Intérêt de l'approche syndromique dans le diagnostic d'un cas importé de choléra

Value of the syndromic approach for the diagnosis of an imported case of cholera

Sophie Chalmin¹
Nathalie Lièvre²
Caroline Mérillon³
Emilie Gallienne¹
Vivien Leroux¹
Pierre Yves Léonard¹
Marie Laure Quilici⁴
Benoite Pérez¹

¹ Laboratoire Laborizon Maine Anjou, Le Mans, France

² Laboratoire Laborizon Bretagne, Saint-Nazaire, France

³ Médecin généraliste, Herbignac, France

⁴ Institut Pasteur, Centre national de référence des vibrions et du choléra, Paris, France

Résumé. Une femme de 70 ans présente des signes cliniques banals de gastro-entérite infectieuse au retour d'un voyage en République de l'Union du Myanmar. Bien que l'aspect des selles et la clinique soient peu évocateurs d'un cas typique de choléra, *Vibrio cholerae* est isolé dans les selles de la patiente. Le Centre national de référence (CNR) des vibrions et du choléra identifie une souche de *Vibrio cholerae* séro groupe O1 et déclare aux autorités de santé un cas de choléra importé. La stratégie utilisée au laboratoire (algorithme en deux temps avec un dépistage en biologie moléculaire suivi d'une identification d'espèce) a permis de faire un diagnostic biologique rapide et fiable d'une forme atypique de la maladie, pourtant la plus fréquente. Le diagnostic des cas importés est primordial puisque le signalement et la notification de cette maladie à déclaration obligatoire permettent de déclencher des investigations pour identifier des cas chez d'éventuels co-exposés ou des contacts, même si le risque de transmission secondaire semble très faible en France. Il permet également de nourrir les réseaux de surveillance du choléra qui reste une maladie grave et un problème majeur à l'échelle de la planète. Ce cas souligne aussi l'importance du relationnel entre les différents acteurs biologistes et cliniciens.

Mots clés : choléra, *Vibrio cholerae*, approche syndromique

Abstract. A 70-year-old woman with no relevant medical history presented banal clinical signs of infectious gastroenteritis on her return from a trip to the Republic of the Union of Myanmar. The appearance of her stools and clinical findings were not suggestive of a typical case of cholera, but *Vibrio cholerae* was nevertheless isolated from her stools in the laboratory. The National reference center (NRC) for vibrios and cholera identified a *Vibrio cholerae* serogroup O1 (serotype Inaba) strain. The health authorities were notified of an imported case of cholera, identified on the basis of clinical, biological and epidemiological data. The diagnostic strategy used in the laboratory was based on a two-step algorithm involving molecular biological screening followed by culture on selective media for species identification. It was this approach, benefiting from the complementarity of the different techniques, that made it possible to reach a reliable rapid biological diagnosis of this atypical, but frequent form of the disease. The diagnosis of imported cases is of the utmost importance, because the mandatory signaling and notification of cases trigger investigations to check for additional cases among other exposed individuals or contacts of the patient, even though the risk of secondary transmission appears to be low in France. It also supplies data to international surveillance networks for cholera, which remains a serious disease and a major problem globally. This case highlights the importance of interactions between the various biological personnel and clinicians.

Key words: cholera, *Vibrio cholerae*, syndromic approach

Article reçu le 14 juin 2019,
accepté le 03 mars 2020

Correspondance : S. Chalmin
<sophie.chalmin@laborizon.fr>

Le choléra est une infection intestinale aiguë à caractère épidémique induite par *Vibrio cholerae* des sérogroupes O1 et O139. La pathologie s'exprime selon des formes cliniques d'intensité variable dont la plus sévère peut entraîner la mort par déshydratation en l'absence de traitement. La maladie sévit principalement sur les continents africain et asiatique, dans des populations n'ayant pas accès à l'eau potable. Des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques surviennent de façon sporadique dans les pays développés dont la France. L'apport des nouvelles techniques au sein des laboratoires de microbiologie pourrait faciliter le diagnostic des cas de choléra importés pauci-symptomatiques.

