

Protocoles simplifiés de diagnostic du choléra au Laboratoire national de santé publique, Port-au-Prince, Haïti

Simplified Protocols for Cholera Diagnosis in the National Public Health Laboratory, Port-au-Prince, Haiti

K. Moise · J.-H. Henrys · S. Rebaudet · E. Rossignol · J. Bony · C. Raccurt

Reçu le 4 avril 2018 ; accepté le 9 août 2018
© Société de pathologie exotique et Lavoisier SAS 2018

Résumé Le temps nécessaire au rendu des résultats de culture des selles avec antibiogramme par la méthode classique pratiquée au Laboratoire national de santé publique (LNSP) d'Haïti s'étale sur une durée de 80 heures en moyenne. Ce délai peut être encore allongé par le processus de rendu des rapports d'analyse aux sites de prise en charge, ce qui retarde de manière significative les réponses communautaires face au choléra. Cette étude vise à évaluer la fiabilité de résultats partiels par rapport au processus complet. Nous avons inclus 250 échantillons de selles analysés au LNSP de janvier à septembre 2017 en déterminant la spécificité, la valeur prédictive positive et le rapport de vraisemblance positif de l'identification des colonies jaunâtres et de l'identification des colonies jaunâtres oxydase positive. Par rapport au processus complet de culture des selles, l'identification des colonies jaunâtres a montré une spécificité de 56 %, une valeur prédictive positive de 69 % et un rapport de vraisemblance positif de 2,27. Quant à l'identification des colonies jaunâtres oxydase positive, la spécificité est de 77 %, la valeur prédictive positive de 81 % et le rapport de vraisemblance positif de 4,31. La communication de résultats partiels aux équipes de terrain à ces étapes serait utile pour guider les interventions en dépit d'une relative diminution de leur fiabilité par rapport au *gold standard*.

Mots clés Choléra · Test diagnostique · Culture · Réponse communautaire · Laboratoire · Département de l'Ouest · Département du Centre · Département du Sud · Département du Sud-Est · Artibonite · Haïti · Grandes Antilles

Abstract While the incidence of cholera is decreasing in Haiti, the time required to render stool culture results with antibiogram using the standard method practiced at the National Public Health Laboratory (LNSP) remains at an average of 80 hours. This delay can be further lengthened by the process of rendering the analysis reports to the sites of care which significantly delays the community responses to cholera. Through this study, we have aimed to assess the reliability of partial results. We have studied 250 stool samples that were analyzed between January and September 2017 at the LNSP by determining the specificity, positive predictive value and positive likelihood ratio of i) the identification of yellowish colonies and ii) the identification of yellowish colonies with a positive oxidase assay in comparison to the stool culture. Compared to the entire process, the identification of yellowish colonies showed a specificity of 56%, a positive predictive value of 69% and a positive likelihood ratio of 2.27. The identification of yellowish colonies with a positive oxidase assay showed a specificity of 77%, a positive predictive value of 81% and a positive likelihood ratio of 4.31. The communication of partial results at these steps would likely guide community interventions despite a relative decrease in reliability of the results.

K. Moise (✉) · J.-H. Henrys · C. Raccurt
Université Quisqueya, 618 av. Jean-Paul-II,
Port-au-Prince, Haïti
e-mail : kennymoise@gmail.com

S. Rebaudet
Hôpital européen de Marseille,
Assistance publique-Hôpitaux de Marseille,
13915 Marseille, France

E. Rossignol · J. Bony
Laboratoire national de santé publique, Delmas 33,
Port-au-Prince, Haïti

Keywords Cholera · Diagnosis test · Culture · Community response · Laboratory · Ouest Department · Centre Department · Sud Department · Sud-Est Department · Artibonite · Haiti · Greater Antilles

Introduction

L'épidémie de choléra a débuté en Haïti en octobre 2010 suite à l'introduction du *Vibrio cholerae*, sérotype O1, biotype El Tor [3,12]. D'octobre 2010 au 30 juin 2018, 818 688 cas suspects et 9 776 décès ont été enregistrés [7]. Au cours de la phase initiale de l'épidémie, où le nombre journalier de cas enregistrés a culminé à plus de 4 000 par jour et celui des décès à près d'une centaine, la priorité était de limiter la létalité, d'où l'utilisation de critères cliniques pour établir le diagnostic conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [10]. Après le lancement du Plan d'élimination du choléra en Haïti 2013–2022 à partir de mi-2013, le ministère de la Santé publique et de la Population (MSPP) et la Direction nationale de l'eau potable et de l'assainissement (DINEPA) ont adopté pour objectif la réduction de la transmission communautaire de la maladie [8]. Avec l'Unicef et d'autres partenaires, une stratégie nationale et coordonnée d'alerte et de réponse rapide et ciblée a été mise en place à compter de mi-2013 [13]. Afin de cibler les interventions de réponses autour des cas confirmés de choléra, il devint nécessaire d'établir un diagnostic microbiologique plus systématique et plus rapide. En outre, la réduction spectaculaire de l'incidence au cours des dernières années rend à présent réaliste l'échantillonnage de tous les cas suspects.

