

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

ANNEE : 2004-2005

Thèse N°.....

**Evaluation d'un test d'agglutination Latex
Vibrio Cholerae 01 « AD SEIKEN » dans le
diagnostic rapide du cholera au Mali**

Thèse présentée et soutenue publiquement le

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

Par **Mme SANOGO Ramata CISSE**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

JURY :

Président du jury:

Professeur Amadou DIALLO

Membres du jury:

Docteur Seydou DIARRA

Docteur Kandioura TOURE

Directeur de thèse :

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

DEDICACES

Je dédie cette thèse :

- **A la mémoire de mon père feu Oumar Almoustapha Cissé.**

La mort vous a enlevé très tôt à notre affection. Mais je me souviens de votre dévouement pour la cause de ma réussite. Puissent votre courage et vos qualités humaines nous servir d'exemple dans la vie. Recevez l'expression de toute ma reconnaissance et de toutes mes affections, que ton âme repose en paix.

- **A la mémoire de mes mères : Feu Fanta Dao et Feu Amina Cissé.**

Les mots me manquent pour vous qualifier. Vous qui avez su, assurer avec dignité et courage votre devoir de mère de famille. Votre amour pour nous, vous ont poussé à d'énormes sacrifices.

Aujourd'hui absentes parce que disparues avant ce jour de joie que nous avons voulu partager avec vous.

Nous sommes émues en évoquant ici vos mémoires, qui à jamais demeurent vivantes en nous.

Qu'Allah le Tout Puissant vous accorde le Paradis. Amen

- **A mes mères : Fanta Soucko, Aminata Fofana et Sitan Mariko.**

Pour vos profonds amours, vos prières, vos encouragements, tous les sacrifices consentis et vos multiples soutiens pendant les moments difficiles de mes études. Je prie le Bon Dieu afin qu'Il vous donne un maximum de temps pour déguster le fruit de vos efforts. Je vous rassure de toute ma reconnaissance et de mes sentiments les plus profonds.

- **A ma grand-mère : Bibata Maïga**

Plus qu'une grand-mère tu as été une mère pour moi. J'ai toujours su compter sur votre soutien et vos bénédictions, je te promets de ne jamais trahir cet espoir que tu as placé en moi. Que le Tout Puissant t'accorde une longue vie pour que tu bénéficies pleinement des fruits de ce travail.

- **A mes tantes et oncles**

Soyez assurés de mon profond respect.

- **A mes frères et sœurs**

En témoignage de l'affection qui nous a réuni sous le toit paternel, je voudrais que vous trouviez dans ce travail le fruit des efforts que vous avez consentis à mon égard. Ce travail est aussi le vôtre.

- **A mon mari : Nanourou Sanogo**

Votre patience est non seulement exemplaire mais aussi salutaire, peu d'hommes pourraient endurer de telle situation.

Vos remarques pertinentes m'ont toujours servi dans mes actes quotidiens.

Votre conseil et votre soutien moral et matériel ont conduit à l'élaboration de ce présent travail.

Soyez très rassuré de ma profonde reconnaissance.

- **A mon fils : Saïd Sanogo**

L'élaboration de ce travail t'a souvent privé de mon affection.

Garante de ton développement physique et moral, ton sourire sera la source de ma joie. Ma merveille ne t'inquiète plus, je te promets que Incha Allah tu auras dorénavant toute l'affection qu'une bonne maman doit à son enfant.

REMERCIEMENTS

- **A Allah Le Tout Puissant Le Miséricordieux** : de m'avoir donné la chance et le courage de faire ce travail

- **A mes neveux et nièces:**

Puisse ce modeste travail vous servir d'exemple.

- **A tous mes amis**

De peur d'en oublier je préfère ne pas citer de nom, ils se reconnaîtront, mes sincères remerciements.

- **A tous les membres de la LIEEMA**, courage.

Tous mes remerciements vont :

- **Au corps professionnel de la FMPOS**

Pour la qualité de l'enseignement dispensé

- **A tout le personnel de la FMPOS .**

- **A tout le personnel de l'INRSP.**

- **A tout le personnel des services de bactériologie et de sérologie de l'INRSP.**

- **A Monsieur Tiewary DOUMBIA**, Technicien au laboratoire de référence de la méningite à l'INRSP. Votre collaboration a été totale. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

- **Au Dr SEYDOU DIARRA**, chef de service de bactériologie-virologie à l'INRSP.

Votre grande expérience, votre connaissance étendue en biologie et votre rigueur dans le travail font de vous une personne respectée.

Soyez assuré de nos sentiments les plus distingués.

- **A monsieur Aliou DIAKITE**, chef du Département Administratif et du Personnel à l'INRSP : pour votre soutien constant.

- **A monsieur Seydou Diarra et famille au point G**, sincères remerciements.
 - **A monsieur Seydou Sangaré et famille à Magnabougou .**

- **Aux familles: Fofana, Diarra, Tamboura au point G.**
 - A toute la promotion 1998-1999 de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie du Mali.

- **A mes collègues de l'INRSP** en souvenir du temps passé ensemble.

- **A messieurs**

Ousmane Doumbia
Souleymane Dama
Dr Modibo Coulibaly
Amadou Niagaly
Daouda Diarra

Amadou Diarra
Mohamed Tamboura
Mamadou Diarra
Ibrahim Maiga
Amadou Abathina

En fin à tout ceux qui de loin ou de près ont contribué à l'élaboration de ce travail par leur soutien moral ou matériel.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur Amadou DIALLO

- Agrégé de biologie
- Professeur de biologie animale et de zoologie à la FMPOS

Vous nous faite un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons toujours apprécié votre maîtrise et votre rigueur dans le travail.

Trouvez ici l'expression de notre haute considération et de notre profonde gratitude.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Docteur Kandioura Touré

- Chef de la section surveillance épidémiologique.
- Coordinateur du projet PASEI 2(programme d' appui à la surveillance épidémiologique intégrée phase 2)
- Facilitateur du cour d'épidémiologie pour cadre supérieur de la santé

Nous avons été particulièrement marqué par la simplicité avec la quelle vous avez accepté de juger ce travail. Votre amour pour le travail bien fait, votre rigueur et vos qualités d'homme de sciences font de vous un modèle de maître souhaité par tous.

Trouvez dans ce travail toute note reconnaissance et notre fidèle attachement.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Docteur Seydou Diarra

- Microbiologiste à l'INRSP
- Responsable du service de bactériologie à l'INRSP
- Chargé de cour au centre de spécialisation des techniciens supérieurs
- Membre de la commission thématique épidémiologie VIH et laboratoire

Nous sommes très heureux de vous compter parmi notre jury. Votre disponibilité constante et votre sympathie ont suscité notre admiration.

Soyez assuré de notre reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Professeur Flabou BOUGODOGO

- Maître de conférence Agrégé en Bactériologie et Virologie à la FMPOS
- Directeur de l'institut National de Recherche en Santé Publique
- Professeur des cours de bactériologie et virologie à la FMPOS

Honorable maître, vous êtes d'une rigueur scientifique, d'un courage et d'un sens social élevé hors du commun. Passionné du travail bien fait, soucieux de notre formation et de notre réussite, vous êtes pour nous un modèle. Puisse Dieu nous aider à poursuivre la voie que vous nous avez tracée.

Recevez ici, professeur, nos plus hautes considérations.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

V cholerae: Vibrio cholerae

NAG: Non- agglutinable

J.C: Jeseu christ

EPSA: Eau Peptonée hyper Salée Alcaline

GNA: Gelose Nutritive Alcaline

TCBS: Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose

MEVAG: Milieu pour Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

EPSS: Eau Peptonée Sans Sel

EPHT: Eau PHysiologique Tamponnée

MH2: Mueller Hinton 2

INRSP: Institut National de Recherche en Santé Publique

SFM: Société Française de Microbiologie

FMPOS: Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto
Stomatologie

Echtlit: Echantillon

FP: Faux Positifs

FN: Faux Négatifs

VP: Vrais Positifs

VN: Vrais Négatifs

Se: Sensibilité

Sp: Spécificité

VPP: Valeur Prédictive Positive

VPN: Valeur Prédictive Négative

Bd : Bandelette

IPM : Institut Pasteur de Madagascar

IPP : Institut Pasteur de Paris

TC : Toxine cholérique

LPS : LipoPolySaccharide

LDC : Lysine DéCarboxylase

ODC : Ornithine Décarboxylase

ADH : Arginine DiHydrolase

ONPG : Ortho-Nitro-béta-Phényl Galactoside

SOMMAIRE

INTRODUCTION

GENERALITES

RESULTATS

METHODOLOGIE

ANNEXES

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

BIBLIOGRAPHIE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

**HOMMAGE
AUX
MEMBRES
DU JURY**

INTRODUCTION	25
1.GENERALITES	29
1.1. DEFINITION DU CHOLERA.....	29
1.2. Agent pathogène	29
1.2.1. BIOTYPES	32
1.3. LES FORMES CLINIQUES	33
1.3.1 FORMES TYPIQUES	33
1.3.2 FORMES CLINIQUES	34
1.4 EPIDEMIOLOGIE	36
1.4.1 HISTORIQUE	36
1.4.2. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES ACTUELS	39
1.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU CHOLERA.....	41
1.5.1 DIAGNOSTIC DIRECT.....	41
1.5.2 DIAGNOSTIC INDIRECT (ETUDE DU POUVOIR VIBRIOCIDE)	49
2. METHODOLOGIE	51
2.1. CADRE DE L'ETUDE	51
2.2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE	51
2.2.1. PERIODE :.....	51
2.2.2. TYPE :	51
2.3. ECHANTILLONNAGE	51
2.4. METHODE.....	52
2.4.1. PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES SELLES DANS LES CENTRES DE SANTE.....	52
2.4.2. EXAMEN MACROSCOPIQUE DES SELLES	52
2.4.3. EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	52
2.4.7. LES PERFORMANCES DU LATEX :.....	60
2.4.8. ANALYSE DES DONNEES	63
3. RESULTATS	64

4. COMMENTAIRES ET DISCUSIONS	80
4.1. PROVENANCE DES ECHANTILLONS	80
4.2. AGE / SEXE	80
4.3. MOYENS DE TRANSPORT.....	81
4.4. CULTURE	81
4.5. SENSIBILITE DU V. CHOLERAЕ AUX ANTIBIOTIQUES	82
4.6. LE LATEX <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O :1 « AD SEIKEN »..	83
5- CONCLUSION :	85
6- RECOMMANDATIONS :	86
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87
ANNEXE 1	93
ANNEXE 2	95

INTRODUCTION

Le choléra est une maladie diarrhéique qui se manifeste sous forme d'épidémie catastrophique due à *Vibrio cholerae*. Les selles sont afécales, hydriques et très fréquentes, elles ne contiennent ni pus, ni sang car il n'y a pas effraction de la muqueuse mais une sécrétion hydro-électrolytique par la muqueuse sous l'action de la toxine.

Le choléra maladie de la peur, compagnon des inondations, des famines et des guerres, paraissait appartenir à l'histoire.

Après avoir pris une vigueur et une extension nouvelle dans les foyers traditionnels, il s'est attaqué pour la première fois en 1970 au continent africain et 1971 à l'Amérique du sud (5,17).

En 1971, 570 000 cas de choléra dont 391.171 cas en Amérique latine ont été notifiés à l'OMS (5,18).

Le sérotype O:1 de l'espèce *Vibrio cholerae* est responsable des 7 pandémies que le monde a connues jusqu'à présent.

Au Mali, la première épidémie a sévi de 1970 à 1971, la deuxième de 1984 et 1986 et la troisième de 1995 à 1997. Toutes ces épidémies ont eu pour point de départ la région de Mopti (5).

Des essais contrôlés de vaccination ont montré une efficacité insuffisante du vaccin bactérien utilisé par voie parentérale depuis un siècle (5).

Aujourd'hui, les autorités sanitaires ne disposent pas encore d'un vaccin éprouvé, suffisamment protecteur contre le choléra.

