

Rapport annuel d'activité

2018

**Centre national de référence
des Vibrions et du Choléra**



**Année d'exercice
2017**

SOMMAIRE

Résumé analytique.....	4
Analytical summary.....	5
1/ Missions et organisation du CNR.....	6
1-1. Equipe et organigramme du CNR.....	6
1-2. Locaux et équipements, évolutions intervenues en 2017.....	6
1-3 Démarche qualité du CNRVC en 2017.....	7
2/ Activités d'expertise.....	8
2-1. Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2017.....	8
2-2. Evaluation des techniques et réactifs.....	9
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	9
2-4 Collections de matériel biologique.....	9
2-5 Activités d'expertise de l'année 2017.....	9
2-5.1 Echantillons étudiés.....	10
2-5.2 Niveau de caractérisation réalisé.....	12
2-6 Activités de séquençage.....	12
3/ Activités de surveillance.....	13
3-1. <i>Vibron cholérique</i>	13
3-1.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	13
3-1.2 Evolution et caractéristiques des infections.....	14
3-1.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux.....	15
3-1.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	18
3-1.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	18
3-2. <i>Vibrions non cholériques</i>	20
3-2.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	20
3-2.2 Evolution des caractéristiques des infections.....	21
3-2.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux.....	24
3-2.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	25
3-2.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	19
4/ Alerte.....	27
4-1. Procédure d'alerte.....	27
4-2. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année.....	27
5/ Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	28
5-1. Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	28
5-1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé.....	28
5-1.2 Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques.....	28
5-1.3. Guides élaborés.....	28
5-1.4. Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNR.....	29
5-1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé.....	30
5-2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires nationales et internationales.....	30
5-2. Conseil et expertise pour d'autres cibles.....	29
6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	31
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2017.....	31
6.2. Liste des publications et communications 2017.....	32
7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	33
8/ Programme d'activité 2018-2019.....	34

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

1.2 Organisation du CNR

1.3 Locaux et équipements

1.4 Collections de matériel biologique

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Techniques de référence, marqueurs épidémiologiques disponibles

2.2 Techniques recommandées par le CNR

Annexe 3 : Autres informations

Résumé analytique

Le CNR des Vibrions et du Choléra (CNRVC) assure la surveillance microbiologique du choléra et des autres infections à vibrions (infections à vibrions non cholériques) sur le territoire français. Il participe également à la surveillance et à la lutte contre le choléra à l'échelle internationale, et collabore avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou microbiologie environnementale pour la surveillance des infections à Vibrions non cholériques (VNC).

• **Le choléra** reste aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique dans toutes les régions du monde, représentant une charge estimative de 1.4 à 4.3 millions de cas et 28 000 à 142 000 décès par an, selon l'OMS. Le continent africain est le plus touché, le choléra est également très présent dans la région des Amériques, en Haïti, et en Asie où il circule de manière endémique. Le RSI 2005 encourage les pays confrontés à des épidémies de choléra à rapporter les cas à l'OMS. Cette maladie est à déclaration obligatoire en France, où des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques peuvent survenir de façon sporadique. La déclaration doit être faite dans les délais les plus brefs aux autorités de santé après confirmation d'identification par le CNR. **En 2016 et 2017, pour la première fois depuis plus de 10 ans, aucun cas n'a été diagnostiqué sur le territoire français.** La détection et l'investigation systématique des cas reste cependant justifiées afin de détecter tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave, surveiller les co-exposés à une même source de contamination, et du fait des risques de propagation dans certains groupes de populations dans les territoires français d'outre-mer. Le CNR collabore avec les pays étrangers soumis à des épidémies de choléra, particulièrement l'Afrique, en apportant une aide à l'identification et la caractérisation des souches, également au suivi de leur résistance aux antibactériens. **Plus de 700 échantillons, prélèvements de selles ou souches isolées, ont été reçus et étudiés au CNR en 2017**, dans le cadre d'activités de surveillance et de travaux en collaboration. Le CNR a ainsi participé à la caractérisation des souches responsables de l'épidémie au Yémen, la plus importante jamais enregistrée. L'apport essentiel des données de séquençage complet du génome pour le suivi et la compréhension de la circulation des souches de *V. cholerae* O1 a été démontré par des études de génomiques menées sur le continent africain et en Amérique Latine, publiées en 2017, qui ont apporté un éclairage nouveau sur la compréhension de la circulation des souches au niveau global. Le CNR est présent au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, dans laquelle il s'implique en particulier par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire". En octobre 2017, 35 partenaires de la GTFCC, dont l'Institut Pasteur, ont signé un engagement sans précédent dans la lutte contre le choléra passant par la mise en œuvre d'une feuille de route mondiale ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030.

• **Les vibrions non cholériques (VNC)** d'intérêt médical, essentiellement les espèce *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, sont à l'origine d'infections sporadiques, gastro-entérites, infections suppuratives, septicémies, dont l'évolution peut être extrêmement sévère, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives. Les VNC sont des hôtes naturels du milieu marin, l'ingestion d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits en particulier, reste la voie essentielle de contamination. Ces infections représentent un véritable problème de santé publique aux États-Unis et au Japon, mais peu de données existent sur leur incidence réelle en Europe. L'analyse des données de surveillance cliniques, microbiologiques et épidémiologiques, des cas confirmés depuis 1995 en France a été menée en 2017 conjointement par le CNR et Santé Publique France; 10 cas de vibriose en moyenne ont été rapportés annuellement par le CNRVC, une augmentation sans précédents a été enregistrée en 2017 avec **26 cas d'infections à VNC**, associés à 6 espèces de *Vibrio*, majoritairement *V. cholerae* (n=10) et *V. parahaemolyticus* (n=8). Un lien avec le milieu marin, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer, a été établi dans 80% des cas, qui se sont manifestés majoritairement par des gastroentérites. Les cas ont été fréquemment signalés dans les zones côtières et particulièrement sur la côte atlantique, mais une notion d'exposition probable à l'étranger, dans des pays à risque, a été signalée dans 40% des cas. Cette augmentation du nombre de cas pourrait être attribuée aux températures élevées enregistrées en 2017 et/ou à l'évolution des techniques de diagnostic (PCR multiplex syndromique, Spectrométrie de masse). Les médecins doivent soupçonner une infection à *Vibrio* chez des patients souffrant de gastro-entérites dès lors qu'ils ont la notion de consommation récente de produits de la mer crus, de produits importés, ou d'exposition au milieu marin.

Analytical summary

The National Reference Centre for Vibrios and Cholera (CNRVC) is responsible for the microbiological surveillance of cholera and non-cholera vibrio (NCV) infections in France. It is also involved in international cholera monitoring and control activities and collaborates with laboratories specialising in food hygiene or environmental microbiology for the surveillance of NCV infections.

• **Cholera** remains a major public health problem worldwide, with an estimated 1.4 to 4.3 million cases and 28,000 to 142,000 deaths per year, according to the WHO. Africa is the most affected continent, but cholera is also frequent in the Americas (particularly Haïti) and in Asia, where it is endemic. The RSI 2005 encouraged countries faced with cholera epidemics to report cases to the WHO. Cholera is a notifiable disease in France, where isolated cases of imported cholera may occur sporadically in travellers returning from zones of epidemic or endemic cholera. Cases must be notified to the health authorities as soon as possible after their detection by the CNRVC. **In 2016 and 2017, for the first time in 10 years, no case was diagnosed on French soil.** The detection and systematic investigation of cases nevertheless remains justified, to ensure the detection of all cases likely to progress to clinically serious forms, to monitor other individuals exposed to the same source of contamination and due to the risk of spread in certain groups of the population in French overseas territories. The CNRVC collaborates with other countries subject to cholera epidemics, particularly in Africa, assisting with the identification and characterisation of strains and the monitoring of resistance to antibacterial agents. **Almost 700 samples, stool specimens or isolated strains were received and studied by the CNRVC in 2017**, in the framework of surveillance and collaborative activities. The CNRVC was involved in characterising the strains responsible for Yemeni epidemic, the largest ever recorded. The need for complete genome sequencing data for the monitoring and comprehension of patterns of *V. cholerae* O1 circulation was demonstrated by genomic studies performed in Africa and Latin America and published in 2017, which shed light on strain circulation worldwide. The CNRVC is involved in the WHO Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), in which it leads the Laboratory Surveillance Working Group. In October 2017, 35 GTFCC partners, including Institut Pasteur, signed an unprecedented commitment to combating cholera through the implementation of a roadmap aiming to decrease cholera mortality by 90% by 2030.