En Haïti, le Laboratoire national de santé publique (LNSP) analyse les prélèvements recueillis au sein des différents sites de diagnostic et de prise en charge ainsi que par les équipes mobiles d'intervention rapide. Le protocole établi (identifié ici comme étant le *gold standard*) se fonde sur l'isolement sur un milieu à base de thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS) des échantillons prélevés, suivi du repiquage sur un milieu non sélectif, le test à l'oxydase, le sérogroupage, le sérotypage puis l'antibiogramme. Dans le meilleur des cas, ce processus s'étale sur trois jours, de l'arrivée des échantillons à la sortie des résultats. Mais, il peut durer plus d'une semaine lorsque les échantillons arrivent en fin de semaine, avec pour conséquence des résultats communiqués trop tard pour ajuster la réponse communautaire. La phase postanalytique est également susceptible de retarder la disponibilité des résultats.

Alors que l'incidence du choléra est en train de décroître notablement, la méthodologie mise en œuvre pour assurer la confirmation microbiologique des cas nécessite une série d'étapes étalées sur plusieurs jours et requiert une charge de travail ne permettant d'analyser qu'un nombre limité d'échantillons par jour. Il en résulte que les analyses microbiologiques ne peuvent être utilisées en temps réel pour guider les actions de lutte dans la communauté. Le rendu précoce de résultats partiels pourrait permettre de fournir des informations utiles à la gestion communautaire. Cependant, il faut au préalable

évaluer dans quelle mesure la fiabilité des résultats obtenus est susceptible d'être altérée par les différentes simplifications que l'on pourrait apporter au protocole.

La démarche suivante s'inscrit dans l'optique de renforcer les capacités des laboratoires à fournir des résultats partiels de diagnostic du choléra sans en compromettre la fiabilité.

Matériels et méthode

Cette étude a été conduite au LNSP d'Haïti entre janvier et septembre 2017. Elle inclut 250 échantillons de selles transportés des départements de l'Ouest, du Centre, du Sud, du Sud-Est et de l'Artibonite au laboratoire pour une culture au cours de cette période. L'autorisation du laboratoire a été obtenue pour utiliser les données de la base d'enregistrement des résultats de culture des selles et des registres de validation des résultats. Aucune information permettant d'identifier les patients n'a été relevée.

Collecte des échantillons

L'unité de coordination et de logistique du LNSP est chargée de transporter les échantillons du Grand Nord, de l'Ouest et du Grand Sud au LNSP. Dans le département du Centre, les sites de prise en charge transportent eux-mêmes les échantillons au LNSP. La plupart du temps, ils sont transportés dans un milieu de transport Cary-Blair pour permettre la viabilité des bactéries dans un milieu temporaire propice. Parfois les échantillons sont transportés dans des pots secs contenant 10 µl de selles liquides.

Procédures de culture des selles et validation des résultats

Isolement avec gélose TCBS

À l'arrivée du prélèvement de selles au laboratoire (j0), il est ensemencé sur une boîte de Pétri contenant un milieu sélectif TCBS. La gélose est ensuite incubée pendant 24 heures à 37° C. Les colonies susceptibles d'appartenir à l'espèce *V. cholerae* apparaissent sur la gélose sous forme de petites colonies de 2 à 4 mm de diamètre, avec une coloration jaunâtre qui provient de la fermentation du saccharose dans le milieu (Fig. 1).

Repiquage sur milieu non sélectif

À j1, au moins une colonie jaunâtre est choisie puis repiquée sur un milieu non sélectif comme la gélose d'infusion de cœur (HIA). Les géloses sont à nouveau incubées à 37° C pendant 24 heures.