L'observation

Le 31 janvier 2018, Madame GRA, 70 ans, sans antécédents particuliers, consulte son médecin traitant pour diarrhées et douleurs abdominales évoluant depuis 8 jours. À l'interrogatoire, la patiente décrit des selles fréquentes (5 à 6 selles par jour) liquides à molles, non glaireuses et non sanglantes. Elle précise revenir d'un voyage en République de l'Union du Myanmar (ex Birmanie) où elle a séjourné du 11 au 28 janvier 2018. Elle n'a consommé que des aliments cuits et de l'eau embouteillée. La seule notion d'ingestion de crustacés provient d'un plat de nouilles sautées. Elle n'a pas connaissance de cas similaires dans son entourage. Un traitement symptomatique par Smecta® et racécadotril (Tiorfan®) est instauré et une coproculture est prescrite.

Le prélèvement de selles est acheminé au laboratoire de Guérande le 1^{er} février. À l'examen macroscopique, l'aspect des selles est de type IV sur l'échelle de Bristol (moulée et lisse), sans glaire, ni sang. Un échantillon de selles est transmis sur milieu Cary-Blair (FecalSwab®) au plateau technique de microbiologie du Mans, puisensemencé sur milieu non sélectif (Mac Conkey) et bouillon d'enrichissement (Sélénite). Un frottis est réalisé pour coloration de Gram.

À J1 après l'ensemencement, un test d'amplification des acides nucléiques est réalisé de façon systématique sur l'échantillon de selles avec recherche de *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp./EIEC*, *Aeromonas sp* et *Vibrio sp* (Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay, Seegene). A 16 heures, le laboratoire diffuse au clinicien un premier compte rendu partiel avec détection positive d'acides nucléiques pour *Campylobacter spp.* et *Vibrio spp.* (figure 1).

Le 3 février, la patiente est revue par le médecin généraliste qui prescrit une antibiothérapie par ciprofloxacine et informe la patiente des mesures d'hygiène renforcées préconisées.

Selon les algorithmes décisionnels du laboratoire, des géloses sélectives sont ensemencées : Campylosel® (Biomérieux) et TCBS (thiosulfate-citrate-bile-saccharose) après enrichissement en eau peptonée hypersalée alcaline. Il est observé sur le milieu TCBS des colonies de grande taille, plates et de couleur jaune après incubation. La souche est identifiée comme *Vibrio cholerae* sur Maldi-Tof (Vitek MS®, Biomérieux) avec un degré de confiance de 99,9 % (figure 2).

Sur le milieu Campylosel® (Biomérieux), une souche de *Campylobacter jejuni* est identifiée. Le biologiste du plateau technique de microbiologie contacte le Centre national de référence (CNR) des vibrions et du choléra et transfère la souche de *Vibrio cholerae* pour sérogroupage. Des antibiogrammes sur milieu gélosé sont réalisés pour chacune des souches (E test®, Biomérieux). La souche de *Vibrio cholerae* est sensible à la ciprofloxacine (CMI 0,064 µg/mL), à la ceftriaxone et au triméthoprime/sulfaméthoxazole ; résistante à l'amoxicilline et à l'azithromycine. La souche de *Campylobacter jejuni* est sensible à l'érythromycine, à l'amoxicilline/acide clavulanique ; résistante à l'ampicilline, à la tétracycline et à la ciprofloxacine (> 32 047 µg/mL).

Le 6 février, le CNR confirme l'identification d'un *Vibrio cholerae* séro groupe O1, sérotype Inaba et déclare l'isolement de cette souche à la Direction générale de la santé (DGS) et Santé publique France. Le biologiste du laboratoire de Guérande contacte l'Agence régionale de santé (ARS). L'évolution clinique de la patiente est favorable sous ciprofloxacine.