• **Non-cholera vibrios** (NCVs) of medical interest, essentially *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, cause sporadic infections, gastroenteritis, suppurative infections, and septicæmia, which may follow an extremely severe clinical course. They also, more rarely, cause collective food poisoning events. NCVs are naturally present in the marine environment. The ingestion of contaminated foods, such as raw or insufficiently cooked seafood in particular, remains the principal contamination route. These infections are a major public health problem in the United States and Japan, but few incidence data are available for Europe. An analysis of clinical, microbiological and epidemiological surveillance data, and of confirmed cases since 1995 in France was performed jointly by the CNRVC and *Santé Publique France* in 2017. The CNRVC reported a mean of 10 cases of vibriosis per year. An unprecedented increase was recorded in 2017, **with 26 cases of NCV infection**, due to six *Vibrio* species, principally *V. cholerae* ($n=10$) and *V. parahaemolyticus* ($n=8$). A link with the marine environment, seafood consumption or direct contact with seawater was established in 80% of cases, mostly manifesting as gastroenteritis. Cases were frequently reported in coastal zones, particularly those on the Atlantic coast, but possible exposure abroad, in countries of known risk, was noted in 40% of cases. This increase in the number of cases may be due to the high temperatures recorded in 2017 or to changes in diagnostic techniques (multiplex syndromic PCR, mass spectrometry). *Vibrio* infection should be suspected in patients with gastroenteritis reporting the recent consumption of raw seafood, imported products or exposure to the marine environment.

1/ Missions et organisation du CNR

Les missions et objectifs majeurs du CNR sont présentés en *annexe 1* du présent rapport.

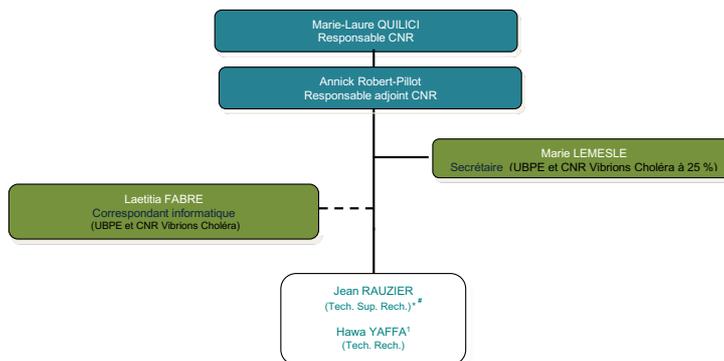
1.1 Equipe et organigramme du CNRVC

Les effectifs pour le CNR par catégories de fonctions sont conformes au dossier de candidature pour le mandat en cours, et sont présentés en Annexe 1 du présent rapport.

Annick Robert-Pillot, responsable-adjointe du CNR, a pris ses fonctions le 17 août 2017.

Organigramme du CNR

 Unité des Bactéries Pathogènes Entériques	Support d'enregistrement Organigramme du CNR VIBRIONS CHOLERA	Version C
---	--	--------------



Légende :

— Relation hiérarchique et fonctionnelle
- - - Relation fonctionnelle

⁽¹⁾ Correspondant Qualité du CNR

⁽²⁾ Correspondant Métrologie et Matériel du CNR

¹Affectation temporaire sur crédits OMS pour étude de recherche ponctuelle



LA VERSION GARANTIE À JOUR DE CE DOCUMENT EST EN LIGNE SUR [Webcampus](#)
CE DOCUMENT EST À L'USAGE EXCLUSIF DE L'INSTITUT PASTEUR – REPRODUCTION & DIFFUSION INTERDITE

PAGE 1 SUR 1

1.2 Locaux et équipements, évolutions intervenues en 2017

Acquisition d'un système automatisé complet Thermo Scientific Sensititre™ permettant la détermination, par une technique quantitative standardisée, de CMI en microdilution en microplaque SENSITITRE et leur lecture à l'aide du système Sensititre VIZION.

1.3 Démarche qualité du CNRVC en 2017

Le CNRVC fait partie des 14 Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ces CNR sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

- La synthèse 2017 de la démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) est présentée en Annexe 1, point 1-5, du présent rapport.

- L'année qualité 2017 du CNRVC s'est organisée comme suit :

CNRVC	Périodes de réalisation
Dépôt de la demande d'extension	1 ^{er} avril 2016
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2017
Finalisation de la revue qualité du CNRVC	Novembre 2017
Audits internes qualité et technique	Technique : 12/07/2017 (C. Roques)
	Qualité: 11/10/2017 (V. Sauvannet)
Finalisation du dossier de validation de méthode " Recherche des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant pour les sous-unités A et B de la toxine cholérique"	10/10/2017
Audit d'extension	23-25 janvier 2018

Suite à cet audit, la confiance des évaluateurs a été accordée au CNR. Les conclusions officielles de l'évaluation doivent être communiquées au LREMS et publiées sur le site du COFRAC prochainement.

- Les perspectives 2018 pour le CNRVC se calqueront sur ce qui est présenté en Annexe 1 pour le LREMS. A terme la portée d'accréditation du CNRVC concernera l'agglutination sur lame pour le sérotypage des vibrions cholériques (*V. cholerae* O1 et O139) et l'identification et la caractérisation moléculaires (recherche des gènes codant pour les principaux facteurs de pathogénicité) des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. vulnificus*.

- En 2017, le CNR a participé à un contrôle de qualité externe, organisé par le CHU de Liège, par l'analyse de 4 souches de *Vibrio*, *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.

2/ Activités d'expertise

Les activités d'expertise présentées ici concernent :

- Les souches de vibrions cholériques isolées de cas importés sur le territoire français, également de cas diagnostiqués en zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, envoyées au CNR pour confirmation de diagnostic et caractérisation. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNR, ces études permettent également de connaître les souches de vibrions cholériques susceptibles d'être importées en France ; 670 échantillons ont été envoyés au CNR en 2017 (846 en 2016). A noter la modification du mode de conditionnement des échantillons consistant à déposer les selles directement sur papier buvard, ce qui facilite l'envoi en réduisant à la fois les aspects réglementaires et le coût.
- Les souches de vibrions non cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le nombre d'échantillons, souches isolées et prélèvements (selles ou fecal swabs) envoyés au CNR a augmenté de façon significative en 2017, en lien avec la mise en place dans de nombreux laboratoires de microbiologie d'un diagnostic syndromique des gastroentérites par PCR sur prélèvements cliniques, incluant un diagnostic *Vibrio*.

La description des techniques disponibles au CNR est présentée en *Annexe 2*.