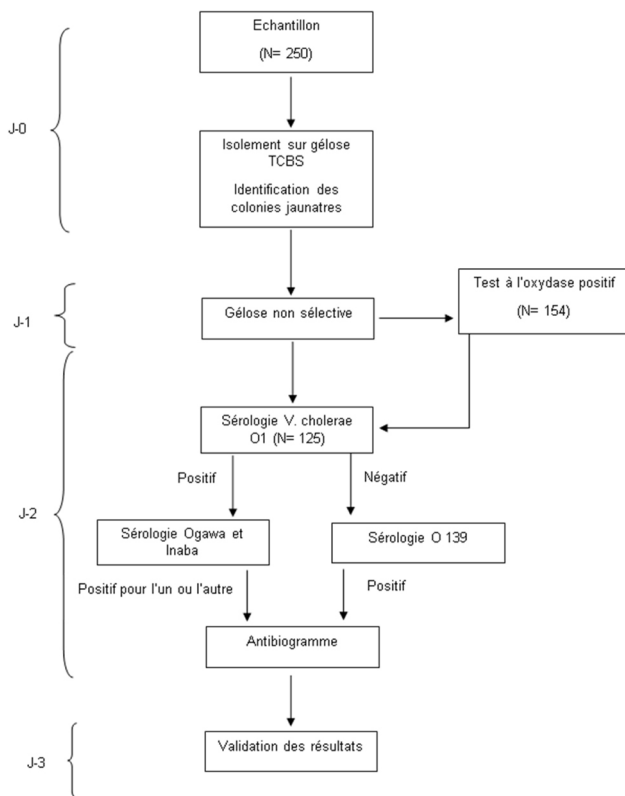


Fig. 1 Procédure de culture des selles et validation des résultats / *Procedure of stool culture and validation of results*

Test à l'oxydase

À j2, deux à trois gouttes de réactif d'oxydase sont mises sur un morceau de papier-filtre dans une boîte de Pétri. La colonie est étalée sur le papier-filtre. Dans le cas d'une réaction positive, la culture bactérienne devient rapidement violet foncé, identifiant ainsi des bacilles à Gram négatif. Si le test à l'oxydase est négatif, le LNSP ne poursuit pas le processus.

Sérogroupe et sérotypage

Le sérogroupe se réalise le même jour. Si le test à l'oxydase est positif, on réalise l'agglutination sur lame avec les anticorps anti-O1 et anti-O139.

L'identification des sérotypes se fonde sur l'agglutination avec les antisérums spécifiques du sérotype. L'identification de ces sérotypes n'est valide qu'avec les souches du séro-groupe O1. Les réactions d'agglutination avec les deux anti-sérums Inaba et Ogawa doivent être examinées simultanément et la réaction la plus forte et la plus rapide indique le sérotype.

Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé de manière routinière à j2 sur gélose Mueller-Hinton puis incubé pendant 24 heures.

L'antibiogramme inclut les antibiotiques suivants : amoxicil-line, tétracycline, sulfamides, cotrimoxazole. Le résultat est disponible à j3.

Validation et rendu des résultats

Selon le protocole du LNSP, les résultats sont validés par le chef de service de bactériologie puis saisis sur la base de données et communiqués directement à la Direction d'épi-démiologie, de laboratoire et de recherche (DELR). De la réception des échantillons à la saisie des résultats, le processus s'étale sur trois jours au minimum. Des techniciens n'étant pas disponibles au laboratoire certains week-ends, les échantillons reçus dans la seconde moitié de la semaine sont ensemencés la semaine suivante. Mais le laboratoire ne communique pas les résultats directement aux acteurs de terrain.

Nous avons utilisé des stratégies simplifiées pour poser le diagnostic du choléra. Il s'agit d'appliquer le protocole du LNSP en communiquant des résultats partiels à certaines étapes du processus.

Méthodes alternatives de détection du *Vibrio cholerae* O1

Identification des colonies jaunes

Il s'agit de communiquer les résultats partiels de la culture des selles à partir de l'identification des colonies jaunes.

La gélose est inoculée pendant 24 heures à 37° C. Les colonies soupçonnées d'appartenir à l'espèce *V. cholerae* apparaissent sur la gélose sous forme de petites colonies jaunâtres. Cette technique permet la disponibilité de résultats partiels en un jour.

Test à l'oxydase à partir d'un milieu non sélectif

Il s'agit de communiquer les résultats partiels de la culture des selles à partir du test à l'oxydase.

La gélose est inoculée pendant 24 heures à 37° C. Les colonies soupçonnées d'appartenir à l'espèce *V. cholerae* apparaissent sur la gélose sous forme de petites colonies jaunâtres. Une colonie jaunâtre, au moins, est choisie puis ensemencée sur un milieu non sélectif. Cette technique permet la disponibilité de résultats partiels en deux jours.