La lutte contre une épidémie de choléra passe d'abord par le diagnostic rapide et précis des premiers cas cliniques.

En cas d'épidémie pour le diagnostic, les échantillons de selle sont prélevés par les centres de santé et acheminés vers les laboratoires de référence spécialisés pour la recherche de *Vibrio cholerae*.

Le délai d'acheminement des selles au laboratoire peut varier de 1 à 6 jours.

Le diagnostic biologique pour la confirmation du choléra étant une urgence, les laboratoires des centres de santé de cercle doivent être dotés de moyens techniques pour l'identification de *V. cholerae* à partir des selles des malades.

A défaut de pouvoir assurer la mise en place et l'équipement adéquat d'un laboratoire de bactériologie dans chaque laboratoire de notre réseau national, les méthodes d'identification rapide pourraient être une alternative.

Les tests d'agglutination directe de *V. cholerae* O:1 à partir des selles un sont en exemple. Ils doivent cependant être validés dans notre contexte épidémiologique.

L'évaluation du test d'agglutination «Latex *Vibrio cholerae* O:1 AD SEIKEN » rentre dans le cadre de ces validations au Mali.

OBJECTIFS

Objectif Général

Evaluer le latex *Vibrio cholerae* O:1 « AD SEIKEN » dans le diagnostic rapide du choléra.

Objectifs spécifiques

1- Identifier les moyens et les conditions de transport des selles des centres de santé périphériques vers le Laboratoire National au niveau central en vue de la recherche du vibron cholérique.

2- Déterminer la fréquence d'isolement du vibron cholérique à partir de ces prélèvements.

3- Déterminer la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

4- Déterminer la performance du test d'agglutination latex *Vibrio cholerae* O:1 « AD SEIKEN » (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives et efficacité) dans le diagnostic rapide du choléra.

5- Faire des recommandations sur l'utilisation du latex *Vibrio cholerae* O:1 « AD SEIKEN » dans la confirmation rapide du choléra par les centres de références.

1.GENERALITES

1.1. DEFINITION DU CHOLERA

Le choléra est une maladie diarrhéique infectieuse, hydrique, incoercible due au *V. cholerae O :1* entraînant une déshydratation précoce, ne contenant ni pus, ni sang.

C'est une maladie qui se manifeste sous forme d'épidémies catastrophiques.

1.2. Agent pathogène

Le Vibrio cholerae O :1 est un bacille à Gram négatif assez fin ($0,5\mu\text{m}$ de diamètre), incurvé, non sporulé, aero-anaérobie, mobile à l'aide d'un flagelle polaire enveloppé.

C'est une bactérie chimio-organotrophe, oxydase positive, qui fermente le saccharose et le glucose avec production d'acide (2 ,46).

Le *Vibrio cholerae O : 1*, l'agent du choléra représente un séro groupe de l'espèce *Vibrio cholerae* appartenant au genre *Vibrio* de la famille des *Vibrionaceae* qui comprend classiquement quatre genres :

- Genre *Vibrio*
- Genre *Photobacterium*
- Genre *Plesiomonas*
- Genre *Aeromonas*

Des études récentes utilisant des techniques d'hybridation et de séquençage d'acides nucléiques semblent indiquer qu'en fait les genres *Plesiomonas* et *Aeromonas* devraient être retirés de la famille des *Vibrionaceae* (15). Elle ne comprendrait alors que le genre *Vibrio* et le genre *Photobacterium*.

Le genre *Photobacterium* n'a pas à ce jour été impliqué dans des processus pathologiques.

Il est agglutinable par le sérum anti O1. Il en existe deux biotypes :

- Le biotype classique découvert en 1884
- et le biotype El Tor découvert en 1906 reconnu comme pathogène depuis la pandémie de 1960.

Le *Vibrio cholerae* O:1 peut croître dans les milieux de culture appropriés sans apport de chlorure de sodium mais peut supporter une concentration de ce sel jusqu'à 5%. Le pH optimum des milieux de culture se situe entre 7,6 et 8,6 et la température optimum de culture se situe entre 30- 37°C.

Gardner et Venkatraman (21) avaient réparti les souches de l'espèce *Vibrio cholerae* en six groupes sérologiques selon la spécificité de l'antigène somatique O.

Aujourd'hui on reconnaît 140 sérogroupes O de *Vibrio cholerae* (33, 34, 38,39).

Toutes les souches responsables d'épidémie de choléra appartenaient au séro groupe O: 1. Récemment, un nouveau

sérogroupe (O : 139) a été isolé au cours d'épidémies en Inde et au Bangladesh (3, 25, 35). Toutes les souches appartenant aux sérogroupe différents de O : 1 sont dénommés *Vibrio cholerae non-O:1*, antérieurement vibrions « NAG » (pour non agglutinables par le sérum anti-O : 1)

Le *Vibrio cholerae* sérogroupe O : 1 est subdivisé en trois sérotypes (Ogawa, Inaba et Hikojima) définis par trois facteurs antigéniques :

Le facteur A (commun), les facteurs B (spécifique d'Ogawa) et C (spécifique d'Inaba). Le serotype Hikojima est considéré comme une forme de transition entre Ogawa et Inaba (31, 37,43).

Les souches du sérotype Ogawa possèdent le facteur C en petite quantité et peuvent être agglutinées par les sérums anti-C.

Un vaccin monovalent Inaba à base de germes totaux tués protège à la fois contre les deux sérotypes (Ogawa et Inaba). Un tel vaccin Ogawa ne protège pas contre une infection par une souche Inaba (29).

Cela fait penser que le facteur B est plus exposé que les facteurs A et C à la surface de la bactérie.

Le facteur A (toujours présent) est, en réalité le seul antigène spécifique de *Vibrio cholerae O : 1*. Les facteurs B et C peuvent être rencontrés chez des souches de *Vibrio cholerae non-O :1*, d'autres espèces du genre *Vibrio* ou même d'autres bactéries (20, 40, 41,42).

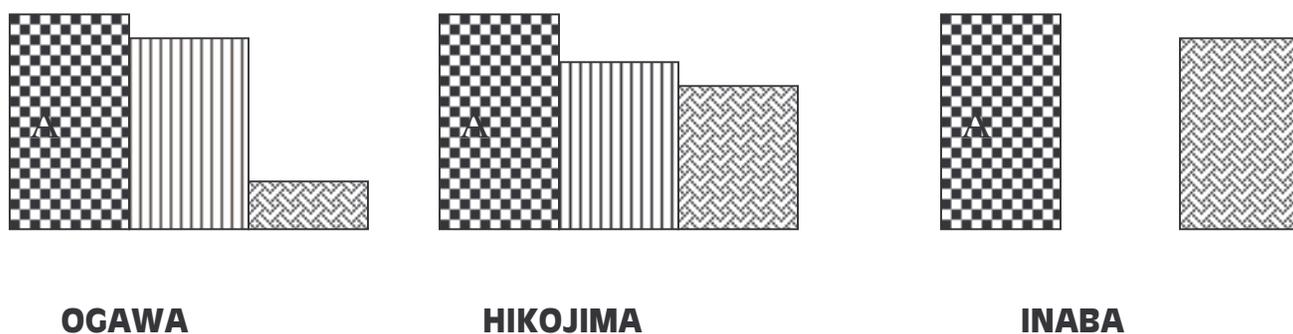


Figure 1 : Représentation hypothétique des antigènes spécifiques des sérotypes de *Vibrio cholerae* O:1(32,33).

1.2.1. BIOTYPES

Vibrio cholerae O:1 est subdivisé en deux biotypes, « classique » et « El Tor ». La production d'une hémolysine thermolabile, active sur les globules rouges de mouton, par le biotype El Tor, était, à l'origine, le critère de distinction entre les deux biotypes.

Actuellement, d'autres caractères, en plus de l'hémolysine, sont utilisés pour différencier ces biotypes (**tableau I**). Ces caractères ne sont pas constants (32) et ne sont pas par conséquent, de bons marqueurs épidémiologiques. Qu'il soit du biotype classique ou du biotype El Tor, *Vibrio cholerae* O : 1 présente les mêmes pouvoirs pathogènes et épidémiogènes et les mêmes caractères sérologiques.

Tableau I : Caractères différentiels des biotypes classique et El Tor de *Vibrio cholerae* O : 1 (5,17).

CARACTERES	BIOTYPE CLASSIQUE	BIOTYPE EL TOR
Hemolyse	-	+
Agglutination des hématies de poulet	-	+
Sensibilité à la polymyxine B (50 UI)	+	-
Réaction de Voges – Proskauer (VP)	-	+
Sensibilité au phage IV (Mukerjee)	+	-
Sensibilité au phage V (Muker Jee)	-	+

Légende : + (positif) - (négatif)

1.3. LES FORMES CLINIQUES

1.3.1 FORMES TYPIQUES

L'incubation est brève : 2 à 3 jours, voire quelques heures, en période épidémique ou après comptage massif, 3-7 jours en phase endémique.

Le début est brutal, sans problème, volontiers nocturne chez un sujet en bonne santé : tension, épigastrique, gargouillement, angoisse, immédiatement suivis d'une évacuation intestinale sans colique préalable, ne soulagent pas la tension abdominale, mais épuisent le malade.

Les selles sont franchement aqueuses, incolores, classiques, riziformes (contenant des grumeaux), d'odeur fade, afécales ;

d'abord impérieuses en jet, elles coulent ensuite à travers le sphincter relâché du malade épuisé, souillant vêtements, nattes pendant le transport et réalisant une véritable inondation.

Les vomissements ont le même caractère que les selles : d'abord en fusée, incoercibles puis sans effet s'écoulant de la bouche du malade. Ils sont également aqueux, avec des grumeaux riziformes . L'abondance de ces pertes digestives qui atteignent plusieurs litres en quelques heures entraîne une asthénie massive, une soif évidente que le malade ne peut satisfaire et des crampes musculaires extrêmement douloureuses, raidissant d'abord les extrémités puis atteignant les muscles de l'abdomen et du thorax. L'aspect du malade est caractéristique :

parfaitement lucide mais la voix cassée ou inaudible, le visage émacié, les yeux vitreux, cernés, profondément enfoncés dans les orbites, cyanosé et couvert de sueurs visqueuses et froides, le cholérique ressemble en moins de 24 heures au déporté quittant un camps de famine. Le pouls est rapide, mal frappé, souvent imprenable. La tension artérielle est effondrée, les bruits du cœur sont lointains, la respiration difficile, la diurèse nulle.

C'est un tableau d'algidité avec hypothermie à 36°C. Cette forme classique, le malade non traité meurt en 48 à 72 heures, de collapsus, complètement vidé de tous ses liquides (16).

1.3.2 FORMES CLINIQUES

- Certaines variantes sémiologiques sont trompeuses, la diarrhée peut être sanguinolente à la longue, mais non d'emblée, les vomissements moins abondants. Assez souvent la température est

normale ou un peu élevée vers 37,5 – 38°C, un accès palustre associé peut donner une fièvre élevée.

- Le choléra « sec » entraîne la mort subite par colique avant que l'inondation intestinale n'ait eu le temps de s'extérioriser ou après l'épisode diarrhéique précurseur, alors que la déshydratation n'est pas encore apparente. Ces formes sont relativement fréquentes, mais le malade meurt avant d'arriver au centre de traitement.

- Les formes graves habituelles :

Peuvent guérir spontanément. Les vomissements cèdent les premiers et le malade pouvant boire et s'alimenter, se réhydrate seul. La diarrhée persiste cependant plusieurs jours, mais la diurèse se rétablit et l'état général s'améliore. L'apparition d'une fièvre à 38°C et de sueurs chaudes est le bon pronostic. Un collapsus secondaire ou les troubles neuro-encéphaliques avec agitation et délire sont possibles.

- Les formes bénignes : sont fréquentes et se résument à un tableau

de gastro-entérite aiguë non fébrile, ou une diarrhée banale de diagnostic difficile (16).