2.1 Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2017

- La réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en milieu gélosé se faisait jusqu'en 2016 selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2013). Le CNR s'est aligné en 2017 sur les recommandations techniques de l'EUCAST 2017 et leurs critères d'interprétation pour les Entérobactéries.
- 250 souches de *V. cholerae* ont été testées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™, intéressante en particulier pour les antibiotiques pour lesquels il n'existe pas de critère d'interprétation pour les Entérobactéries par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les molécules testées correspondaient à une plaque commerciale EUVSEC, qui pourrait être optimisée pour les *Vibrio* par la mise au point d'une plaque spécifiquement dédiée.
- La technique de macrorestriction de l'ADN bactérien par Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) pour le sous-typage des souches de *V. cholerae* O1, qui était la méthode de référence, n'est plus réalisée au CNR car s'étant avérée insuffisamment discriminante.
- Le séquençage complet des génomes bactériens (WGS, whole-genome sequencing) n'a pas encore été mis en place pour les activités d'expertise du CNR, mais son utilisation pour des activités de recherche a permis le développement d'outils exploitables pour la recherche *in silico* des séquences nucléotidiques ciblées aujourd'hui pour la caractérisation moléculaire des souches par PCR.
- Le CNR a abordé l'analyse des souches de *Vibrio* par spectrométrie de masse (Maldi-Tof), avec un focus plus particulier sur les souches de *V. cholerae*, dont les spectres ne sont pas présents dans toutes les bases de données. Un travail a été initié dans l'objectif de créer une base de données protéomiques et génomiques, 146 souches de *V. cholerae*, dont 122 déjà séquencées, de différents

sérogroupe ont été analysées, ainsi que quelques souches de 4 autres espèces de *Vibrio*. Ce travail très préliminaire doit être développé avant d'envisager l'utilisation du Maldi-Tof pour l'identification des *Vibrio*.

2.2 Evaluation de techniques et réactifs

Le CNR teste pour la société BIO-RAD les lots de sérums agglutinants polyvalents destinés au diagnostic de *V. cholerae* O1, sur un panel de 43 souches de référence de différents sérogroupe de l'espèce *V. cholerae*. Deux expertises ont été réalisées au CNR en 2017.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- Le CNR est régulièrement sollicité par des laboratoires de biologie médicale, de sécurité alimentaire et par des organismes de formation pour des demandes de méthodes d'isolement et d'étude (par des méthodes de bactériologie classique et moléculaires) des différentes espèces de *Vibrio*.
- Le CNR a transféré en 2017 ses protocoles d'analyse PCR, dont les méthodes soumises à l'accréditation, pour l'identification et la caractérisation de souches de vibrions cholériques à l'Instituto Nacional de Saude Publica à Luanda, Angola.

2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont présentées en *Annexe 1*.

Toutes les souches de *Vibrio* confirmées au CNR chaque année sont conservées selon les modalités décrites dans cette annexe.

Le CNR n'a pas été sollicité pour l'envoi de souches de référence cette année.

2.5 Activités d'expertise de l'année 2017

Le CNR étudie des souches isolées sur le territoire français, éventuellement des prélèvements en fonction du contexte et après accord préalable du responsable du CNR. Les prélèvements sont des échantillons de selles ou des "fecal swabs".

Les échantillons étudiés en provenance de l'étranger peuvent être des souches isolées, envoyées pour confirmation d'identification et caractérisation, ou des prélèvements, adressés par des microbiologistes étrangers, par l'OMS et par des organisations humanitaires. Ce sont essentiellement des échantillons issus de zones d'endémie ou d'épidémies cholériques. Les prélèvements se présentent :

- soit sous la forme de papiers filtres humides, trempés dans les selles liquides et placés dans un tube hermétiquement fermé après adjonction de quelques gouttes de sérum physiologique, permettant la mise en culture et l'isolement de souches, également un diagnostic par PCR,
- soit, de plus en plus fréquemment, sous la forme de papiers filtres secs, sur lesquels les échantillons de selles sont absorbés sur un papier buvard. Ces échantillons sont inactivés et ne peuvent être analysés que par des méthodes moléculaires (extraction d'ADN et PCR).

2.5.1 Echantillons étudiés

Durant l'année 2017, **741** échantillons, en provenance de France ou de l'étranger, ont été réceptionnés au CNR, dans le cadre d'activités d'expertise, certains donnant lieu à des travaux en collaboration.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons reçus au CNR en 2017

Origine	Expertise			Total	
	Clinique		Alimentaire		CQE
	P	S	S		S
France	29	26	12	67	
Etranger	380	290	-	674	
	409	316	12	741	

P: prélèvements, S: souches isolées. CQE: contrôles qualité externes

Echantillons d'origine clinique

Tableau 2 : Provenance des échantillons français d'origine clinique

	Expéditeur	Prélèvements	Souches isolées
Métropole	LABM/Plateaux techniques	21	15
	CHU/CH	4	10
Territoires d'Outre-Mer	Institution de santé publique		1
	CHU	4	
Total		29	26

Tableau 3: Nombre de souches isolées ou confirmées Vibrio en fonction du type d'échantillons reçus

Origine	Nbre d'échantillons reçus au CNR		Nbre de souches de vibrions isolées		Total souches isolées
	P	S	P	S	
France	29	26	5	21	26
Etranger	380	290	14	83	97

Parmi les prélèvements français,

- 15 étaient des selles, 9 ont été étudiées, aucune souche de *Vibrio* n'a été isolée.
- 14 étaient des fecal swabs, tous ont été étudiés, 5 ont été positifs pour *Vibrio* en culture.

A noter que tous ces échantillons étaient positifs pour Vibrio par PCR syndromique.

Tableau 4 : Provenance des échantillons étrangers d'origine clinique

	Expéditeur	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons
RDC	CTC	97	Papiers filtres humides
Yemen	CPHL	246	Papiers filtres secs
Yemen	CPHL	41	Souches isolées
Malawi	Ministry of Health	34	Papiers filtres secs
Eastern Africa	AMREF (ONG)	209	Souches congelées -80°C
Arabie Saoudite	Ministry of Health	3	Souches isolées
Arabie Saoudite	Ministry of Health	3	Prélèvements (selles)
Sud Soudan	WHO	33	Souches isolées
Angola	Institut National de santé publique	3	Souches isolées
Liban	Ministère de la santé publique	1	Souche isolée
	Total	670	

CPHL: Central. Public Health Laboratories - CTC : centre de traitement du choléra.

Echantillons d'origine alimentaire

Ces échantillons ont été étudiés au CNR dans le cadre de ses échanges avec le LNR *Vibrio*, Laboratoire de sécurité des aliments, de de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer. Le LNR réalise la recherche des *Vibrio* pathogènes pour l'homme par voie alimentaire (*V. cholerae* O1 ou O139, *V. cholerae* non-O1/non-O139 possédant les gènes de la toxine cholérique, *V. parahaemolyticus* possédant au moins l'un des gènes des hémolysines TDH ou TRH, *V. vulnificus* selon l'origine géographique des produits) dans les produits de la mer présentés à l'importation, dans le cadre d'autocontrôles ou sur demande du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Il peut être amené à solliciter le CNR pour des confirmations d'identification pour des analyses qu'il ne réalise pas, comme l'agglutination des souches de *V. cholerae* pour la détermination des sérogroupes O1 ou O139, ou l'identification de l'espèce *V. vulnificus*, pour laquelle le LNR n'est pas accrédité.

11 souches isolées de crevettes (origine INDONESIE) et une souche suspecte de *V. cholerae* ont été envoyées au CNR pour confirmation d'identification.

Autres échantillons étudiés

Tableau 5 : Echantillons étudiés pour des travaux en collaboration

Pays d'origine	Expéditeur	S
Roumanie	Institut Cantacuzène	264
Inde	THSTI	31
Iran	Institut Pasteur	10
Europe de l'Est	Unité BPE	3
Total		308

La répartition par espèce de toutes les souches isolées et confirmées *Vibrio* en 2017, d'origine humaine et alimentaire, françaises ou étrangères, est présentée dans le tableau suivant:

Tableau 6 : Souches de *Vibrio* d'origine humaine, alimentaire, environnementale ou animale, isolées en 2017 et étudiées au CNR. Distribution par espèce en fonction de l'origine écologique et géographique des prélèvements.