Analyse des données

La culture des selles a été considérée comme positive pour *V. cholerae* O1 lorsque l'ensemble du processus a abouti à la mise en évidence de colonies jaunâtres sur TCBS, oxydase positive présentant une agglutination avec des anticorps anti-O1 confirmée par une agglutination anti-Inaba ou anti-Ogawa. Pour notre analyse, nous avons relevé les résultats

de la culture sur gélose TCBS et test à l'oxydase dans les feuilles de validation des résultats au LNSP.

L'analyse des données a été faite en calculant la spécificité, les valeurs prédictives et rapports de vraisemblance. La sensibilité, la valeur prédictive négative et le rapport de vraisemblance négatif n'ont aucune signification dans cette étude puisque le laboratoire arrête le processus s'il n'y a pas de colonie jaunâtre puis d'oxydase positive. Les intervalles de confiance pour la spécificité ont été calculés à partir du score de Wilson [9]. Pour les rapports de vraisemblance positifs, les intervalles de confiance ont été calculés grâce à la méthode de Simel et al. [15] et pour les valeurs prédictives, la méthode de Mercaldo et al. [6] en utilisant le logiciel Microsoft Excel 2016.

Résultats

Un échantillon de 250 selles a été analysé. La culture a été positive pour *V. cholerae* O1, Inaba dans 125 échantillons (50 %) (Tableau 1).

Des colonies jaunâtres ont été identifiées dans 180 échantillons (72 %). Le test à l'oxydase s'est avéré positif dans 154 échantillons (61,6 %). Comparée à la procédure complète du laboratoire, l'identification des colonies jaunâtres a montré une spécificité de 56 %, une valeur prédictive positive de 69 % et un rapport de vraisemblance positif de 2,27. Quant à l'identification des colonies jaunâtres oxydase positive, elle a montré une spécificité de 77 %, une valeur prédictive positive de 81 % et un rapport de vraisemblance positif de 4,31.

Discussion

À travers cette étude, nous avons évalué la fiabilité des résultats partiels à l'étape de l'identification des colonies jaunâtres et au test à l'oxydase dans le processus de diagnostic du choléra au LNSP. À cette phase de l'épidémie, caractérisée par une incidence décroissante du choléra, l'identification

des colonies jaunâtres multipliant par deux le risque qu'un cas suspect soit confirmé présente un intérêt opérationnel. Elle permet de gagner au moins deux jours par rapport au processus complet, ce qui est important pour les équipes à qui il est demandé d'intervenir une deuxième fois lorsque le cas est confirmé. En cas d'absence de colonies jaunâtres à j0 ou d'oxydase négative à j1, le LNSP arrête le processus d'identification du *V. cholerae*, ramenant la sensibilité virtuellement à 100 % et le rapport de vraisemblance négatif proche de zéro, même quand ces indicateurs n'ont pas été calculés dans l'étude. La communication de cette information annule une deuxième intervention des équipes de terrain, le cas étant non confirmé.

Baron et al. ont montré que l'identification des colonies jaunâtres oxydase positive est adaptée aux capacités d'un laboratoire microbiologique de routine et peut être considérée pour l'identification présomptive de *V. cholerae* [1]. Depuis le début de l'épidémie de choléra en Haïti, les résultats microbiologiques ne sont jamais communiqués directement aux acteurs de terrain. La communication de résultats partiels à cette étape du processus du LNSP serait primordiale pour guider les interventions sur le terrain. Mais il demeure le défi d'établir une stratégie apte à les communiquer en temps réel et à diminuer les délais de mise en culture des échantillons au laboratoire.

Cette étude comporte certaines limites. La taille de l'échantillon est limitée en raison du nombre d'échantillons de selles acheminés au laboratoire. Une étude sur les tests rapides en Haïti a inclus 644 échantillons au cours de la phase aiguë de l'épidémie [2]. Mais dans d'autres cas, moins de 200 échantillons ont été utilisés [4]. De plus, le choix du *gold standard* n'a pas permis d'évaluer la sensibilité réelle de l'identification des colonies jaunâtres testées à l'oxydase. Il n'est pas possible de déterminer les conséquences de cette procédure versus la confirmation par le *gold standard* puisqu'elle n'est pas encore en application au LNSP.