1.4 EPIDEMIOLOGIE

1.4.1 HISTORIQUE

Le choléra est une maladie diarrhéique connue en Inde depuis 500 à 400 ans avant J.C. Cependant, l'unanimité n'est pas faite sur l'origine du terme « choléra ». Il semble qu'il fut utilisé pour la première fois par Hippocrate et dérive des mots grecs chole (bile) et rein (couleur). Alexander Triallianus disait cependant en 1622 que choléra provient de (cholades = intestin) (1).

C'est à partir de 1817 que le monde entier a connu le choléra sous forme de 7 pandémies catastrophiques.

1.4.1.1. Les six premières pandémies (1817- 1923/5)

Jusqu'au début du XIX^{ème} siècle, le Bengale et la haute vallée du Gange en Inde, constituaient la niche écologique du choléra.

Entre 1817 et 1923, six pandémies, parties de la région endémique indienne, se sont succédées à travers tous les continents. La délimitation de ces pandémies, selon plusieurs auteurs, n'est pas suffisamment nette, mais les dates adoptées par Pollitzer(30) sont les plus utilisées (1) :

La première pandémie (1817- 1823) n'a concerné que l'Asie et l'Est de l'Afrique ;

Les deuxième (1829 – 1851), troisième (1852- 1859), quatrième (1863 – 1879) et cinquième (1881 – 1896) pandémies ont touché tous les continents ;

La sixième (1899 – 1923) s'est limitée aux continents d'origine de la première pandémie, avec quelques extensions en Europe de l'Est.

Dès 1831, au cours de la seconde pandémie en Angleterre, W.B. O'shaghnessy avait conseillé, pour le traitement du choléra, de restaurer la concentration normale du sang par un apport de liquide et de sels (8). Il fut alors à l'origine de la réhydratation intraveineuse. Le terme *V. cholerae* est dû à l'italien Filippo Pacini qui observa le vibron en 1854 dans le contenu intestinal de malades morts de choléra sans, cependant, démontrer son rôle dans la maladie (1).

En 1883–1884, Robert Koch montra qu'un « bacille en virgule » jouait un rôle dans le choléra et le nomma *Kommabazillen komma* (virgule en Allemand) ou *Vibrio*.

Ferran en 1884, puis Haffkine en 1892 produisirent les premiers vaccins anticholériques (utilisés par voie parentérale).

En 1896, Gruber et Durham introduisirent dans le diagnostic du choléra une technique d'agglutination des vibrions avec un sérum immun de lapin. Un an auparavant, Bordet avait décrit cette agglutination bactérienne mais sans en signaler l'intérêt pour le diagnostic du choléra. En revanche, l'observation du fait que, contrairement au pouvoir bactéricide (phénomène décrit par Pfeiffer la même année), cette agglutination n'était pas supprimée après le chauffage des sérums à 56-60°C a conduit ultérieurement Bordet à la découverte du complément (15).

En 1905, Gotschlich isola, au lazaret d'El Tor dans le Sinaï, un vibron de l'intestin de cadavres de pèlerins qui n'avaient pas présenté de signes cliniques du choléra. Ce vibron ne différait du vibron cholérique que par son pouvoir hémolytique. Il fut alors considéré comme non pathogène (1, 15, 30) et appelé « *Vibrio El Tor* ».

En 1935, Gardner et Venkatraman identifièrent 6 groupes antigéniques O chez *V. cholerae* et constatèrent que toutes les souches épidémiques appartenaient au séro groupe O :1.

1.4.1.2. La septième pandémie (1961- ?)

Après 1925, le choléra disparaissait de l'Europe et du continent américain mais des poussées épidémiques ont continué à frapper l'Asie et le Nord- Est de l'Afrique dont l'Egypte.

En 1961, contrairement aux six premières pandémies, la septième prit son départ des îles d'Indonésie. Elle est due au *Vibrio* « El Tor » dénommé plus tard *V. cholerae* O :1, biotype El Tor. Auparavant, de 1937 à 1958, ce vibrion avait déjà provoqué quelques poussées épidémiques à Sulawesi (îles Célèbres) en Indonésie où il était endémique. Cette pandémie est celle des pays en voie de développement, à faible niveau socio- économique et d'hygiène d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine. Elle a atteint l'Afrique en 1970 – 1971, puis l'Amérique latine à partir de 1991 (5, 18).

De et Chatterjee en 1953 (13) et Craig en 1965 (10) découvrirent la toxine cholérique et son rôle dans la physiopathologie du choléra. La dite toxine fut, par la suite, isolée et purifiée par Finkelstein et Lospalluto en 1969 (19).

Le nombre de cas de choléra dans le monde est estimé à 5,5 millions par an dont 20 000 morts en Afrique et 100 000 en Asie (5). Un tiers de ces morts concerne des enfants de moins de 5 ans. En 1991, 570 000 cas de choléra, dont 391 171 cas en Amérique latine, ont été notifiés à l'OMS (11,18). Dans les pays tropicaux d'Afrique et

d'Amérique, le biotype El Tor a trouvé de nouvelles niches écologiques.

Il s'est constitué alors plusieurs régions endémiques de choléra qui connaissent souvent des poussées épidémiques cycliques. Des épidémies dues à des cas importés peuvent aussi survenir dans les régions non endémiques. La gravité des épidémies et l'entretien des endémies étaient liés à plusieurs facteurs dont l'âge et l'état d'immunité de la population, les modes de transmission, la nature des réservoirs des vibrions.

1.4.2. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES ACTUELS

En Afrique l'épidémie avait progressé de façon inattendue selon trois axes. Au nord à partir de l'Egypte, elle atteignait la Libye, puis la Tunisie, enfin le Maroc méditerranéen, l'Algérie n'étant pas épargnée : le Magreb reste depuis une zone endémo épidémique. A l'Est à partir de l'Egypte ou la Somalie, elle s'étend en Ethiopie (foyer important), au Soudan, au Kenya, en Ouganda, au Rwanda et en Tanzanie. A l'Ouest, le choléra a frappé en moins d'un an tous les pays d'Afrique occidentale et centrale, progressant le long de la côte à partir de la Guinée (août 1970) jusqu'au Cameroun (mars 1971) dans une marche régulière, et sautant en plein Sahel au Mali (novembre 1970 à Mopti) pour suivre le cours du Niger et atteindre le Burkina-Faso, le Niger, le Nigeria, et le Nord du Cameroun (mai 1971), le Tchad et la République centre africaine (juin 1971), la Mauritanie et l'Est du Sénégal (1971).

Depuis 1972, la pandémie continuait à s'étendre à travers les continents sous forme de brèves flambées épidémiques (Espagne Portugal, Italie, Comores) ou des cas isolés importés (France,

Australie, Etats Unis, Brésil, Grande-Bretagne). En 1976, l'endémie est solidement implantée, non seulement dans les foyers traditionnels l'Inde et l'Asie du Sud-Est mais aussi en Afrique(Afrique de l'Est), la région des grands lacs, sont durement frappées en 1978, ainsi que certaines îles de l'océan indien et du pacifique, l'Afrique du sud en 1979. En 1990, 69 631 cas de choléra ont été déclarés dans le monde en juillet 1994, une épidémie de choléra, due au *Vibrio cholerae* O:1, biotype El Tor, sérotype Ogawa, éclate parmi les réfugiés Rwandais au Zaïre. L'agent responsable est résistant aux cyclines, pénicillines A et sulfamides. On estime à 56 950 le nombre de cas de choléra, soit un taux d'attaque de 8% parmi les 700 000 réfugiés (5). Le taux de mortalité a initialement dépassé 10%. On opposait classiquement deux modalités de développement épidémique de choléra, l'une traînante, l'autre explosive. Les données recueillies en 1970-71 permettent de distinguer : l'état endémique observé peu avant et longtemps (si ce n'est en permanence) après une flambée épidémique, et la poussée paroxystique elle-même.

En zone sèche ou en pays sahélien, les poussées épidémiques sont au contraire explosives, avec acmé presque immédiate et décroissant rapide. Les foyers sont rapides. Les foyers sont rapidement disséminés de façon irrégulière et la population peut être atteinte à 30 % et même 75%.

Le milieu ne joue plus aucun rôle et la contagion est directement inter- humaine : après une montée progressive de la densité bactérienne, l'apparition des premiers malades et les premiers cadavres entraîne l'explosion brutale. Ces connaissances épidémiologiques, rajeunies par l'étude des foyers africains vierges en 1970-71, avaient fait sortir le choléra du cadre étroit de « maladie

hydrique » extrême orientale. Elles avaient surtout modifié les impératifs et la stratégie de la lutte contre le choléra moderne et leur bien-fondé s'était confirmé depuis.

1.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU CHOLERA

Le diagnostic d'un vibrion cholérique au laboratoire est toujours une question de rigueur et de rapidité qui engage le médecin biologiste, les autorités sanitaires nationales et l'Organisation Mondiale de la Santé. C'est l'absence de rigueur dans le diagnostic du vibrion cholérique qui est à l'origine de la pandémie actuelle (23,24).

1.5.1 DIAGNOSTIC DIRECT

1.5.1.1. Recherche du vibrion cholérique dans les selles du malade

1.5.1.1.1. Le test d'agglutination direct :

C'est l'agglutination au latex directement à partir des selles. On utilise le latex « a » sensibilisé et le latex control, une agglutination claire dans le latex « a » est considérée comme positive tant que une agglutination dans le control est interprétée comme non spécifique.

L'importance de ce test est qu'il permet de diagnostiquer rapidement le choléra dans environ quelques minutes. Ce qui permettra la prise en charge rapide des cas (12).

1.5.1.1.2. La culture

*** Enrichissement de la culture et isolement du vibrion**

L'ensemencement doit être abondant, environ 0,5ml de selles dans un tube d'EPSA. Ce tube initial (T-0) est placé à l'étude à 37° C.

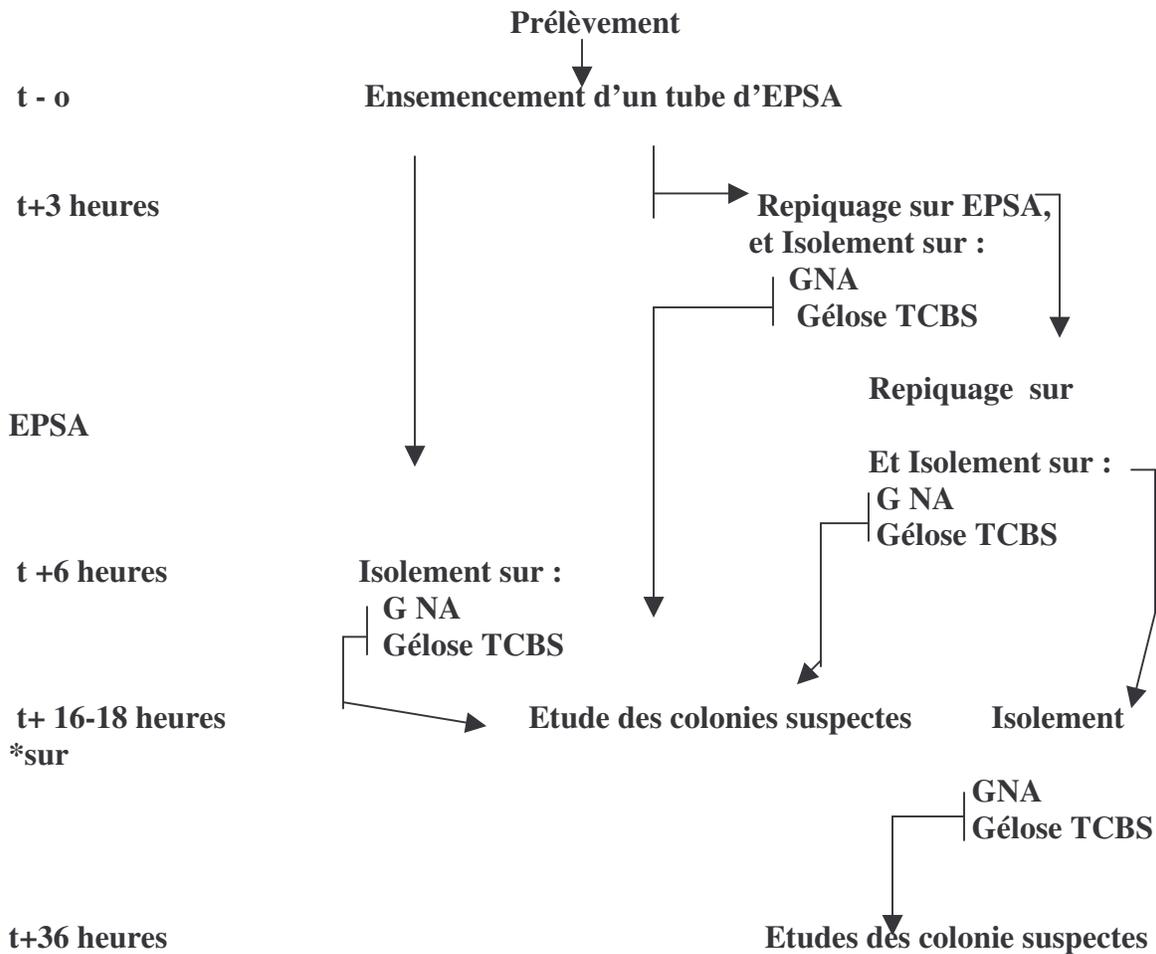
- Examen microscopique

. Etat frais :