Origine écologique Espèce identifiée	Homme			Aliments			Total / espèce
	France		Etranger	France		Etranger	
	Métropole	France d'outre-mer		Métropole	France d'outre-mer		
<i>V. cholerae</i> O1	-	-	94				94
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	9	1	2	1			13
<i>V. parahaemolyticus</i>	8		1				9
<i>V. alginolyticus</i>	3			1			4
<i>V. vulnificus</i>	1			10			11
<i>V. fluvialis</i>	3						3
<i>Grimontia hollisae</i>	1						1
Total	25	1	97	12			135

Ce tableau ne prend pas en compte les souches étudiées dans le cadre de travaux en collaboration (308 souches de *V. cholerae* O1).

Le délai médian de rendu de résultats était de 5,5 jours ouvrés à partir de la date de réception de la souche, avec une fourchette de valeurs variant de 3 à 13 jours.

Les échantillons de selles ou fecal swab envoyés au CNR pour recherche de *Vibrio* par culture et PCR après un signal positif en PCR syndromique multiplex ont été rendus hors délais.

2.5.2 Niveau de caractérisation réalisé

Les méthodes appliquées à l'étude des souches et prélèvements, rappelées ici, sont détaillées en *Annexe 2* de ce document.

• Analyses réalisées sur les prélèvements et souches isolées

- Enrichissement/isolément sur milieux sélectifs
- Identification présomptive sur toutes les souches isolées (Gram, mobilité, oxydase, agglutination selon le contexte)
- Identification par les méthodes de bactériologie classique : caractères morphologiques, biochimiques et culturaux: n'est réalisée que sur les souches isolées sur le territoire français.
- Identification moléculaire par PCR spécifiques d'espèces, ou gènes *rrs* / *rpoB* et séquençage des produits amplifiés pour les souches de *Vibrio* non identifiées au niveau de l'espèce par les méthodes bactériologiques et moléculaires: réalisée pour toutes les souches isolées.
- Détermination du séro groupe (O1 ou O139)/sérotype (Inaba, Ogawa) par agglutination pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées,
- Recherche des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs pour les souches des espèces *V. cholerae* (gènes *ctxA* et *ctxB*, *tcpA*, *rstR*) et *V. parahaemolyticus/V. alginolyticus* (gènes *tdh* et *trh*) par PCR.
- Recherche de gènes codant pour d'autres facteurs de pathogénicité pour les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 (*hlyA*, *st*) par PCR.
- Mise en évidence par PCR des gènes associés au potentiel pandémique des souches de *V. parahaemolyticus* *tdh+* (*orf8*, *toxRS*).
- Séquençage des produits d'amplification des gènes *tdh* et *trh* pour les souches de *V. parahaemolyticus* et caractérisation des allèles.
- Séquençage des produits d'amplification des gènes *tcpA*, *rstR* et *ctxB* pour toutes les souches de vibriens cholériques, françaises ou étrangères, permettant de définir le biotype et de déterminer le toxinogénotype associé aux différents variants.
- Typage par détermination du profil MLVA basé sur l'amplification de 6 loci pour les souches de *V. cholerae* O1, selon le contexte d'étude.
- Réalisation d'un antibiogramme sur toutes les souches cliniques de *Vibrio* isolées sur le territoire français, et sur un échantillonnage représentatif de souches de vibriens cholériques isolés à l'étranger (228 antibiogrammes en 2017).
- Amplification et séquençage des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* pour les souches présentant une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones.

2.6 Activités de séquençage

Les outils auxquels les CNR de l'Institut Pasteur ont accès pour la réalisation d'activités de séquençage sont présentés en *Annexe 1, 1-3.3, Moyens extérieurs à la structure et services supports*.

Le séquençage n'est pas utilisé en première ligne au CNR comme outil de génotypage pour le suivi des souches isolées sur le territoire français à des fins de surveillance.

Le CNR a cependant réalisé en 2017 des activités de séquençage sur 113 souches envoyées pour expertise et dans le cadre d'une collaboration scientifique à des fins d'investigation d'une épidémie de choléra au Yémen.

Le séquençage a été réalisé par la Plate-Forme - Génomique de l'Institut Pasteur (runs HiSeq et MiSeq) et les analyses bioinformatiques ont été réalisées dans l'Unité.

Un travail de séquençage de 250 souches de vibrions non cholériques de différentes origines est en cours dans le but de décrire la structure des populations et les facteurs de pathogénicité de ces populations bactériennes mal-connues. Un outil de génotypage in silico des VNC sera également développé.

3/ Activités de surveillance :

- Aucun cas de choléra n'a été déclaré sur le territoire français en 2017.
- 26 cas d'infections à VNC ont été confirmés au CNR, se manifestant majoritairement par des gastroentérites. Un lien avec le milieu marin a été établi dans 80% des cas, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer. Une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 toxigène a été importée du Maroc, associée à un cas de gastroentérite.
Cette augmentation majeure du nombre de cas par rapport à la moyenne de 10 cas annuels sur les 20 dernières années pourrait être attribuée aux températures élevées enregistrées en 2017 et/ou à l'évolution des techniques de diagnostic (PCR multiplex syndromique, Spectrométrie de masse) en laboratoire.

3.1. *Vibron cholérique*

3.1.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées

- Description des partenaires, répartition par type d'activités, répartition géographique

Dans la mesure où le nombre de cas recensés chaque année est faible, et que les cas sont des cas importés par des personnes voyageant à des fins touristiques, sans que soit visée une population particulière, **il n'est pas possible de mettre en évidence de partenariat particulier**. Tout laboratoire de biologie médicale situé en France peut être un jour confronté à une recherche de vibron cholérique. Les cas diagnostiqués ayant le plus souvent été hospitalisés, leur répartition est conditionnée au lieu d'hospitalisation. Les laboratoires correspondants sont donc le plus souvent des laboratoires hospitaliers, les LBM peuvent être amenés à faire le diagnostic bactériologique de cas peu symptomatiques.

- *Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau*

Le choléra étant une maladie à déclaration obligatoire, **le CNR a connaissance de tous les cas déclarés et diagnostiqués sur le territoire français**. On estime cependant que moins de 10% des cas d'infection par *V. cholerae* O1 ou O139 présentent les symptômes typiques d'un choléra. La plupart des cas d'infection sont pauci- ou asymptomatiques et peuvent mimer une gastroentérite banale, et il est possible que le diagnostic ne soit pas fait devant des cas pauci-symptomatiques survenant chez des adultes. Les cliniciens doivent considérer le choléra comme un des diagnostics possibles devant tout patient de retour d'un pays affecté, notamment chez l'enfant ou la personne âgée, même en cas de symptomatologie digestive d'apparence banale.

A noter cependant que le CNR est sollicité depuis 2014 comme laboratoire de première intention pour le diagnostic microbiologique du choléra. En effet, les laboratoires, hospitaliers comme privés, ayant entamé une démarche d'accréditation, souhaitent diminuer le nombre d'analyses réalisées et pouvoir se référer à des laboratoires sous-traitants pour la réalisation d'analyses rarement demandées.

- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

Les souches sont isolées de cas déclarés sur le territoire français, le diagnostic microbiologique est établi ou confirmé par le CNR.

