souches ?

Garder les souches si possible. Pour cela, utiliser les méthodes décrites dans le chapitre 10. Tout isolat inhabituel tel qu'un organisme nouveau ou un nouveau profil de sensibilité aux agents antimicrobiens doit être envoyé au laboratoire de référence pour confirmation.

Annexe F

Fiches de données avec échantillons de selles – diarrhée épidémique

FICHES DE DONNÉES AVEC ÉCHANTILLONS DE SELLES – DIARRHÉE ÉPIDÉMIQUE

Pays _____ Région _____
District _____ Village/Ville _____

N° du spécimen	Date de collecte	Date de début maladie	Nom	Age	Sexe (F/M)	Sang dans selles ? <i>Oui/non</i>	Aspect*	Prend antibiotique <i>Oui/non</i> **

* Aspect des selles : N = selle normalement moulée ; M = selle molle ; A = selle aqueuse ; MS = avec mucus et sang

** Type d'antibiotique, dose et nombre de jours de prise

Collecté par : _____ Nom et Titre _____
Résultats transmis à : _____ Nom et Titre _____
Adresse _____
Téléphone/fax/télex _____

Annexe H

Fournitures de laboratoire pour l'isolement et l'identification de présomption d'*E. coli* O157:H7 pendant une flambée de cas (suffisant pour 100 échantillons)

100 écouvillons de coton ou de polyester

500 g de Cary-Blair ou autre milieu de transport

500 g de gélose Sorbitol MacConkey

500 g de gélose non sélective, par exemple la gélose trypticase-soja, la gélose d'infusion de cœur

O157 kits d'agglutination latex pour 100 tests

200 boîtes de Pétri (9 cm)

200 tubes de test (13 x 100 mm ou 16 x 125 mm)

Citation suggérée

Centers for Disease Control and Prevention. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra. Atlanta, Georgie : CDC ; 2002.

Des copies supplémentaires de ce manuel peuvent être obtenues à l'adresse suivante :

Projet Soutien pour l'analyse et la recherche en Afrique (SARA)
Academy for Educational Development
1825 Connecticut Avenue, NW
Washington, DC 20009 USA
Fax: (202) 884-8447
E-mail: sara@aed.org