Le point de vue du clinicien

La forme clinique présentée par la patiente est la forme la moins connue mais la plus fréquente du choléra (plus de 80 % des cas) : le malade est faiblement symptomatique, l'évolution est lente et la guérison survient le plus souvent spontanément en quelques jours. Cette forme très atténuée est plus difficile à diagnostiquer par son caractère atypique. La forme clinique la plus connue du choléra représente classiquement moins de 20 % des cas au cours d'une épidémie. De manifestation brutale, les diarrhées et vomissements sont violents avec une déshydratation sévère provoquant des crampes musculaires très douloureuses. Les selles sont typiquement afécales, d'aspect « eau de riz » et jamais sanglantes sauf en cas d'association avec une autre pathologie comme une shigellose. En l'absence de traitement, le malade évolue vers un état de grande faiblesse puis la mort survient dans 25 à 50 % des cas par collapsus cardiovasculaire. Dans 30 % des cas, le choléra se manifeste sous forme d'une gastroentérite sévère sans état de choc dont l'évolution est le plus souvent favorable. La

Figure 1. Courbes d'amplification (Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay, Seegene).

plupart des cas d'infection pouvant mimer une gastroentérite banale, le clinicien doit donc considérer le choléra comme un des diagnostics possibles devant tout patient de retour d'un pays affecté, notamment chez l'enfant ou la personne âgée, même en cas de symptomatologie digestive d'apparence banale [1].

En l'absence du respect des règles d'hygiène de base et d'approvisionnement en eau potable, le vibron est transmis de manière indirecte par contamination de l'eau et des aliments (péril oro-fécal) et de façon directe par le contact étroit avec un malade. L'homme joue à la fois le rôle de milieu de culture et de moyen de transport pour le vibron cholérique. Les selles diarrhéiques libérées en grande quantité sont responsables de la propagation des bacilles dans l'environnement et de la transmission oro-fécale. On estime que l'excrétion du vibron peut persister jusqu'à 30 jours quelle que soit la symptomatologie [2].

La prise en charge du choléra repose principalement sur le traitement symptomatique avec compensation des pertes d'eau et d'électrolytes [3]. La réhydratation est assurée par voie orale ou par voie intraveineuse, selon le degré de déshydratation. L'amélioration est perceptible au bout de quelques heures et la guérison, sans séquelle, est obtenue en quelques jours. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), une prise en charge hydro-électrolytique rapide et adaptée permettrait de maintenir le taux de mortalité à moins de 1 %. Les médicaments adjuvants tels que le racécadotril, (Tiorfan®, anti sécrétoire intestinal par

inhibition de l'énképhalinase) n'ont pas de bénéfice supplémentaire dans le traitement des formes sévères de choléra chez l'adulte [4].

L'antibiothérapie n'est pas essentielle au traitement, toutefois elle permet de réduire la durée et le volume de la diarrhée, le volume de liquide nécessaire à la réhydratation, la durée d'hospitalisation et la durée d'excrétion du vibron. Les partenaires du Groupe spécial mondial de lutte contre le choléra (GTFCC) de l'OMS préconisent le recours à la doxycycline comme premier choix de traitement pour tous les patients, adultes, y compris femmes enceintes, et enfants (https://www.who.int/cholera/task_force/en/). La ciprofloxacine ou l'azithromycine qui font partie des antibiotiques conseillés dans le cadre du traitement probabiliste des diarrhées cholériques aiguës [5] peuvent être utilisés comme substitut en cas de résistance à la doxycycline. Le zinc est également un traitement d'appoint important chez l'enfant de moins de 5 ans [3]. Du fait de l'émergence de résistances bactériennes à ces molécules, il est utile de vérifier l'antibiogramme.

Le risque de transmission secondaire à l'entourage ainsi qu'aux soignants est faible voire nul si les précautions standards d'hygiène sont respectées. Toutefois, la détection de ces cas et leur investigation systématique restent justifiées afin de détecter tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave et du fait du risque de choléra chez les co-exposés à la source de contamination. Les cas de choléra confirmés par le CNR font systématiquement

Figure 2. Spectre de masse et identification obtenue en Maldi Tof (Vitek MS®, Biomérieux).

l'objet d'une enquête de l'ARS et sont signalés à la DGS pour notification éventuelle à l'OMS lorsqu'ils répondent aux critères énoncés dans le Règlement sanitaire international (RSI) (gravité des répercussions de l'événement sur la santé publique, nature inhabituelle ou inattendue de l'événement, risque potentiel de propagation internationale de l'événement et/ou risque de restriction des voyages ou des échanges en raison de cet événement).