3.1.2 Evolution et caractéristiques des infections

- Les cas importés en France depuis 2005 proviennent essentiellement **de la région des Amériques (Caraïbes)**, qui a émergé comme origine géographique de contamination depuis la flambée épidémique majeure débutée en Haïti et en République Dominicaine fin octobre 2010, **et d'Asie** (Tableau 8). Aucun cas n'a été importé d'Afrique durant cette période.
- Comme en 2016, aucun cas n'a été diagnostiqué en 2017 sur le territoire français.

L'évolution du nombre de cas de choléra survenus sur le territoire français depuis 1987, ainsi que les origines géographiques des lieux de contamination, sont présentées ci-dessous:

Figure 1: Evolution du nombre de cas de choléra survenus sur le territoire français depuis 1987

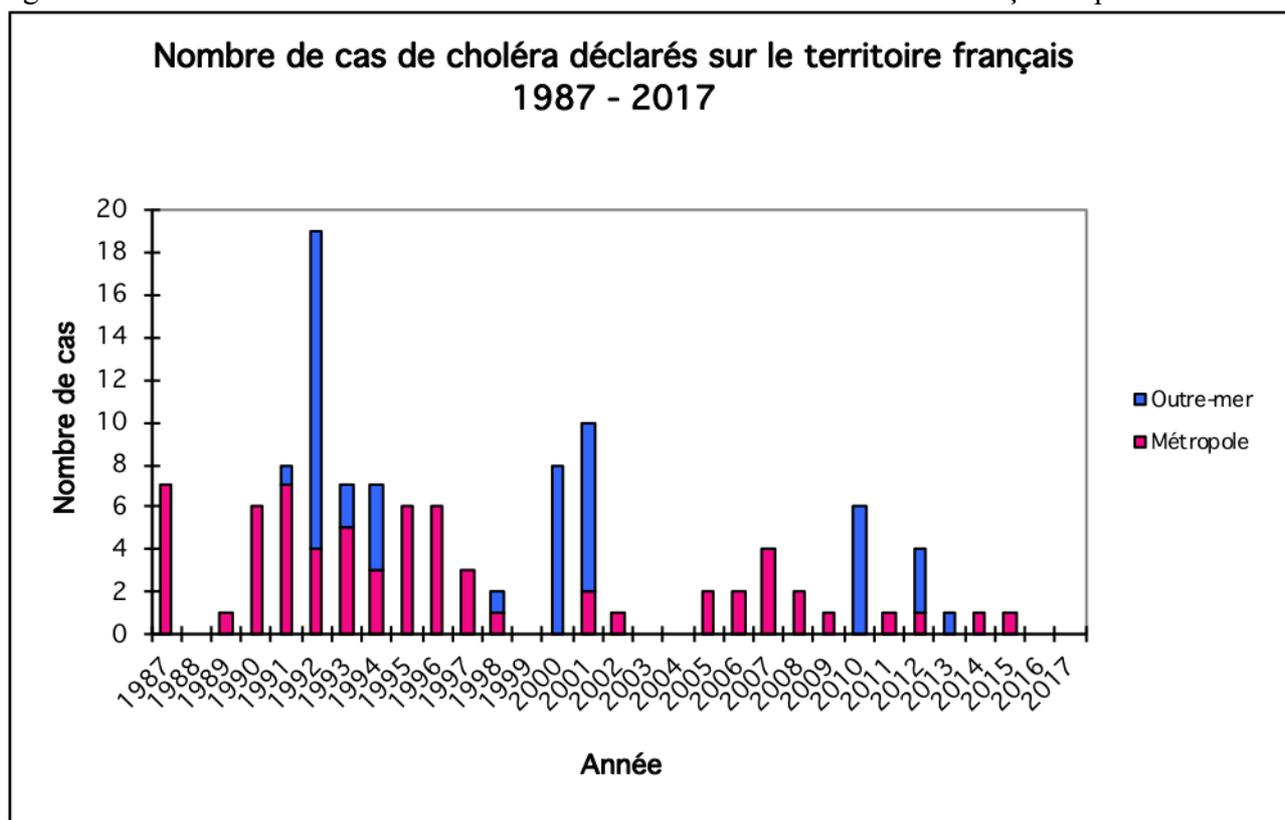


Tableau 7 : Cas de choléra importés sur le territoire français de 2005 à 2015 par lieu de contamination

Année	Afrique	Maghreb	Amérique	Asie	Total
2005				2	2
2006				2	2
2007				4	4
2008		1*		1	2
2009				1	1
2010			6		6
2011				1	1
2012			4		4
2013			1		1
2014				1	1
2015				1	1
Total	0	1	11	13	25

* cas associé à une souche non toxigène, déclaré comme cas de choléra sur la base du tableau clinique.

3.1.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux

Les principales caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes importées sur le territoire français entre 2011 et 2015 sont présentées dans le *Tableau 8*.

Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de vibrions cholériques isolées sur le territoire français depuis 2006

Année isolement / N°	Pays d'origine	Résistances associées	CMI (mg/L)		mutations dans gènes cibles				Génotype <i>ctxB</i>	mutations dans <i>ctxB</i>		
			Nal	CIP	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>		H20A	T39H	Ile68T
2006/01	Inde	C Cs E Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2006/02	Inde	C Cs E Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/01	Inde	AM C Cs E Ft Nal Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/02	Inde	Am C Cs E Ft Nal Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/03	Inde	Am Cs E Ft Nal	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/04	Inde	C Cs E Ft Nal Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2008/01	Inde	Am Cs E Ft Nal Su Sxt Te	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2009/01	Pakistan	C Cs E Ft Nal Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2010/01	Haïti	Cs Ft Nal Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2011/01	Bangladesh	Cs Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2012/01	Rep Dom	Cs Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/02	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/03	St Martin	Cs Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/04	Rep Dom	Cs Ft Nal PB	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2013/01	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2014/01	Inde	C Cs Ft Nal PB Sm Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2015/01	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt	>256	0.5	S83Ile	-	-	-	ctxB7	+	+	+

Abréviations utilisées :

Am, ampicilline ; *C*, chloramphénicol ; *Cip*, ciprofloxacine ; *Cs* Colistine ; *E*, Erythromycine ; *Ft*, nitrofuranes ; *Nal*, acide nalidixique ; *PB*, polymyxine B ; *Sm*, streptomycine ; *Su*, sulfamides ; *Sxt*, Sulfaméthoxazole + triméthoprime ; *Te*, tétracyclines.

S, sérine ; Ile, isoleucine ; L, leucine ; H, histidine ; A, asparagine ; T, tyrosine ; Thr, thréonine

ctxB1 : séquence *ctxB* des souches du biotype classique, différant du biotype El Tor par deux mutations en positions 39 et 68

ctxB7 : séquence *ctxB* différant du biotype El Tor par trois mutations en positions 20, 39 et 68

↪ Toutes les souches importées étaient des variants du biotype ElTor, possédant soit le toxinogénotype *ctxB1*, dont la séquence génomique de la sous-unité B est identique à celle des souches du biotype classique (2 mutations par rapport à la séquence des souches prototypes du biotype ElTor), soit le toxinogénotype *ctxB7*, dont la séquence génomique de la sous-unité B possède une mutation par rapport à la séquence des souches du biotype classique (3 mutations par rapport à la séquence des souches prototypes du biotype ElTor). Les variants *ctxB7* correspondent à la vague 3 actuelle, ils étaient associés en particulier à l'épidémie d'Haïti en 2010.