Certaines améliorations peuvent être apportées au protocole du LNSP en utilisant des tests rapides de diagnostic en dépit de leur limite par rapport aux tests biochimiques classiques [5]. Par exemple, la réalisation de tests rapides avec

Tableau 1 Comparaison des résultats de l'identification des colonies jaunâtres, des colonies jaunâtres testées positives à l'oxydase et de la culture des selles des 154 échantillons de selles reçus au LNSP en 2017 / Comparison of the results of the identification of yellowish colonies, yellowish colonies tested positive in the oxidase assay and stool culture for 154 stool samples received at the LNSP in 2017

	Positif	Négatif	Spécificité	Valeur prédictive positive	Rapport de vraisemblance positif	
Colonies jaunâtres	250	180	70	56 % (47–64)	69 % (65–73)	2,27 (1'87–2'77)
Colonies jaunâtres et oxydase positive	250	154	96	77 % (69–83)	81 % (76–86)	4,31 (3'13–5'93)
<i>Vibrio cholerae</i> O1	154	125	29	N/A	N/A	N/A

une étape d'enrichissement à l'eau peptonée alcaline incubée pendant 4-6 heures à température ambiante produit des résultats similaires à la culture et peut être envisagée [11]. De plus, la spectrométrie de masse est susceptible de produire des résultats supérieurs aux méthodes biologiques pour identifier le *V. cholerae* [14,16].

Conclusion

Nous avons montré qu'à cette phase de régression de l'épidémie de choléra l'identification de colonies jaunâtres oxydase positive sur milieu non sélectif peut jouer un rôle dans le diagnostic biologique du choléra et réduire le délai de disponibilité de résultats en vue de guider la réponse communautaire. Toutefois, la communication de ces résultats sur le terrain demeure le défi le plus important, tout en appliquant des méthodes fondées sur les tests rapides et la spectrométrie de masse pour améliorer le protocole.

Remerciements Les auteurs remercient le Pr Renaud Piarroux ainsi que l'équipe du Laboratoire national de santé publique qui ont facilité cette recherche.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

1. Baron S, Chevalier S, Lesne J (2007) *Vibrio cholerae* in the environment: a simple method for reliable identification of the species. *J Health Popul Nutr* 25:312–8
2. Bony J, Rossignol E, Dahourou G, et al (2013) Performance and utility of a rapid diagnostic test for cholera: notes from Haiti. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76:521–3. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.010
3. Frerichs RR, Keim PS, Barrais R, Piarroux P (2012) Nepalese origin of cholera epidemic in Haiti. *Clin Microbiol Infect* 18: E158–63. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03841.x. Epub 2012 Apr 17
4. Harris JR, Cavallaro EC, de Nóbrega AA, et al (2009) Field evaluation of crystal VC Rapid Dipstick test for cholera during a cholera outbreak in Guinea-Bissau. *Trop Med Int Health* 14:1117–21. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02335.x. Epub 2009 Jul 17
5. Israil AM, Balotescu C, Alexandru I (2003) Comparative study of classical and commercial microtest API galleries in the diagnosis of cholera infection. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 48:145–8 [article en roumain]
6. Mercaldo ND, Lau KF, Zhou XH (2007) Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. *Stat Med* 26:2170–83
7. MSPP; DELR (2018) Rapport du Réseau national de surveillance choléra, 26^e semaine épidémiologique 2018 (du 24 au 30 juin 2018). 17 p
8. MSPP; DINEPA (2012) Plan d'élimination du choléra en Haïti, 2013–2022. Port-au-Prince, 115 p
9. Newcombe RG (1998). Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med* 17:857–72
10. OMS (2004) Flambées de choléra : évaluation des mesures mises en œuvre en cas de flambées et amélioration de la préparation. 90 p
11. Ontweka LN, Deng LO, Rauzier J, et al (2016) Cholera rapid test with enrichment step has diagnostic performance equivalent to culture. *PLoS One* 11:e0168257. doi: 10.1371/journal.pone.0168257. eCollection 2016
12. Orata FD, Keim PS, Boucher Y (2014) The 2010 cholera outbreak in Haiti: how science solved a controversy. *PLoS Pathog* 10: e1003967. doi: 10.1371/journal.ppat.1003967. eCollection 2014 Apr
13. Rebaudet S, Bulit G, Gaudart J, et al (2018) The national alert-response strategy against cholera in Haiti: a four-year assessment of its implementation. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/259366>
14. Rychert J, Creely D, Mayo-Smith LM, et al (2015) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol*. 53:329–31. doi: 10.1128/JCM.02666-14. Epub 2014 Nov 12
15. Simel DL, Samsa GP, Matchar DB (1991). Likelihood ratios with confidence: sample size estimation for diagnostic test studies. *J Clin Epidemiol* 44:763–70
16. Telesmanich NR, Chaïka SO, Vodanitskaia SIu, et al (2014) The application of mass spectrometry technique MALDI-TOF for inter-specific differentiation of closely-related vibrio. *Klin Lab Diagn*. 59:27–8, 37–8 [article en russe]