Il consiste à déposer une goutte de la selle entre lame et lamelle et rechercher à l'objectif x 40 la mobilité en "vol de moucheron" du vibrion cholérique. Cette mobilité est due au flagelle polaire.

. Examen microscopique après coloration de Gram :

Il permet de rechercher les bacilles fins, en virgule à Gram négatif et isolés (Voir Fig4).



* isolement à faire uniquement si les isolements effectués à t + 3 heures et à t + 6 heures
 EPSA= eau peptonée hyper salée alcaline
 GNA = gélose nutritive alcaline

Figure 2 : Procédure d'enrichissement et d'isolement du vibrion cholérique (15).

L'isolement effectué à partir du tube t-0 (temps zéro) d'EPSA cultivé pendant 6 heures augmente la probabilité d'isoler le vibron cholérique des selles pauvres en vibrions. Cet isolement ne remplace cependant pas celui effectué après 3 heures de culture est particulièrement favorable à la sélection du vibron cholérique.

- les colonies de vibron cholérique sont rondes, de taille moyenne environ, 2 mm de diamètre après 18 heures de culture, translucides bleutées, au bords réguliers sur GNA (voire fig. 4). Elles sont arrondies, bombées et habituellement jaunes (saccharose⁺) sur TCBS (15).

- Les résultats obtenus sur GNA sont plus fiables et moins sujets à erreurs de diagnostic.

A partir des colonies suspectes sur GNA, on ensemence :

- des GNA qui serviront pour la réaction d'agglutination si celle-ci n'a pas pu déjà être réalisée. Ensemencer au moins cinq colonies ;
- deux tubes de milieu pour l'étude de la voie d'attaque des Glucides (MEVAG, Diagnostics Pasteur)
 - un tube d'eau peptonée sans sel (EPSS)
 - un tube d'eau peptonée glucosée à 0,5% avec cloche ;
 - un tube de milieu de Kliger- Hajna.

Les cultures en MEVAG permettront de faire la distinction entre les *Pseudomonaceae* qui dégradent le glucose uniquement par voie oxydative, et les *Vibrionaceae* qui le dégradent par les voies oxydative et fermentative.

Les cultures en EPSS, eau peptonée glucosée et Kliger-Hajna, permettront, si l'agglutination avec le sérum anti-O:1 est négative, d'orienter l'identification vers des vibrions autres que le vibron cholérique.

A partir des colonies suspectes sur GNA, on effectue :

- un examen microscopique (état frais et coloration de Gram)
- une réaction d'oxydase

. *Examen en immunofluorescence*

Il faut obligatoirement un sérum spécifique –le sérum de lapin anti-Ch1 + 2. Cette technique offre une très bonne concordance avec l'isolement du germe, mais n'est cependant pas suffisamment spécifique pour justifier la déclaration aux autorités sanitaires.

Si le germe est un bacille mobile, incurvé, Gram négatif, saccharose⁺ (avec cependant de rares exceptions), oxydase⁺ l'identification d'un vibron cholérique doit être poursuivie par la réaction d'agglutination.

*Agglutination avec le sérum anti-Vibrio cholerae O :1(voir fig. 5)

C'est le temps capital du diagnostic du vibron cholérique qui entraînera la prise de mesures sanitaires et la déclaration internationale.

L'agglutination doit être faite de préférence à partir d'une culture sur GNA .Il est déconseillé d'utiliser des cultures sur milieu de kliger-Hajna ou sur TCBS qui peuvent donner des phénomènes d'auto- agglutination en eau physiologique empêchant l'interprétation de la réaction. L'agglutination doit aussi être pratiquée avec une culture de 18-24 heures.

Une souche de vibron cholérique doit obligatoirement agglutiner avec le sérum anti-O: 1 (voire fig. 5).

La souche doit aussi agglutiner avec au moins l'un des deux sérums anti-Ogawa ou anti-Inaba. Cela permettra de déterminer le sous- type de la souche :

- ❖ Inaba (agglutination avec le sérum anti- Inaba)
- ❖ Ogawa (agglutination avec le sérum anti- Ogawa)
- ❖ Hikojima (agglutination avec les deux sérums)

Le contexte clinique (essentiellement diarrhée), le contexte écologique (géographie, niveau d'hygiène, climat), les caractères morphologiques, culturels, biochimiques et immunologiques (agglutination par le sérum anti-O:1) permettent de conclure avec une quasi-certitude que la souche isolée est un vibrion cholérique (*V. cholerae* O:1) (15).

Si le sérum anti-O: 1 n'agglutine pas on fait le sérogroupage avec le sérum anti-O:139 qui va donner le séro groupe O:139 en cas d'agglutination.

1.5.1.1.3. Etude des souches auto agglutinables

Il arrive quelquefois que les souches soient auto-agglutinables en eau physiologique. Deux techniques permettent l'étude de ces souches :

- la précipitation inter faciale (test d'anneau ou « Ring test »), et
- la culture en milieu gélosé suivie d'une double diffusion.

Ces techniques nécessitent l'utilisation d'un sérum préparé par immunisation du lapin avec une fraction antigénique Ch1 + 2 extraite du vibrion cholérique.

Les travaux qui ont été menés depuis dix ans à l'Institut Pasteur ont en effet permis d'isoler du vibrion cholérique une fraction

antigénique (Ch1 + 2) impliquée dans l'agglutination du vibron cholérique.

Administrée au lapin par injection et *per os*, cette fraction antigénique provoque l'apparition d'anticorps agglutinants et vibriocides. Cette fraction Ch1 + 2 n'est présente que chez le vibron cholérique. (15)

* La précipitation inter faciale :

Cette technique consiste àensemencer un tube de gélose nutritive alcaline (GNA) à partir d'une colonie suspecte. Après 18 heures de culture, les colonies bactériologiques sont raclées et mises en suspension dans 1 ml d'eau distillée, qu'on centrifuge à 3000 tours / mm pendant 10 mm et filtrer. Ce surnageant sera versé sur le sérum anti-Ch1 + 2. S'il s'agit d'un V. cholérique, un anneau de précipitation apparait après quelques minutes (13). Cette souche doit être déclarée comme vibron cholérique.

* Culture en gélose suivie d'une double diffusion :

Cette technique consiste à cultiver la souche suspecte sous la forme d'une petite pastille sur gélose, puis à lyser les bactéries avec du toluène pour permettre la diffusion des antigènes du vibron cholérique.

Les antigènes spécifiques de ce vibron vont former un arc de précipitation avec les anticorps contenus dans le sérum anti-Ch1 + 2 déposé dans un puits creusé dans le milieu de culture gélosé.

1.5.1.1.4. Les principaux caractères de l'espèce *V.cholerae* sont :

- mobilité
- gram négatif

- saccharose +
- croissance aéro- anaérobie (culture en milieu viande-fois semi-solide, gélosé à 6 ‰ d'Agar).
- croissance en eau peptonée sans sel (EPSS) et en eau peptonée hypersalée alcaline (EPSA)
- acidification du glucose sans production de gaz.
- lactose -, mais O N P G - + .
- arabinose-.
- pas de production d'H₂S.
- indole + .
- ADH - .
- LDC + .
- O D C + .

Cependant ces caractères énumérés permettant d'identifier les souches appartenant à l'espèce *Vibrio cholerae*, ne permettent pas de faire la distinction entre les souches de vibriion cholérique (*V. cholerae* O:1) et les souches de *V. Cholerae non- O:1*.

Rappelons enfin que, pratiquement un siècle après la description en 1896, par Gruber et Durham, de l'agglutination du vibriion cholérique au moyen d'un sérum immun de lapin, cette réaction d'agglutination reste encore la seule technique spécifique et donc absolument nécessaire pour l'identification du v. cholérique.

1.5.1.2. Recherche du vibriion cholérique dans l'environnement

L'hygiéniste et l'épidémiologiste seront peut être amenés à demander une recherche de vibriion cholérique (*V. cholerae* O : 1)

dans les eaux, les aliments et sur certains points de contact inter-humains (15).

La méthodologie sera dans tous les cas sensiblement identique et adaptée aux moyens dont on dispose.

Le nombre de vibrions cholériques dans l'environnement est faible, aussi il sera nécessaire de prélever des eaux en quantité pour augmenter les chances d'isolement.

Les aliments suspects de contamination - directe ou induite par les mains sales qui les ont manipulés - ou les points de contact inter humains doivent être lavés abondamment par une eau physiologique tamponnée (EPHT) ou tamponnée avec des tampons de gaze stérile imbibés d'EPHT. Les aliments peuvent aussi être broyés en EPHT. Il existe 2 techniques:

1 techniques de concentration

2 utilisation de Billes de Polyacrylamide sensibilisées par des anticorps

1.5.2 DIAGNOSTIC INDIRECT (ETUDE DU POUVOIR VIBRIOCIDE)

La lyse du vibron cholérique en présence de sérum immun, appelée vibriocidie, connue sous le nom de phénomène de Pfeiffer, a été à l'origine de la découverte du complément par Bordet.

Il est possible de mesurer le titre d'anticorps vibriocides d'un sérum. Cette mesure appliquée à des sérums humains a permis d'établir une corrélation entre l'acquisition d'anticorps vibriocides et un état d'immunité vis-à-vis du choléra. Cette corrélation a été observée au cours d'études épidémiologiques de populations exposées naturellement au vibron cholérique ou vaccinées contre le choléra. Elle a aussi été démontrée par des épreuves avec une souche virulente pratiquées sur des volontaires vaccinés.

Les études épidémiologiques ont aussi montré que l'existence d'anticorps vibriocides dans le sérum d'un individu correspondait à un contact de cet individu avec le vibriion cholérique. Par contre il n'a pas été possible d'établir une telle corrélation entre le contact le *v. cholérique* et la présence d'anticorps anti-toxine cholérique.

Cette absence de corrélation peut être au moins en partie expliquée par les réactions immunologiques croisées observées entre la toxine cholérique et la toxine thermolabile d'*Escherichia coli* (15)

2. METHODOLOGIE

2.1. CADRE DE L'ETUDE

Il s'agit de l'évaluation d'un test d'agglutination dans le diagnostic rapide du choléra au Mali dont le travail a été fait dans le Service de Bactériologie de l'INRSP, Laboratoire de Référence du Réseau National des laboratoires pour la surveillance intégrée des maladies transmissibles et la réponse aux épidémies.