↪ La surveillance de la résistance aux anti-infectieux est devenue essentielle pour les vibrions cholériques. Même si l'administration rapide de sels de réhydratation orale pour remplacer les pertes liquidiennes permet presque toujours de guérir la maladie (des millions de vies sont sauvées chaque année grâce à la solution de sels de réhydratation orale, dont le Lancet a dit un jour que c'était sans doute la principale avancée médicale du XXe siècle), l'antibiothérapie est largement utilisée aujourd'hui pour le traitement du choléra. Une antibiothérapie efficace permet de raccourcir la durée de l'infection, les besoins en solutés de réhydratation, la quantité de selles émises et la durée des symptômes. Elle raccourcit aussi la durée du portage et de l'excrétion du vibron, évitant ainsi sa dissémination et réduisant probablement le risque de cas secondaires. Elle réduit également de ce fait la durée nécessaire d'hospitalisation, et donc les coûts pour les patients n'ayant pas les moyens d'être hospitalisés dans des pays n'offrant pas de possibilité de prise en charge. Pour toutes ces raisons, de nombreux pays ont recours à l'antibiothérapie pour le traitement du choléra, qui est par ailleurs utilisée pour le traitement des cas importés.

Ce suivi est important pour adapter les politiques en matière de lutte anticholérique aux niveaux national et mondial. Il constitue par ailleurs un bon marqueur épidémiologique.

- Toutes les souches humaines isolées en France ou à l'étranger sont testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé, selon les critères de réalisation et d'interprétation de l'EUCAST 2017, basés sur le diamètre des zones d'inhibition des Entérobactéries, en l'absence de critères spécifiques aux vibrions définis par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Les résultats sont exprimés de manière qualitative en catégories cliniques (sensible, intermédiaire, résistant).

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par la méthode du Etest® (AB bioMérieux) est faite pour toutes les souches cliniques pour l'acide Nalidixique, la ciprofloxacine, ainsi que certains antibiotiques pour lesquels les souches présentent une sensibilité intermédiaire. Les résultats sont quantitatifs, exprimés en mg/L. L'interprétation est faite à partir des valeurs de concentrations critiques publiées par le CLSI pour *V. cholerae* (Ampicilline, Tétracyclines, Chloramphénicol, Sulfamides, triméthoprimé-sulfaméthoxazole) ou sur les valeurs définies par l'EUCAST pour les Entérobactéries.

La sensibilité à l'azithromycine est testée systématiquement depuis fin 2010. En effet, son administration a été recommandée pour tous les patients hospitalisés lors de l'épidémie de choléra en Haïti ; elle a également été recommandée de façon systématique à titre prophylactique par un groupe d'experts indépendants pour le personnel des Nations Unies et les personnels intervenant à l'avenir en situation d'urgence afin d'éviter l'introduction du choléra dans des zones non-endémiques. L'émergence de résistance n'a pas été détectée à ce jour au CNR.

Toutes les souches importées étaient multi-résistantes aux antibiotiques. Depuis 2006 une résistance à l'acide nalidixique a été observée chez toutes les souches responsables de cas importés sur le territoire français (CMI >256 mg/L). Une CMI de 0,25 à 0,5 pour la ciprofloxacine signe une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, qui peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques. La sensibilité diminuée des souches aux fluoroquinolones, antibiotique d'intérêt dans le traitement des cas importés, a été retrouvée pour toutes les souches responsables de cas importés en France depuis 2005, originaires d'Inde, du Pakistan ou de la région des Amériques.

Tableau 9 : Résistance aux antibactériens des souches de vibrions cholériques isolées à l'étranger étudiées en 2017

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
Vibrions cholériques															
<i>V. cholerae</i> O1 (n=94)	49	49	2 (47)	-	-	-	-	94	49	50	67 (27)	(49)	-	49 (1)	93

Antibiotiques testés et abréviations utilisées : AM, ampicilline ; AZM, azithromycine ; C, chloramphénicol ; CIP, ciprofloxacine ; CF, cephalotine ; E, Erythromycine ; FT, nitrofuranes ; NA, acide nalidixique ; PB, polymyxine B ; S, streptomycine, SSS, sulfamides ; SXT, Sulfaméthoxazole + triméthoprimé ; TE, tétracycline. () : intermédiaire

➔ **Une multi résistance des souches de vibrions cholériques** aux antibiotiques est rapportée dans toutes les régions du monde, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra (tétracycline, doxycycline, furazolidone, triméthoprimé-sulfaméthoxazole, érythromycine et chloramphénicol, et plus récemment fluoroquinolones) ont été observées ces dernières années.

↳ Toutes les souches de *V. cholerae* O1 toxigènes testées étaient résistantes à l'acide nalidixique par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'évaluation quantitative par la mesure de la CMI par Etest® (CMI NA) a confirmé la résistance des souches, avec des valeurs comprises entre 24 et 256 mg/L. Les souches étaient soit sensibles soit de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones avec des CMI Ciprofloxacine (CMI CI) variant de 0,03 à 0,5 mg/L.

Les souches donnant des valeurs de CMI NA par Etest® comprises entre 24 et 48 mg/L associées à une CMI CI de 0,03 mg/L présentaient une mutation *gyrA*.

Les souches donnant des valeurs de CMI NA par Etest® >256 mg/L associées à une CMI CI de 0,25 à 0,5 mg/L présentaient deux mutations, *gyrA* et *parC*.

Un profil de résistance particulier a été mis en évidence en 2017, avec des souches sensibles aux polymyxines. La résistance à cette famille d'antibiotiques est un marqueur phénotypique d'appartenance des souches de vibrions cholériques au biotype ElTor. Une souche importée du sous-continent indien en France en 2015 présentait cette caractéristique, l'émergence de ce clone avait été rapportée. Des études de séquençage et phylogénie ont montré l'origine indienne de cette souche, liée à l'épidémie majeure de choléra au Yémen. Cela confirme l'intérêt de l'utilisation des profils de résistance comme marqueur épidémiologique.

3.1.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

• L'isolement possible d'une souche de vibron cholérique peut être signalé au CNR soit directement par le microbiologiste ayant fait un diagnostic présomptif, soit par Santé publique France (Direction des maladies infectieuses), agence elle-même alertée par l'intermédiaire des Agences Régionales de Santé (ARS) auxquelles les médecins et biologistes sont tenus de signaler tout cas suspect.

Dans tous les cas, dès la suspicion d'un cas de choléra, des contacts sont immédiatement établis entre le CNR et Santé publique France. Des renseignements sur le contexte clinique et épidémiologique de l'isolement (notions de voyage récent dans des pays à risque) sont immédiatement recueillis par téléphone, afin d'évaluer rapidement le risque pour l'entourage immédiat du malade ainsi que pour la collectivité, et l'existence éventuelle de cas groupés. Les ARS sont responsables de l'enquête et du traçage des cas, en collaboration avec les équipes de cliniciens, éventuellement du CNR, et l'appui de Santé publique France et des Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire) si nécessaire.

Chacun des cas fait l'objet d'une fiche standardisée individuelle de renseignements dans le cadre du protocole de déclaration obligatoire

Les cas de choléra importés sur le territoire français font l'objet d'une déclaration par le CNR, après confirmation de l'identification d'un vibron cholérique, à Santé publique France et à la Direction Générale de la Santé (DGS).

- Toute identification par le CNR d'une souche de vibron cholérique isolée sur le territoire français peut entraîner une déclaration internationale à l'OMS, en application du règlement sanitaire international de 2005.
- Le CNR collabore avec l'OMS (Division of Emerging and other Communicable Diseases Surveillance and Control; Global Task Force on Cholera Control), les Instituts du Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts associés, d'autres laboratoires situés à l'étranger, ainsi

qu'avec des organisations humanitaires non gouvernementales, MSF en particulier. Le CNR est sollicité pour confirmer l'identification du vibron cholérique à partir de prélèvements ou de souches isolées, communiquer l'antibiogramme des souches isolées, diffuser les méthodes de typage moléculaire des souches, recevoir et former des stagiaires de différents pays à l'identification et au typage des souches de vibron cholériques et non cholériques.