La déclaration obligatoire auprès des services de l'ARS a donné lieu à une transmission auprès de l'Agence nationale de santé publique, Santé publique France (SpF), et à des échanges avec le Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires (Corrus) (cellule opérationnelle du ministère de la Santé) pour une surveillance des contacts et des co-exposés et une éventuelle déclaration auprès des autorités internationales.

Concernant ce dossier, aucun cas secondaire n'a été identifié. Devant ce cas isolé, la recherche de la source de contamination en Birmanie n'a pas été réalisée et reste donc inconnue. La République de l'Union du Myanmar est considérée par l'OMS comme à faible risque en dehors des camps de réfugiés Rohingyas où la patiente n'avait pas séjourné.

Le point de vue du biologiste

Devant une clinique atypique, un aspect des selles non évocateur et la notion de voyage dans une zone où le risque de choléra est reconnu comme très faible pour les touristes, il aurait pu être difficile de faire le diagnostic biologique de choléra. La stratégie préconisée par la Société française de microbiologie (SFM) repose sur la réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Campylobacter spp.*, la recherche des autres pathogènes, comme les *Vibrio*, n'étant recommandée que dans certaines circonstances, syndrome cholériforme et retour de zone d'endémie pour le choléra, TIAC pour *V. parahaemolyticus*. C'est la mise en place d'un screening systématique en biologie moléculaire qui a permis de suspecter rapidement une infection à *Vibrio cholerae*. Il est important de préciser que la technique utilisée détecte les bactéries appartenant au genre *Vibrio* et n'affranchit pas le biologiste de faire un diagnostic d'espèce après mise en culture de l'échantillon. En effet, l'identification des espèces *V. cholerae* ou *V. parahaemolyticus*, qui peuvent être l'une comme l'autre à l'origine de gastroentérites,

Figure 3. Algorithme utilisé au laboratoire pour la coproculture.

n'ont pas le même impact en termes de gestion des cas et d'investigation. Au sein de l'espèce *V. cholerae* elle-même, l'identification doit être poursuivie par la détermination du sérotype par le CNR, pour distinguer les vibrions cholériques, responsables du choléra, regroupant les sérotypes O1 et O139 de l'espèce *Vibrio cholerae*, et les souches des sérotypes autres que O1 et O139 (206 sérotypes décrits à ce jour), qui constituent, avec les souches des autres espèces du genre *Vibrio*, les vibrions non cholériques. Parmi les vibrions non cholériques, douze espèces ont été associées à des gastroentérites, toxi-infections alimentaires ou infections sporadiques et à des infections extra-intestinales [10].

Il existe actuellement peu de données sur les performances des techniques de biologie moléculaire à la disposition des biologistes dans le diagnostic du choléra en raison du

faible nombre de souches isolées [6, 7]. Au laboratoire, depuis 2010, il a été identifié 10 souches de *Vibrio spp.* dont 7 depuis octobre 2017, date de la mise en place dans notre laboratoire de la technique d'amplification génique multiplex. Sur les 7 échantillons positifs pour *Vibrio* par amplification des acides nucléiques, 3 souches n'ont pas été isolées en culture, probablement pour des raisons de viabilité ou de faible quantité du germe.

En cas de résultat positif par amplification génique, des milieux spécifiques sont ensemencés en fonction du pathogène détecté. Le clinicien est alerté à J1 par diffusion d'un compte rendu partiel. Cet algorithme en deux temps est schématisé sur la figure 3.

Les colonies obtenues en culture sont alors identifiées après 18 à 24 heures d'incubation (48 à 72 heures pour un *Campylobacter spp.*) sur Maldi-Tof (Vitek® MS Biomérieux).

L'espèce *Vibrio cholerae* fait partie de la base de connaissances Vitek® MS V3.0. et peut donc être rapidement identifiée en spectrométrie de masse avec un indice de confiance élevé à partir du milieu TCBS (*figure 2*). Il est donc tout à fait possible d'accéder au diagnostic d'espèce dans un laboratoire non spécialiste. Toutefois les antisérums O1 et O139 sont nécessaires au diagnostic de certitude de vibron cholérique. En leur absence, la souche est envoyée sans délai au CNR après prise de contact.