2.2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE

2.2.1. PERIODE :

Le travail s'est déroulé sur une période de huit mois, du 31 juillet 2003 au 10 mars 2004.

2.2.2. TYPE :

Nous avons réalisé une étude descriptive et comparative qui a concerné tous les échantillons de selles examinés à l'INRSP durant la période signalée plus haut.

2.3. ECHANTILLONNAGE

L'échantillon était constitué de selles prélevées chez les sujets suspects de choléra.

Ces selles provenaient des différentes régions du Mali et des communes du District de Bamako.

2.4. METHODE

2.4.1. PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES SELLES DANS LES CENTRES DE SANTE.

Les selles ont été recueillies par écouvillonnage rectale et insérées dans le milieu de transport Cary-Blair. Certaines localités ont utilisé soit un tube stérile qui se ferme hermétiquement ou du papier buvard imbibé de selles et placé dans un sachet en plastique contenant de l'eau physiologique stérile.

2.4.2. EXAMEN MACROSCOPIQUE DES SELLES

L'examen macroscopique a été effectué sur les selles recueillies en tube ou sur papier filtre. Ces selles étaient liquides parfois claires avec des grains riziformes.

2.4.3. EXAMEN MICROSCOPIQUE

-Etat frais

Il a consisté à déposer une goutte de la selle entre lame et lamelle, puis à rechercher à l'objectif x 40 la mobilité en "vol de moucheron" du vibrion cholérique.

-Après coloration de Gram

Cet examen a consisté à faire un frottis de selles sur la lame, laisser sécher, colorer au Gram et observer à l'objectif x 100 à immersion.

Nous avons recherché la présence d'une flore monomorphe faite de bacilles fins, en virgule, à Gram négatif et isolés.

2.4.4. TEST D'AGGLUTINATION DIRECT « LATEX VIBRIO CHOLERAE 0:1 AD SEIKEN »

L'agglutination a été faite directement à partir des selles recueillies en tube ou sur papier buvard. Quand l'échantillon contenait des substances solides, la selle était centrifugée à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant recueilli était utilisé pour l'agglutination conformément à la procédure écrite par le fabricant.

2.4.4.1. Principe du test:

Vibrio cholerae 0:1 peut être différencié des autres vibrions (non- 0 : 1) par sérotypage. Le sérotypage par le test d'agglutination AD SEIKEN est basé sur la détection des antigènes de groupe (O1) et de sérotype Ogawa (b) et Inaba (c). Ces antigènes sont détectés à l'aide de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux spécifiques de O1, b et c.

2.4.4.2. Présentation du kit d'agglutination :

- Le latex « a » sensibilisé
- Le latex « b » sensibilisé
- Le latex « c » sensibilisé
- Le latex control
- Les lames d'agglutination

2.4.4.3. Mode opératoire

2.4.4.3.1. Technique

1. Déposer une goutte de latex « a » sensibilisé et de latex control dans deux cercles de la carte.
2. Déposer à côté de chaque goutte de latex, une goutte de

selle liquide.

3. Mélanger les gouttes avec une baguette en changeant chaque fois de baguette d'un cercle à un autre.
4. Remuer la carte pendant environ 1 minute.
5. Lire les résultats à l'œil nu dans un endroit éclairé.

2.4.4.3.2. Interprétation :

Une agglutination claire est considérée comme positive tandis qu'une agglutination dans le control est interprétée comme non spécifique.

En cas de résultat douteux ou non spécifique avec le latex control l'échantillon doit être chauffé à 100°C pendant 10 minutes et re-testé en utilisant les mêmes procédures telles que décrites ci-dessus.

Le latex « a » correspond au sérum anti-O :1 donc l'agglutination correspond à la présence du vibrion cholérique.

Après on passe au serotypage avec les latex « b » et « c » ;
On suit les mêmes procédures comme pour le latex « a »
l'agglutination avec le latex « b » donne le serotype –Ogawa.
l'agglutination avec le latex « c » donne le serotype –Inaba.
l'agglutination avec les latex « b » et « c » donne le serotype-Hicojima
.

Les résultats positifs sont communiqués rapidement au médecin chef.

2.4.4.4. Les caractéristiques du test

2.4.4.4.1. Sensibilité:

L'agglutination n'est visible à l'œil nu que lorsque les selles contiennent un nombre de vibrions détectables par le kit.

- S'il y a une présence d'Ogawa et d'Inaba à la fois : $n = 5 \times 10^6$ bactéries/ml de selles
- S'il y a une présence d'Ogawa seul : $n = 1 \times 10^7$ bactéries/ml de selles
- S'il y a une présence d'Inaba seul : $n = 4 \times 10^7$ bactéries/ml de selles

2.4.4.4.2. Spécificité

Elle est de l'ordre de 100%. Des réactions croisées n'ont pas été obtenues avec d'autres bactéries comme *V. cholerae* non-O1, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

2.4.4.4.3. Interférence

Des substances solides ou visqueuses peuvent interférer dans la réaction d'agglutination. On les élimine par centrifugation ou par chauffage.

2.4.4.4.4. Avertissement :

- les réactifs sont utilisés « in vitro »
- Ils doivent être gardés au frais (2° à 8°C) et ne doivent jamais être congelés.
- Il faut bien homogénéiser les suspensions dans les flacons avant usage.
- Eviter d'intervertir les capuchons des flacons de réactifs.

2.4.5. LA CULTURE ET IDENTIFICATION

2.4.5.1. Enrichissement : (voir figure 6)

Tous les échantillons ont étéensemencés sur le bouillon d'enrichissement EPSA (pH = 8,5) et incubés à 37°C pendant 3 heures. Cet enrichissement a pour but, à cause du pH alcalin du bouillon, d'inhiber totalement ou partiellement les germes de la flore fécale et permettre ainsi la multiplication rapide du vibrion cholérique. Un deuxième enrichissement était effectué à partir du premier bouillon EPSA sur un autre bouillon EPSA suivi d'incubation à 37°C pendant 3 heures.

2.4.5.2. Repiquages ultérieurs

Après 3 heures, les bouillons EPSA étaient repiqués même en absence de voile sur :

- une gélose nutritive alcaline (GNA)
- une gélose TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose)

Ces milieux gélosés ont été ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures.

2.4.5.1. Aspect des colonies de vibrion cholérique

Sur GNA :

Après 24 heures les colonies étaient reconnaissables par leur forme ronde, aspect translucide et bleuté et aux bords réguliers.

Sur TCBS :

On les reconnaît par la forme arrondie, bombée et la couleur jaune (saccharose +).

2.4.5.2. Identification :

A partir du GNA, les colonies suspectes ont été identifiées par des tests suivants :

- Recherche de l'oxydase,
- Coloration de Gram (morphologie),
- Agglutination avec le sérum anti-*Vibrio cholerae* O1,
- Détermination du sérotype avec les sérums anti- *Ogawa*, *Inaba* et *Hikojima*
- Galerie biochimique d'identification (Pasteur, API 20 E)

Le diagnostic du choléra était confirmé si l'oxydase était positive, avec présence de bacilles gram négatif incurvés et mobiles et l'agglutination positive avec l'anti-sérum de groupe du *V. cholerae*.

2.4.5.3. Agglutination avec le sérum anti-*Vibrio cholerae* O : 1

2.4.5.3.1. Matériel

- Lames propres dégraissées.
- Bain d'eau de Javel à 2%.
- Séra agglutinants anti-vibrion cholérique :
 - sérum anti-O: 1 (sérum polyvalent).
 - séra anti-Ogawa et anti-Inaba (sérums mono spécifiques).
- Eau physiologique stérile (0,85%).

2.4.5.3.2. Méthode

On dépose sur :

une première lame une goutte d'eau physiologique stérile et une goutte de sérum anti O : 1 ;

une deuxième lame une goutte de sérum anti-Ogawa et une goutte de sérum anti-Inaba.

On prélève à l'anse de platine quelques colonies qu'on dépose sur les lames à côté de chacune des gouttes d'eau physiologique, de sérum anti-O:1, de sérum anti-Ogawa, de sérum anti-Inaba.

Avec une baguette stérile, on mélange doucement et progressivement les bactéries dans chacune des gouttes en changeant de baguette à chaque fois d'une goutte à une autre. On commence par l'eau physiologique, continue par le sérum anti-O:1 et termine par les sérum anti-Ogawa et anti-Inaba. L'agglutination doit apparaître rapidement en moins de 2 minutes et être fine et régulière.

On lit à l'œil nu au dessus d'une surface sombre.

2.4.5.3.3. Interprétation

Il ne doit pas y avoir d'agglutination avec l'eau physiologique, mais en cas d'agglutination, il s'agit d'une souche auto-agglutinable, et il est en conséquence inutile de poursuivre la réaction avec le sérum anti-O:1 et les autres séra.

Si la souche de v.cholérique doit obligatoirement agglutiner avec le sérum anti O: 1.

La souche doit aussi agglutiner avec au moins l'un des deux sérums anti-Ogawa ou anti-Inaba. Cela permettra de déterminer le sous-type de la souche :

- Inaba (agglutination avec le sérum Inaba)
- Ogawa (agglutination avec le sérum Ogawa)
- Hikojima (agglutination avec les deux sérums)

En cas d'agglutination avec l'un ou les deux sérums anti-Inaba et anti-Ogawa, mais pas d'agglutination avec le sérum anti-O:1, il faut

alors suspecter la valeur du lot de sérum anti-O:1 utilisé et refaire l'agglutination avec un autre lot.

Les lames utilisées sont immédiatement jetées dans un bain d'eau de Javel.

Au Mali le sérotype *Ogawa* est le plus fréquent, le sérotype *Inaba* est rare, le sérotype *Hikojima* n'a pas encore été identifié.

2.4.6. ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme a été fait selon la technique de diffusion en milieu gélosé. Le milieu utilisé était la gélose Mueller Hinton 2.

Les étapes de la technique sont les suivantes :

2.4.6.1. Préparation de l'inoculum :

- à partir de la culture de 24 heures sur GNA on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques,
- on décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile (0,85%)
- on homogénéise la suspension bactérienne,
- l'opacité a été ajustée à 0.5 Mac Farland

2.4.6.2. Ensemencement :

- on trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne,
- on essore l'écouvillon contre la paroi interne du tube en le pressant fermement,
- l'écouvillon est ensuite frotté sur la totalité de la surface du Mueller Hinton sèche, de haut en bas en stries serrées,

- cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois en pivotant l'écouvillon sur lui-même ;
- on ensemence ensuite la périphérie de la boîte de Pétri,
- l'écouvillon était rechangé pour chaque souche

2.4.6.3. Application des disques d'antibiotique :

Les disques d'antibiotiques étaient déposés sur la boîte à l'aide d'une pince à raison de 6 disques par boîte.

Les disques d'antibiotiques utilisés étaient :

- L'ampicilline
- Ciprofloxacilline
- Tétracycline
- Doxycycline
- Chloramphénicol
- Sulfamide
- Ceftriaxone (cefotaxine)

2.4.6.4. Incubation :

Les boîtes de gélose Mueller Hinton étaient incubées à 37 °C pendant 24 heures.

2.4.6.5. Lecture :

Les diamètres d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée.

Les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs critiques figurant dans le tableau de la SFM applicable aux Entérobactéries.

Les souches ont été classées en Sensibles, et Résistants.

2.4.7. LES PERFORMANCES DU LATEX :

Les performances du latex par rapport à la culture ont été déterminées de la façon suivante :

Tableau II : Performance du latex par rapport à la culture

TEST à évaluer	Culture (test de référence)	
	Positive	Négative
Positif	VP	FP
Négatif	FN	VN

FP = faux positifs

VP = vrais positifs

VN = vrais négatifs

FN = faux négatifs

2.4.7.1. La sensibilité (Se)

C'est la capacité d'un test à pouvoir détecter les sujets malades dans une population donnée, elle mesure ainsi l'aptitude d'un test à éliminer les faux négatifs.

$$\text{Se} = (\text{VP} / \text{VP} + \text{FN}) \times 100$$

Plus la sensibilité est proche de cent pour cent (100%) et moins il y a de faux négatifs.