- Le CNR a participé au réseau Africhol, dans le cadre d'un projet de surveillance du choléra en Afrique sub-saharienne, avec un consortium comportant des organisations internationales, WHO, US CDC et CDC Foundation, EPIVAC Network, West African Health Organization (WAHO), l'Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC).
- L'Institut Pasteur (IP), via le CNR et le Réseau international des Instituts Pasteur, a renforcé en 2014 ses interactions avec l'OMS sur la thématique cholera en devenant membre à titre institutionnel de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC). Les priorités d'action définies par la GTFCC concernent la surveillance (laboratoire et épidémiologique), la vaccination, l'assainissement et l'administration des soins de santé, cinq groupes de travail thématiques ont été mis en place, dont un groupe dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Le CNR est présent au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, dans laquelle son responsable s'implique en particulier par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire" (Lab Working Group) qui réunit différents acteurs internationaux de la lutte contre le choléra, provenant de diverses institutions.
- Plusieurs notes et directives techniques ont été publiées en 2016 et 2017 par le groupe de travail surveillance sur le site de la GTFCC :
 - The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests, Novembre 2016,
http://www.who.int/cholera/task_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1
 - Introduction of DNA based identification and typing methods to public health practitioners for epidemiological investigation of cholera outbreaks, Juin 2017
http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Laboratory-support-public-health-surveillance.pdf?ua=1
 - Interim Guidance Document on Cholera Surveillance, Juin 2017
http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf?ua=1
- En octobre 2017, 35 partenaires de la GTFCC, dont l'Institut Pasteur, ont signé un engagement sans précédent dans la lutte contre le choléra passant par la mise en œuvre d'une feuille de route mondiale ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030.

3.1.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Aucune enquête spécifique à la surveillance des cas de choléra sur le territoire français n'a été réalisée cette année.

3.2 *Vibrions non cholériques*

3.2.1 *Réseau des partenaires*

- *Description des partenaires, répartition par type d'activités, répartition géographique,*

Les souches sont envoyées au CNR par des microbiologistes de laboratoires hospitaliers, en lien avec les cas graves, hospitalisés, d'infections à vibrions non cholériques, mais également par des LBM, regroupés en plateformes de biologie médicales.

Les cas sont le plus souvent isolés, il est à noter leur grande dispersion géographique à travers le territoire français, avec cependant un tropisme pour les zones côtières et la région Nouvelle Aquitaine, sur les côtes Atlantiques.

- *Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau*

De même que ce qui est rapporté pour d'autres régions du monde, le recensement des cas d'infections à vibrions non cholériques n'est certainement pas exhaustif pour les formes de gravité modérée, voir bénignes, d'infections à vibrions non cholériques. Les seuls pays qui semblent avoir des données exhaustives sont (i) les Etats-Unis, où les infections à vibrions non cholériques, toutes espèces pathogènes confondues, ont été ajoutées depuis 2007 à la liste des maladies à déclaration obligatoire, et (ii) le Japon, où les microbiologistes sont sensibilisés depuis longtemps à la recherche des *Vibrio*.

Le sous-diagnostic des infections à VNC en France avait été confirmé par une enquête réalisée en 2011 sur l'ensemble de la France auprès de 3281 laboratoires participants, à l'occasion du Contrôle National de Qualité en Microbiologie (11BAC-1) de l'AFSSAPS (ANSM, Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, depuis le 1^{er} mai 2012). L'analyse des résultats avait montré que la raison essentielle du sous-diagnostic des cas était une méconnaissance du monde médical des infections à VNC.

L'évolution des techniques de diagnostic mises à disposition aujourd'hui, en particulier les PCR multiplex syndromique et la spectrométrie de masse, devraient permettre un diagnostic plus facile des *Vibrio* que les méthodes d'identification traditionnelles et une amélioration de l'exhaustivité du recueil de ces infections. et attirer l'attention des biologistes sur ces agents pathogènes. Le CNR a été contacté cette année par un nombre de professionnels de santé beaucoup plus élevé que ces dernières années, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR, ce qui a représenté une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance.

On peut penser cependant, devant la vive inquiétude suscitée par l'identification d'une souche de *V. cholerae*, même en dehors de tout contexte clinique évocateur de choléra, que le CNRVC a connaissance de la grande majorité des cas d'infections diagnostiqués. Cette espèce est également certainement plus souvent isolée dans les laboratoires de microbiologie que d'autres espèces de *Vibrio* du fait de sa capacité à pousser sur des milieux sans sels.

De même, du fait de la rareté des infections à *V. vulnificus*, de la gravité des tableaux cliniques et de la relative facilité d'isolement de ces souches dans les hémocultures, il est probable également que le CNR soit également informé de la majorité des cas.

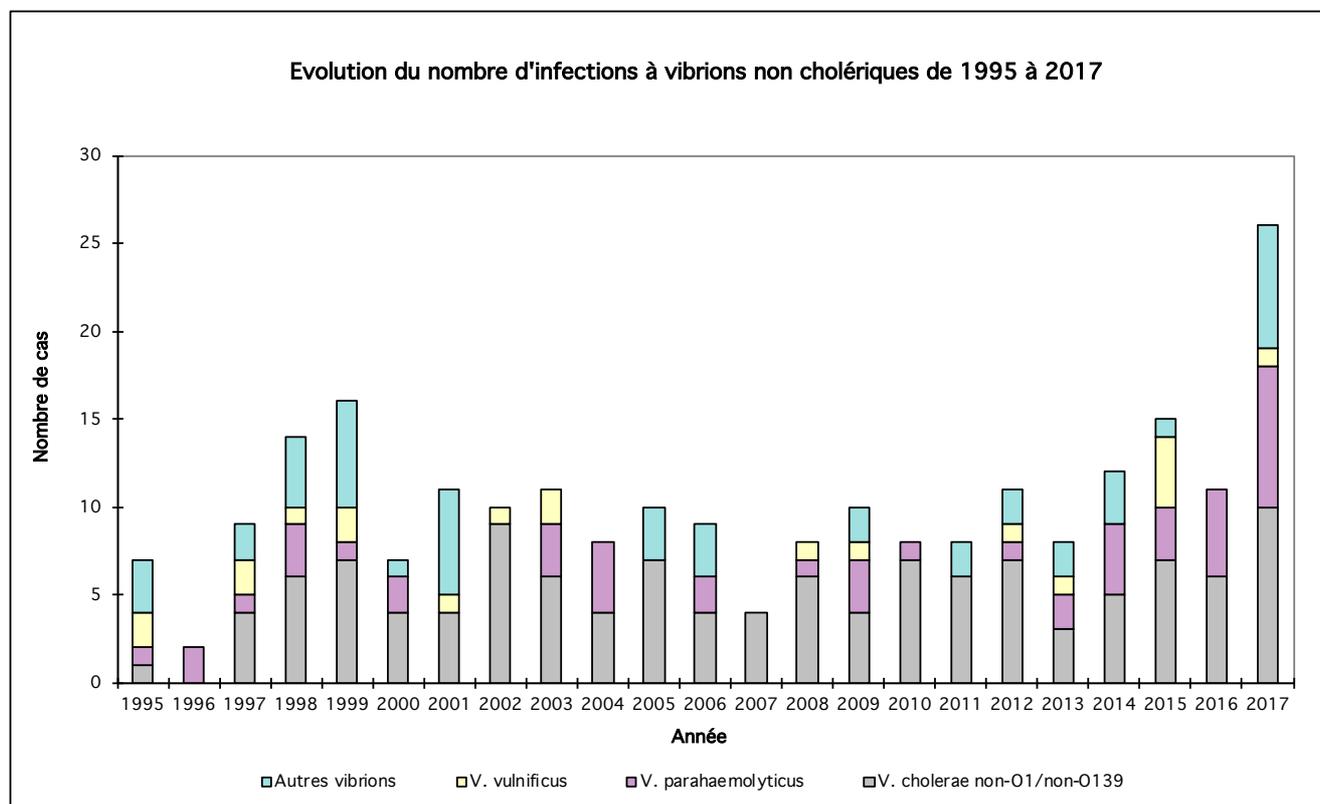
- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

Les souches ont été isolées de sujets ayant présenté des symptômes en rapport avec la présence d'un vibron dans le prélèvement, dont la pathologie s'est déclarée sur un territoire français, et pour lesquels l'identification du germe responsable a été effectuée ou confirmée par le CNR. Les cas pour

lesquels l'exposition a été documentée sur le territoire français sont considérés comme des cas autochtones, ceux pour lesquels l'exposition a été documentée à l'étranger comme des cas importés.