Des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra et aux fluoroquinolones ont été observées ces dernières années. Il est donc indispensable de tester la sensibilité de la souche aux molécules susceptibles d'être utilisées en thérapeutique.

En l'absence de concentrations critiques cliniques déterminées par l'Eucast pour le *Vibrio cholerae* [8], l'interprétation peut être faite à partir des valeurs de concentrations critiques publiées par le CLSI pour *Vibrio cholerae* (ampicilline, tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides, triméthoprim-sulfaméthoxazole) ou des concentrations critiques proposées pour les entérobactéries par le CASFM-Eucast.

Comme dans le cas de cette patiente, il est fréquent de rencontrer des cas de co-infection avec un autre agent responsable de gastroentérites infectieuses (*Aeromonas spp.*, *Campylobacter spp.*). Il est envisageable que des infections cholériques pauci-symptomatiques aient pu être attribuées à des infections à *Campylobacter spp.*, recherchés dans la coproculture standard, et ainsi participer au sous-diagnostic des cas importés de choléra. En France, les cas de choléra confirmés par le CNR sont rares, la dernière souche de vibron cholérique avait été isolée en 2014 [9].

Conclusion

La difficulté d'obtenir l'exhaustivité des renseignements cliniques *a priori* (notion de voyage, consommation de fruits de mer crus ou peu cuits...) et les manifestations souvent atypiques de la maladie contribuent à la difficulté de diagnostiquer en laboratoire d'analyse médicale un cas de choléra importé. L'utilisation de la biologie moléculaire en amont des techniques microbiologiques conventionnelles permet d'améliorer largement la sensibilité du diagnostic biologique en orientant spécifiquement les étapes postérieures de confirmation par culture. La

prise en charge du patient et l'investigation autour du cas ont été menées avec réactivité grâce à l'étroite collaboration entre les biologistes (laboratoire de proximité, plateau technique et CNR) et à la qualité de la communication clinico-biologique. Il est important que les laboratoires de ville maintiennent la compétence du diagnostic d'espèce et que le CNR intervienne uniquement dans le domaine de l'expertise. Au vu de l'implantation récente des techniques de biologie moléculaire de type « approche syndromique » dans les laboratoires de biologie médicale, il sera intéressant de surveiller l'émergence éventuelle de cas importés peu symptomatiques par l'amélioration du diagnostic biologique.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Quilici M-L. Le diagnostic bactériologique du choléra. *Revue franco-phon des laboratoires* 2011 ; 41(431) : 51-65.
2. Felsenfeld O. A review of recent trends in cholera research and control. With an annex on the isolation and identification of cholera vibrios. *Bull World Health Organ* 1966 ; 34(2) : 161-95.
3. [http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/cholera#Symptômes et traitement du choléra](http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/cholera#Symptômes%20et%20traitement%20du%20choléra).
4. Alam NH, Ashraf H, Khan WA, Karim MM, Fuchs GJ. Efficacy and tolerability of racecadotril in the treatment of cholera in adults: a double blind, randomised, controlled clinical trial. *Gut* 2003 ; 52(10) : 1419-23.
5. Pilly E. *Maladies infectieuses et tropicales*. 26^e ed. Paris : Alinea Plus, 2018 : 720.
6. Amrud K, Slinger R, Sant N, Desjardins M, Toye B. A comparison of the Allplex™ bacterial and viral assays to conventional methods for detection of gastroenteritis agents. *BMC Res Notes* 2018 ; 11 : 514.
7. Martín A, Pérez-Ayala A, Chaves F, Lora D, Orellana MÁ. Evaluation of the multiplex PCR Allplex-GI assay in the detection of bacterial pathogens in diarrheic stool samples. *J Microbiol Methods* 2018 ; 144 : 33-6.
8. Comité de l'antibiogramme-Eucast 2018 V1. 0.(CA-SFM/Eucast).
9. Pounet L, Pougnet R, Voarino A, Sapin J, Drouillard I, Quilici M-L, *et al.* Le choléra en France, à Brest ? *Ann Biol Clin* 2018 ; 76(1) : 107-10.
10. Quilici M-L, Robert-Pillot A. Infections à vibrions non cholériques. In : *Maladies infectieuses*. Paris : EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), 2011, 8-026-F-15.