2.4.7.2. La Spécificité (sp)

C'est la capacité d'un test à pouvoir détecter les sujets sains dans une population donnée, elle mesure ainsi l'aptitude du test à éliminer les faux positifs.

$$\mathbf{Sp = (VN/VN + FP)x100}$$

Plus la spécificité est proche de cent pour cent (100%) moins il y a de faux positifs.

2.4.7.3. La Valeur prédictive positive (Vpp)

C'est la probabilité pour qu'un patient chez qui un test est positif soit réellement atteint de la maladie.

$$\mathbf{Vpp = (VP/VP + FP) x100}$$

2.4.7.4. LA Valeur prédictive négative (VPN) :

C'est la probabilité pour qu'un patient chez qui un test est négatif ne soit pas atteint de la maladie

$$\mathbf{VPN = (VN/VN + FN) x100}$$

La prévalence influence beaucoup la valeur prédictive. Les normes admises par l'OMS (relevé épidémiologique hebdomadaire en date du 21 mars 1997) sont de quatre vingt dix neuf pour cent (99%) pour la sensibilité et de quatre vingt quinze pour cent (95%) pour la spécificité.

2.4.7.5. Efficacité de l'épreuve :

On entend par efficacité de l'épreuve son aptitude générale à identifier avec exactitude tous les positifs et tous les négatifs (absence de faux positifs et de faux négatifs). Elle combine la sensibilité et la spécificité de l'épreuve et donne une idée de son efficacité totale.

On la détermine d'après la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = (VP + VN / VP + FP + VN + FN) \times 100$$

2.4.8. ANALYSE DES DONNEES

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel épi info version 6. Le test du Khi2 a été utilisé pour comparer les proportions.

3. RESULTATS

Tableau III : Répartition des patients en groupe d'âge selon le sexe

Groupe d'âge	Sexe				Total	
	F	%	M	%	N	%
< 2	0	0	4	100	4	3,1
2-4	5	93,3	1	16,7	6	4,7
5-14	10	40	15	60	25	19
15-45	35	50,7	34	49,3	69	53,9
>45	17	70,8	7	29,2	24	18,8
Total	67	52,3	61	47,7	128	100

Kh2 = 11,6, ddl = 4, p = 0,02 ; moyenne = 28,5 ; minimum = 1 ; maximum = 85

Plus de la moitié des patients étaient des femmes (52,3%).

Les tranches d'âges de 15 à 45 ans (53,9%) étaient majoritaires.

NB : Il y avait 12 patients dont l'âge et ou le sexe sont inconnus.

Tableau IV : Répartition des échantillons selon les régions et le moyen de transport utilisé

Régions	Moyens de transport			Total
	Cary Blair	Papier filtre	selle en tube	
Bamako	12	0	9	21
Kayes	0	0	1	1
Koulikoro	35	0	9	44
Sikasso	11	0	0	11
Ségou	9	8	24	41
Mopti	12	0	4	16
Gao	6	0	0	6
Total	85 (60,7%)	8 (5,7%)	47 (33,6%)	140

Khi = 55, 32; ddl = 12; p = 0, 00001

Sur 140 échantillons reçus pour la confirmation du choléra, 85 (60,7%) étaient prélevés sur le Cary-Blair, 47(33,6%) en tube et 8(5,7%) sur papier filtre.

Tableau V : Répartition des échantillons par région selon le délai de transport.

Régions	Nombre de jours						Total
	1	2	3	4	5	6	
Bamako	7	10	3	0	0	1	21
Kayes	1	0	0	0	0	0	1
Koulikoro	34	1	7	2	0	0	44
Sikasso	0	0	9	0	0	2	11
Ségou	15	7	9	0	9	1	41
Mopti	1	4	3	3	1	4	16
Gao	0	0	5	1	0	0	6
Total	58 (41,4%)	22 (15,7%)	36 (25,7%)	6 (4,3%)	10 (7,2%)	8 (5,7%)	140

Khi2 impossible car 12 effectifs théoriques sont inférieurs à 5.

82,8 %(116 /140) des échantillons étaient acheminés dans le délai de 1 à 3 jours.

A Bamako 95%(20/21) des échantillons étaient transportés dans le délai de 3 jours.

Tableau VI : Répartition des échantillons par commune du District de Bamako selon le moyen de transport utilisé

Communes	Moyens de transport			Total
	Cary Blair	Papier filtre	Selle en tube	
II	0	0	1	1
III	1	0	3	4
IV	2	0	1	3
V	6	0	1	7
VI	3	0	3	6
Total	12	0	9	21

57,1% des échantillons du District sont transportés dans le Cary-Blair.

Tableau VII : Répartition des échantillons par commune du District de Bamako selon le délai de transport.

Communes	Nombre de jours						Total
	1	2	3	4	5	6	
II	0	1	0	0	0	0	1
III	1	2	0	0	0	1	4
IV	0	1	2	0	0	0	3
V	6	1	0	0	0	0	7
VI	0	5	1	0	0	0	6
Total	7	10	3	0	0	1	21

Dans le District de Bamako, 95%(20/21) des échantillons des communes étaient transportés dans les délais allant de 1 à 3 jours.

Tableau VIII : Résultat de la culture par région

Régions	Culture			Total
	Positive	%	Négative	
Bamako	9	42	12	21
Kayes	0	0	1	1
Koulikoro	18	40,9	26	44
Sikasso	9	81,8	2	11
Ségou	28	68,3	13	41
Mopti	11	68,8	5	16
Gao	4	66,7	2	6
Total	79	56,4	61	140

Khi = 13,65; ddl = 6; p = 0,03

Sur 140 échantillons mis en culture, 79 soit 56,4% étaient positives. La proportion des cultures positives était plus élevée dans les régions de Gao (66,7%), Ségou (68,3%), Mopti (68,8%) et Sikasso (81,8%). Elle était moins élevée à Koulikoro (40,9%), Bamako (42%) et à Kayes (0%).

Tableau IX: Résultat de la culture par commune du District de Bamako

Communes	Culture			Total
	Positive	%	Négative	
II	1	100	0	1
III	3	75	1	4
IV	0	00	3	3
V	3	42,9	4	7
VI	2	33,3	4	6
Total	9	42,8	12	21

Khi = 5,49 ; ddl = 4 ; p = 0,24

Sur 21 échantillons en provenance des communes, 9 soit 42,8% étaient positifs à la culture. La proportion des cultures positives des communes IV, V et VI était inférieure à 50%.

Tableau X : Résultat de la culture selon le moyen de transport utilisé.

Moyen de transport	Culture			Total
	Positive	%	Négative	
Cary-Blair	43	50,6	42	85
Papier filtre	8	100	0	8
Selle en tube	28	59,6	19	47
Total	79	56,4	61	140

$\text{Khi}^2 = 7,55; p = 0,02 \text{ ddl} = 2$

Les prélèvements de selles sur papier filtre ont donné 100% de cultures positives contre 59,6% pour les selles en tube et 50,6% pour les prélèvements sur le Cary-Blair.

Tableau XI : Résultat de la culture selon le délai de transport.

Nombre de jours	Culture			Total
	Positive	%	Négative	
1	25	43,1	33	58
2	12	54,4	10	22
3	27	75	9	36
4	4	66,6	2	6
5	7	70	3	10
6	4	50	4	8
Total	79	56,4	61	140

La proportion des cultures positives était de 75% pour le délai de 3 jours, 70% pour les délais de 5 jours et 50% pour les délais de 6 jours.

Tableau XII : Résultat de la culture par classe d'âge

Classe d'âge	Culture			Total
	Positive	%	Négative	
< 2	0	0,0	4	4
2 - 4	3	50	3	6
5 - 14	16	64	9	25
15 - 45	38	54,3	32	70
> 45	13	54,2	11	24
Total	70	54,3	59	129

$\text{Khi}^2 = 5,74$; $\text{ddl} = 4$; $p = 0,2$

Dans la tranche d'âge de 2 à 4 ans, 50% des échantillons étaient positifs en culture.

La tranche d'âge de 5 à 14 ans avait le plus d'échantillons positifs (64%)

Tableau XIII : Résultat de la culture par sexe.

Sexe	culture			Total
	Positive	%	Négative	
M	34	55,7	27	61
F	37	53,6	32	69
Total	71	54,6	59	130

$\text{Khi}^2 = 0,06, p = 0,8 \quad \text{ddl} = 1$

Il y avait plus de cultures positives chez les patients de sexe masculin (55,7%) que chez les patients de sexe féminin (53,6%). La différence n'est pas statistiquement significative.

Tableau XV : Sensibilité des souches de *Vibrio cholerae* 01 aux antibiotiques

ANTIBIOTIQUES	Nombre de souches testées	Nombre de souches sensible	%	Nombre de souches résistantes	%
Ampicilline	60	57	95	3	5
Ceftriaxone	30	30	100	0	00
Tétracycline	47	46	98	1	2
Doxycycline	23	23	100	0	00
Sulfamide	49	0	00	49	100
Ciprofloxacine	54	54	100	0	0
Chloramphénicol	39	7	18	32	82

95% à 100% des souches testées étaient sensibles à l'ampicilline, au ceftriaxone, à la tétracycline, à la doxycycline et à la ciprofloxacine. La totalité des souches étaient résistantes aux sulfamides. Vis à vis du chloramphénicol, 82% des souches étaient résistantes.

TABLEAU XVI: Résultat des agglutinations des selles avec le latex

méros d'identification	Latex a		Latex a et b		Latex a et c		Latex a, b, et c			Culture	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	N
01		N		N		N		N		N	N
02	P		P			N		N	P		
03	P		P			N		N	P		
04	P		P			N		N	P		
05		N		N		N		N			N
06		N		N		N		N			N
07		N		N		N		N			N
08		N		N		N		N			N
09	P		P			N		N	P		
10		N		N		N		N			N
11		N		N		N		N			N
12		N		N		N		N			N
13	P		P			N		N	P		
14	P		P			N		N	P		
15	P		P			N		N	P		
16		N		N		N		N			N
17		N		N		N		N			N
18		N		N		N		N			N
25	P		P			N		N	P		
27		N		N		N		N			N
29	P		P			N		N	P		
30	P		P			N		N	P		
41		N		N		N		N	P		
42	P		P			N		N	P		
43	P		P			N		N	P		
44	P		P			N		N	P		
45	P		P			N		N	P		
46	P		P			N		N	P		
47	P		P			N		N	P		
48	P		P			N		N	P		
51	P		P			N		N	P		
52	P		P			N		N	P		
69		N		N		N		N			N
70	P		P			N		N	P		
71	P		P			N		N	P		
75	P		P			N		N	P		
76	P		P			N		N	P		
77		N		N		N		N			N
78	P		P			N		N	P		
79	P		P			N		N	P		
80	P		P			N		N	P		
84	P		P			N		N	P		
88		N		N		N		N			N
89	P		P			N		N	P		
90	P		P			N		N	P		
91	P		P			N		N	P		
92		N		N		N		N			N
93		N		N		N		N			N
95	P		P			N		N	P		
97	P		P			N		N	P		
TOTAL	32	18	32	18	0	50	0	50	33	17	

Sur 50 échantillons soumis à la culture, 33 étaient positifs pour *V.cholerae O1 sérotype Ogawa* et 17 étaient négatifs. Au latex, 32 des mêmes échantillons ont agglutiné avec le réactif a et b signifiant ainsi la présence du même séro groupe et sérotype de la bactérie et 18 étaient négatifs.

Tableau XVII : Résultat du latex selon le moyen de transport utilisé.

Moyen de transport	Latex			Total
	Positif	%	négatif	
Selle en tube	25	59,5	17	42
Papier filtre	7	87,5	1	8
Total	32	64	18	50

Sur 50 échantillons 32 soit 64% étaient positifs au latex. Selon le moyen de transport utilisé 87,5% des échantillons prélevés sur papier filtre et 59,5% des échantillons en tube étaient positifs.

Tableau XVIII : Résultat du latex selon le délai de transport

Nombre de jours	Latex positif	%	Latex négatif	Total
1	9	45	11	20
2	9	69,2	4	13
3	6	85,7	1	7
4	2	66,6	1	3
5	5	83,3	1	6
6	1	100	0	1
Total	32	64	18	50

Khi = 28,47 ; ddl = 15 ; p = 0,018

La proportion des cultures positives était de 69,2% à 2 jours, 85,7% à 3 jours et 83,3% à 5 jours.

Tableau XIX : Performance du latex par rapport à la culture

LATEX	Culture		Total
	Positive	Négative	
Positif	32	0	32
Négatif	1	17	18
Total	33	17	50

Sensibilité **SS** = $32 : 33 \cdot 100 = 96,9\%$

Spécificité **SP** = $17 : 17 \cdot 100 = 100\%$

Valeur prédictive positive **VPP** = $32 : 32 \cdot 100 = 100\%$

Valeur prédictive négative **VPN** = $17 : 18 \cdot 100 = 94,4$

La capacité du latex à détecter les cas de choléra est de 96,9

La capacité du latex à détecter les individus non atteints de choléra est de 100%

La probabilité d'être atteint de choléra lorsque le latex est positif est de 100%

La probabilité de ne pas être malade lorsque le latex est négatif est de 94,4%

Efficacité = $(\text{vrai positif} + \text{vrai négatif} / \text{vrai positif} + \text{faux positif} + \text{vrai négatif} + \text{faux négatif}) \times 100 = \mathbf{98}$

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

4.1. PROVENANCE DES ECHANTILLONS

L'épidémie de choléra qui a éclaté au Mali du 31 juillet 2003 au 10 mars 2004 a touché le District de Bamako et cinq régions administratives du pays (Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti et Gao). Cent quarante échantillons de selles ont été collectés chez des patients suspects et envoyés à l'Institut National de Recherche en Santé Publique par des agents de santé pour la confirmation du diagnostic clinique. Chaque échantillon était accompagné de la fiche de Surveillance Intégrée de la Maladie et Riposte (SIMR) portant des informations sur le patient et sur l'échantillon collecté. Sur les 140 échantillons, la quantité de réactif disponible n'a permis d'analyser que 50 échantillons par le latex.

4.2. AGE / SEXE

L'analyse des informations collectées a montré des insuffisances dans la complétude de la fiche SIMR. Sur 140 patients, 12 soit 8,6% avaient l'âge et le sexe inconnus. Parmi les 128 restants soit 91, 4%, 54% avaient l'âge compris entre 15 et 45 ans avec une prédominance du sexe féminin (52,3%) par rapport au sexe masculin (47,7%). La moyenne d'âge était de 28,5 ans

(min. = 1, max = 85). DOUMBIA au Mali (16) ; COULANGES

(9) en 1971 au Nord Cameroun ; KWABIA au Mali ; SARR au Sénégal (36) ont trouvé une prédominance féminine. COULIBALY à Abidjan (9), BOURGEADE (6), LEVIGUELOUX en Afrique Occidentale (26) ont trouvé une égale répartition des deux sexes.

4.3. MOYENS DE TRANSPORT

Environ 61% des échantillons étaient transportés dans le Cary-Blair. Avant le début de l'épidémie, ce milieu de transport avait été pré positionné dans le District de Bamako et dans toutes les Directions Régionales de la santé du pays. Les localités n'ayant pas reçu à temps le milieu de transport avant le début de l'épidémie, ont utilisé le papier filtre (5,7%) ou prélevé les selles dans un tube stérile hermétiquement fermé (33,3%).

4.4. CULTURE

Exceptée la région de Kayes, la culture a confirmé que l'épidémie de choléra du District de Bamako et des régions était due au *V.cholerae* 01 sérotype *Ogawa*. La proportion des cultures positives était de 56,4%. Elle était supérieure à 60% dans toutes les régions sauf dans le District de Bamako (42%), les régions de Kayes (0,0%) et de Koulikoro (41%).

L'étude a montré que selon le moyen de transport utilisé, la proportion des cultures positives était plus élevée pour les échantillons prélevés sur le papier filtre (100%) et en tube(59,6%) que dans le Cary-Blair(50,6%). Le manque de formation des agents de santé à la pratique du prélèvement par écouvillonnage rectale pourrait expliquer cela.

Plus de 80% (116/140) des échantillons de selles ont été acheminés dans un délai de 1 à 3 jours. La proportion des cultures positives a diminué avec le délai de transport des échantillons. Ainsi pour des délais de 3 jours, 75% des cultures étaient positives contre 70% à 5 jours et 50% à 6 jours. Nous n'avons pas établi par cercle la corrélation entre la proportion des cultures positives et le délai de transport des échantillons. On note cependant que dans le District

de Bamako où 95%(20/21) des échantillons sont transportés dans le délai de 3 jours, la proportion des cultures positives des communes IV, V et VI étaient inférieures à 50%. Ceci dénote une insuffisance dans l'application de la définition clinique des cas.

Nos résultats ont montré la présence du *V. cholerae* O1 chez 70 patients sur 129 suspects soit 54,3%. Le groupe d'âge de 5 à 14 ans était le plus touché par l'épidémie avec plus de 60% des cultures positives. Ce résultat est proche de celui trouvé par DOUMBIA (16) dans une étude sur le choléra, menée à Djenné en 2001. COULIBALY à Abidjan trouve que le choléra touche tous les âges de manière quasiment égale (9). BOURGEADE (6) et SIROL au Tchad (44) trouvent que les enfants en bas âge sont touchés en fin d'épidémie. Selon CARPENTIER au Bangladesh, pays endémique du choléra, les enfants sont les plus atteints dans les zones rurales tandis qu'en période épidémique, les adultes sont aussi sinon plus atteints que les enfants (7).

Le *V.cholerae* a été isolé chez 50% des patients âgés de 2- 4 ans. Ceci pose le problème de la définition clinique des cas de choléra chez les enfants de moins de 5 ans dans notre pays. Nous n'avons pas trouvé de différence significative liée au sexe. La culture était positive chez 54 % des femmes contre 56% des hommes.

4.5. SENSIBILITE DU V. CHOLERAEE AUX ANTIBIOTIQUES

Nous avons trouvé que 100% des souches de *V.cholerae* O1 testées étaient sensibles à la doxycycline, et 98% à la tétracycline, un antibiotique habituellement utilisé dans le traitement du choléra. La sensibilité avait beaucoup diminuée vis-à-vis du chloramphénicol (18%) et des sulfamides (0%). Ce résultat est proche de celui trouvé en 1997 en zone rurale à l'Ouest du Kenya par ROGER L. et coll.(32).

4.6. LE LATEX *VIBRIO CHOLERAEO* :1 « AD SEIKEN »

L'évaluation du latex a montré la présence du *V.cholerae* O1 dans plus de 64% des échantillons qu'il soit prélevé en tube ou sur papier filtre. Selon le moyen de transport utilisé 59,5% des échantillons prélevés en tube étaient positifs contre 87,5% prélevés sur papier filtre. Par rapport au délai de transport, 85,7% des échantillons étaient positifs à 3 jours contre 83,3% à 5 jours et 100% à 6 jours. La différence est statistiquement significative ($p = 0,01$).

Nous avons déterminé les performances du latex par rapport à la culture. Les résultats sont superposables. La sensibilité était de 96,9% et la spécificité 100%. L'efficacité était de 98%. En terme de sensibilité la culture a décelé un faux négatif chez un patient dont l'échantillon avait été prélevé sur papier filtre. En effet par la culture on amplifie le nombre de bactéries ce qui fait qu'elle est plus sensible mais à condition que la bactérie soit vivante. Par contre pour le latex la quantité des bactéries est déterminante pour la positivité de la réaction d'agglutination. Bien que nous n'ayons pas déterminé le seuil détectable par le latex dans le contexte du laboratoire, nous pensons que cet échantillon devrait contenir moins de bactéries par rapport au seuil de 1×10^7 cellules/ml fixé par le fabricant pour le sérotype Ogawa.

Les valeurs extrinsèques étaient satisfaisantes. La valeur prédictive positive était de 100% et celle négative de 94,4%.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études faites sur le latex *Vibrio cholerae* O1 AD SEIKEN. Cependant l'étude la plus récente menée au Japon en 2000 par YOSHINAO et coll., a montré les performances intrinsèques d'un Kit (InluA-AD « Seiken ») par rapport à la PCR pour l'identification du Virus influenza type A.

En dehors du latex *Vibrio cholerae* O1 AD SEIKEN, d'autres tests rapides ont été utilisés dans le diagnostic rapide du choléra.

Les bandelettes toxine cholérique (TC) O : 1 ; et des bandelettes LPS O : 1 et O : 139 ont été mises au point et évaluées à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (IPP).

Nous pensons que les performances extrinsèques du latex doivent être vérifiées sur le terrain en période d'épidémie sur un échantillon plus grand.

5- CONCLUSION :

- ✓ Le milieu de transport Cary-Blair a été largement utilisé par les régions en épidémie pour le transport de 61% des échantillons.
- ✓ Plus de 80% des échantillons ont été transportés dans un délai de 3 jours.
- ✓ La proportion des cultures positives est de 56,4%.
- ✓ Le *V.cholerae* a été identifié chez 50% des enfants âgés de 2 à 4 ans.
- ✓ La proportion des cultures positives est inférieure à 50% dans le District de Bamako.
- ✓ Plus de 90% des souches de *V.cholerae* O1 sont sensibles à la tétracycline, doxycycline, ciprofloxacine, ampicilline et au ceftriaxone.
- ✓ Plus de 80% des souches sont résistantes au chloramphénicol
- ✓ Toutes les souches isolées sont résistantes aux sulfamides.
- ✓ Le latex offre de nombreux avantages :
 - Sensibilité = 96,9%,
 - Spécificité = 100% ;
 - Efficacité = 98
 - Valeurs prédictives positives = 100%
 - Valeurs prédictives négatives = 94,4%

6- RECOMMANDATIONS :

Au terme de cette étude nous formulons les recommandations suivantes à l'endroit de:

La Direction Nationale de la Santé (service de surveillance épidémiologique)

- ✓ Utilisation du latex *Vibrio cholerae* O1 AD SEIKEN dans les localités en épidémie en vue de la confirmation rapide des cas.
- ✓ Révision de la définition clinique des cas de choléra en tenant compte des enfants âgés de moins de 5 ans.

L'Institut National de Recherche en Santé Publique

- ✓ Mettre en place un système de contrôle de qualité pour valider les résultats du latex des zones en épidémie.
- ✓ Mener une étude en vue de déterminer dans les conditions du terrain les valeurs extrinsèques du latex *Vibrio cholerae* O1 AD SEIKEN sur un échantillonnage plus grand.
- ✓ Poursuivre la surveillance de la sensibilité du *Vibrio cholerae* aux antibiotiques utilisés dans le traitement.
- ✓ Formation des agents de santé aux techniques de prélèvement, conditionnement et transport des échantillons de selles.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-Barua D & Merson M.** Prevention and control of cholera In: D Barua and W B Greenough , cholera. Plenum Med Book Co, New York and London, 1992; 3: 329-349.
- 2- Baumann P, Furniss A L & Lee JV.** Genus I *Vibrio* In: NR Krieg and JG Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, *williams & Wilkins Co, Baltimor, 1984*; : 518-538.
- 3-Bhattacharya MK, Bhattachary SK, Garg S, Saha PK, Dutta D, Balakrish Nair G, Deb BC & Das KP .** Outbrea of *Vibrio cholerae* non 01 in India and Bangladesh. *Lancet 1993*; **341**:1346-1347.
- 4- Black RE, Levine M M, Clements M L, Young CR, AM & Holmgren J.** Protective effcacy in killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subuit of cholera toxin. *Infect. Immun*, 1987 ;**55** : 1116-1120.
- 5- Bougoudogo F.** Contribution à l'étude de l'immunité protectrice contre le choléra. Thèse de Doctorat en microbiologie Université de Paris XI 1994.
- 6- Bourgeade, Rey M.** Le choléra Mal Inf Mal Parasit Paris 1979 ; **5** : 12.
- 7- Carpentier C C/J.** Le choléra In TR HARRISON. Principe de médecine interne Paris 1988 ; 4 édit, Flammarion.
- 8- Cosnett J E .** The origins of intravenous fluid therapy *Lancet, 1989; i*: 768-771.
- 9- Coulanges B Coulanges P.** L'épidémie de choléra au Sultanat de Goulfey. *Med Trop 1971* ;**31** :635-645.
- 10- Coulibaly M Eholie S et AL.** Les diarrhées à Abidjan. *Bull Soc Path Exo 1993*; **86**: 492-493.
- 11- Craig SW.** A permeability factor (toxin) found in cholera. Stools and culture filtrate and its neutralisation by convalescent cholera sera natural 1965; 207: 614-616.

- 12- CDV Update.** Cholera outbreak in Peru, Ecuador, and Colombia
MMWR, 1991; **40**: 225-227.
- 13- Denka SEIKEN CO, LTD.** *Vibrio cholerae* 01 "AD SEIKEN" A kit for the detection and serotyping of *Vibrio cholerae* 01 by slide latex agglutination 50 tests 1996, **9** update: 1-3.
- 14- De SN & chatterjee DN.** An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucus membrane J Path. Bact, 1953; **66**: 559-562.
- 15- Dodin A.** Actualisation du cholera. In : Maladies infectieuses Encyclo Med chir Edition techniques, Paris, 1992 : 1-4.
- 16- Dodin A & Fournier J M.** Méthode de laboratoire pour le diagnostic du vibriion cholérique et autres vibrions. *Institut Pasteur, 1991 ; Paris .*
- 17- D Doumbia :** Caractéristiques épidémiologiques du choléra à Djenné (Mopti) d'Octobre à Novembre 2001.Thèse de med Bamako 2003.
- 18- Eric Pichard** (1998) : Polycopie de pathologie infectieuse (page 99-100).
- 19- Felix H :** la pandémie OMS, cholérique en 1991 cahier de santé 1991 ; 1: 241 -251.
- 20- Finkel R.A & Lospalluto J.J.:** Pathogenesis of experimental cholera: prépartion and isolation of choleraegen and choleraegenoid J. *Exp Med*, 1969; 130: 185-202.
- 21- Gallut J.** Contribution à l'étude de l'antigène thermostable du vibriion cholérique. Application pratiques de l'analyse antigénique O. Ann, Inst Pasteur, 1949; **76** : 1-14.
- 22- Gardner AD and Venkatraman.** The antigens of the cholera group of vibrios. J Hyg London 1935; **35**: 262-282.

23-Glassri, Hual, Armaael AL. Emergence of multiply antibiotic resistant *Vibrio cholerae* in Bangladesh J Infect Dis 1980; 142: 939-42.

24- Gotschlichf . Uber cholera – und cholera – ähnliche Vibrionen unter den aus Mekka zurück- kehrenden Pilgern. Z Hyd Infekkr, 1906; **53** : 281.

25- Gotschlichf. Vibrions cholérique isolés au campement de Tor. Retour du pèlerinage de l'année 1905. Rapport adressé au président conseil quarantenaire d'Egypte, Alexandrie (cité dans : *Bull. Inst. Pasteur*, 1905 ; **3** : 726).

26- Jesudason MV & John T J (1993). Major Shift prévalence of non O1 Eltor *Vibrio cholerae* .Lancet 1993; **341**: 1091

27- Le Viguelloux J, Doury J C. Epidémiologie du choléra moderne. Med Trop 1971; **31**: 20-27.

28- Matern, Lemaoue, Mukumahmet AL. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio cholerae* and shigelles cousin diarrhoea out-breaks in the eastern Africa region: 1994, 1996 east Afr Med J 1997; **74**: 193-197.

29- Mint M A O M. Le choléra dans la région de Dakar. Thèse de Med Dakar 1987.

30- Mosley W.H, Aziz K MA, Rahman ASMM, Chowdhurg AKMA, Fahimuddin. Field trials of monovalent ogawa and Inaba cholera vaccines in rural Bangladesh: *Three years of observation Bull WHO* 1973;**49**: 381-387.

31- Pollitzer R. Le choléra O.M.S Genève 1960 :1065 P.

32- Roger L et coll. Transmission of epidemic *Vibrio cholerae* O1 in rural western Kenya. Associated with drinking water from lake Victoria: an environmental reservoir for cholera? Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 271-276.

33- Sack R B & Miller C E. Progressive changes of *Vibrio cholerae* serotypes in germ-free mice infected with *Vibrio cholerae*. J Bacteriol, 1969; **99**:688-695.

34- Sakazaki R. Bacteriology of *Vibrio* and related organism. .
In: D Barua and W B Greenough. Plenum Med Book Co, New York & London 1992; 3: 37-55.

35-Sakazaki R & Donovan T J. Serology and épidemiology of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*: Tbergan (ed), Methods in Microbiology. Academic Press, London, 1984; 16 :271-289.

36- Sakazaki R, Tamurak, Gomez C Z & Sen R. Serological studies on the cholera group of vibrios. Japon J Med Sci. Biol 1970; 23:13-20.

37- Sarkar B L, De S P, Sircar B K Garg S, Nair G B & Deb BC. Polymyxin B Sensitive strains of *Vibrio cholerae non 0:1* from recent epidemic in India. Lancet, 1993 ; **341**:1090-1091.

38- Sarr S M B. Choléra et urbanisme à Dakar
Thèse de Med 1987 n°66 Dakar.

39- Sheehy T W, Sprinz C H, Augerson M W S & Formal S B. Laboratory *Vibrio cholerae* infection in United States. J Am Med Assoc 1966; **197**: 321-326.

40- Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima, Asai y Yamais , nakazato T, Nair GB, Albert M J & takeda y. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. Current Microbiol, 1994; **28**: 175-178.

41- Shimada T, Nair GB, Deb B C, Albert M J & Sack R B .
Outbreak of *Vibrio cholerae non 01* in India and Bangladesh,
Lancet 1993; **341**: 1346-1347.

42- Shimida T& Sakazaki R. *Vibrio fluvialis*: A new serogroup (19) possessing the Inaba factor of *Vibrio cholerae 0:1*. Jap J Med Sci Biol, 1987; **40**:153-157.

43- Shimida T & Sakazaki R. A bioserogroup of *Vibrio cholerae* non-0:1 with Inaba antigen factor of cholera vibrio. J Appl Bacteriol, 1988; **64**:141-144.

44- Shimida T, Sakazaki R & Oue M. A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* 0:1. J App Bacteriol, 1987; **62**:453-456.

45- Strocher U H, Karageorgos L E, Morona R & Manning P A. Serotype conversion in *Vibrio cholerae*. Proc Acad Sci USA, 1992; **89**:2566-2570.

46- Sirol J Felix et AL. A propos de l'épidémie de choléra à Fort-Lamy (Tchad) en mai-juin 1971. Med Trop 1971; **31** : 629-634.

47- Threlfall EJ, Rowe B and Huqi. Plasmid- encoded multiple antibiotic resistances in *Vibrio cholerae* El Tor from Bangladesh. Lancet 1980; i: 1247-1248.

48-Véron M & Popoff M. *Vibrio cholerae* In: L. Leminor and M Véron Bacteriologie médicale. Flammarion Médecine – Sciences, Paris, 1984: 476-493.

49- Yoshinao T Hideaki M. Evaluation of Influenza Virus Type A Detection Kit. The journal of the Japanese Association for Infectious Disease, 2000 :841-845.

FICHE SIGNALITIQUE

NOM : Mme SANOGO

PRENOM : RAMATA

TITRE : Evaluation d'un test d'agglutination le Latex AD « SEIKEN » dans le diagnostic rapide du choléra au Mali.

ANNEE ACADEMIQUE: 2003-2004

PAYS D'ORIGINE : MALI

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie de Bamako.

SECTEUR D'INTERET : Bactériologique

RESUME :

L'épidémie de choléra qui a éclaté au Mali au mois de juillet 2003 a touché presque toutes les régions du pays. Des échantillons de selles prélevés chez des malades suspects de choléra étaient envoyés par les agents de santé au Laboratoire National de Référence de l'Institut National de Recherche en Santé Publique pour la confirmation.

Le latex *Vibrio cholerae* O1 AD « SEIKEN » a été utilisé pour la première fois par le laboratoire de bactériologie pour confirmer l'épidémie de choléra. C'est un test qui permet de faire à la fois la détection du *V.cholerae* O1 directement à partir de la selle et à partir des colonies isolées à la culture. L'évaluation des résultats par rapport à la culture montre une sensibilité de 96,9%, une spécificité de 100% et une efficacité de 98%. Les valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement : 100% et 94,4%.

Le latex *V.cholerae* O1 AD « SEIKEN » peut être utilisé dans les régions pour la confirmation des épidémies de choléra directement à partir des selles. Ceci permettra de raccourcir le délai de notification des résultats et d'entreprendre rapidement des actions en vue de maîtriser l'épidémie.

Mots clés: choléra, latex, Mali.

ANNEXE 1

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES ET DES DILUANTS

MILIEU DE CARY-BLAIR

Thioglycolate de sodium	1,5 g
Na ₂ HPO ₄	1,1 g
NaCl	5 g
Gélose	5 g
Eau distillée	compléter à 1000 ml
pH = 8,4	

EAU PHYSIOLOGIQUE TAMPONNEE (EPHT)

Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	22,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
NaCl	36 g
Eau distillée	compléter à 5000 ml

EAU PEPTONNEE ALCALINE (EPA)

Peptone bactériologique	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	compléter à 1000 ml
PH = 8,6	

GELOSE NUTRITIVE ALCALINE(GNA) (g /l)

Extrait de viande	15
Peptone bactériologique	5
Chlorure de sodium	5
Agar bactériologique	15
Eau distillée	1000 ml

P H = 8,6

GELOSE TCBS (g /l)

Extrait de levure	5
Peptone bactériologique	10
Thiosulfate de sodium	10
Bile de bœuf	8
Saccharose	20
Chlorure de sodium	10
Citrate ferrique	1
Bleu de bromothymol	0,04
Bleu de thymol	0,04
Agar bactériologique	15
Eau distillée	compléter à 1000 ml

pH = 8,6

EAU PEPTONÉE SANS SEL (EPSS)

Peptone	20 g
Eau distillée	compléter à 1000 ml

pH=8,4

ANNEXE 2

Fiche de collecte des données Choléra 2003

Numéro d'identification du patient : /_____ /

Région Ou District /...../ Cercle /...../

commune /...../ Village /...../

Nom : _____ Prénom : _____ Age /__ / Sexe /__ /

Prélèvement

Date de prélèvement : __/__/__

Date de réception au laboratoire national : __/__/__

Prélèvement de Selle en tube : OUI /__ / NON /__ /

Prélèvement sur Cary blair : OUI /__ / NON /__ /

Prélèvement sur papier filtre : OUI /__ / NON /__ /

Résultat du Latex :

Latex positif : /__ / Latex négatif : /__ /

Serotype : Ogowa /__ / Hikojima /__ / Inaba /__ /

Culture :

Positive V. choléra 01 : /__ / Négative V. choléra 01 : /__ /

Serotype : Ogowa Hikojima /__ / Inaba /__ /

ATB :

Ampicilline

Ciprofloxacilline

Doxycycline

Sulfamide

Ceftriaxone

S

R

I

Nitrofurane

Chloramphénicol

Cotrimoxazole

Tétracycline

S

R

I