3.2.2 Évolution et caractéristiques des infections

La figure suivante présente l'évolution des cas d'infections à vibrions non cholériques survenus sur le territoire français depuis 1995.



- Les souches étudiées en 2017 ont été isolées en de selles (n=16), sang (n=5), suppuration (n=4), bile (n=1). La distribution des espèces isolées en fonction des syndromes est présentée dans le *Tableau 9*.

- ↳ 5 espèces de *Vibrio*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* et une souche de *Grimontia hollisae*, anciennement *Vibrio hollisae*, ont été à l'origine des 26 cas diagnostiqués en 2017. Les souches de *V. fluvialis* et *Grimontia hollisae* ont été identifiées par les laboratoires expéditeurs par spectrométrie de masse.
- ↳ L'influence du terrain (hépatopathies, cancers, hémochromatose, anémie, pathologies digestives) sur la sévérité de l'infection a été constatée, 8 des 9 cas hospitalisés présentaient un terrain prédisposant.
- ↳ La majorité des cas se sont manifestés par des gastroentérites (18/26), deux cas ayant évolué vers des infections extra-intestinales chez des patients présentant un terrain prédisposant.
- ↳ 6 cas ont présenté des formes septiques, 1 cas primaire et 5 faisant suite à une primo-infection (gastroentérite ou surinfections de plaies) ; 5 des 6 patients présentaient un terrain prédisposant.

- ↳ 21 cas (80%) étaient associés à une exposition au milieu marin, dont 14 à la consommation de produits de la mer et 7 à un contact avec l'eau de mer. Une proportion élevée de transmission alimentaire confirmée était principalement associée à *V. parahaemolyticus* (100% des cas), alors que les cas d'infection à *V. vulnificus* et *V. alginolyticus* étaient associées à une transmission par contact direct avec l'eau de mer.
- ↳ Les cas ont été plus fréquemment signalés dans les zones côtières et particulièrement sur la côte atlantique, mais une notion d'exposition probable à l'étranger, dans des pays à risque où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement peuvent faire défaut, a été signalée pour 11 cas (42%).
- ↳ Comme les années précédentes, c'est l'espèce *V. cholerae* qui a été associée à la plus grande diversité de syndromes, gastroentérites, septicémies, cholécystite, surinfections de plaies. Dans un cas, l'implication comme agent pathogène d'une souche de *V. cholerae* n'a cependant pas été formellement établie, cette souche ayant été isolée en association avec un autre germe pathogène, et le site d'isolement n'étant pas cohérent avec l'évolution clinique.
- ↳ Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.
- ↳ La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année (avril à octobre).

La distribution des espèces isolées en fonction des syndromes est présentée dans le Tableau 10.

**Tableau 10 - Distribution des espèces de *Vibrio* non cholériques isolées chez l'homme sur le territoire français en 2017 et rapportées au CNR
Syndromes associés et contexte clinique et épidémiologique des infections**

Espèce	Nombre de souches reçues au CNR	Département	Mois d'isolement	Formes cliniques	Terrain prédisposant	Hospitalisation	Décès	Contexte ou source de contamination
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	10	92	04	Gastroentérite, cholécystite	oui	oui	0	Voyage à l'étranger
		33	04	Gastroentérite	non	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		63	06	Septicémie	oui	oui	0	NR
		56	06	Gastroentérite	NR	non	0	Consommation de produits de la mer
		34	07	Gastroentérite	oui	oui	0	Voyage à l'étranger
		85	07	Otite	oui	non	0	Contact avec l'eau de mer
		31	07	Gastroentérite	NR	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		33	07	Gastroentérite	non	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		94	08	Plaie, septicémie	oui	oui	0	Manipulation de produits de la mer
		987	12	Plaie	oui	oui	1	Inconnue (co-infection à <i>Shewanella putrefaciens</i>)
<i>V. parahaemolyticus</i>	8	33	05	Gastroentérite	non	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		33	07	Gastroentérite	oui	non	0	Consommation de produits de la mer
		34	07	Gastroentérite	non	non	0	Consommation de produits de la mer
		31	08	Gastroentérite	non	non	0	Consommation de produits de la mer
		33	08	Gastroentérite	non	non	0	Consommation de produits de la mer
		33	08	Gastroentérite	oui	non	0	Consommation de produits de la mer
		91	09	Gastroentérite	oui	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		38	11	Gastroentérite	non	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
<i>V. alginolyticus</i>	3	62	06	Otite	non	non	0	Voyage à l'étranger ; contact avec l'eau de mer
		58	06	Plaie, septicémie	oui	oui	0	Contact avec l'eau de mer
		78	10	Plaie, septicémie	oui	oui	0	Contact avec l'eau de mer
<i>V. fluvialis</i>	3	33	07	Gastroentérite	non	non	0	Contact avec l'eau de mer
		62	10	Gastroentérite	oui	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
		67	11	Gastroentérite	non	non	0	Voyage à l'étranger, consom. produits de la mer
<i>V. vulnificus</i>	1	17	08	Plaie, septicémie	non	oui	0	Manipulation de produits de la mer
<i>Grimontia hollisae</i>	1	46	10	Gastroentérite, septicémie	oui	oui	0	NR
Total de cas	26						1	

NR : Non Renseigné

3.2.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux

Caractérisation des souches analysées en 2017

Echantillons d'origine clinique isolés sur le territoire français

↪ Une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolée d'un cas importé du Maroc possédait les gènes *ctxA* et *ctxB* de la toxine cholérique.

L'isolement de cette souche a été signalée à Santé publique France (voir paragraphe "Alerte").

↪ Aucune des autres souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origine clinique isolée ne possédait les gènes de la toxine cholérique, ni les gènes du récepteur du phage CTXφ. Aucune ne possédait le gène *stn*, codant pour une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*. Toutes possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la grande majorité des souches cliniques, quels que soient les syndromes associés.

↪ 7 des 8 souches de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines associées au pouvoir pathogène de l'espèce, 4 étaient positives pour le gène codant l'hémolysine TRH, 2 pour les gènes codant les deux hémolysines (*tdh+*, *trh+*), une positive pour le gène codant l'hémolysine TDH. Les analyses moléculaires complémentaires ont mis en évidence l'appartenance de cette dernière souche à un clone pandémique de l'espèce par la présence des gènes *orf8* et *toxRS*. Cette souche était importée du Cambodge.

A noter une souche importée de Madagascar, à l'origine de diarrhées aiguës, ne possédant pas les gènes des hémolysines TDH et TRH, associées au pouvoir pathogène de l'espèce.

Echantillons d'origine alimentaire étudiés au CNR en 2017

↪ La souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ne possédait pas les gènes de la toxine cholérique.

Sensibilité aux anti-infectieux

La méthodologie et les critères d'interprétation ont été présentés au paragraphe 3-1.3 de ce document.

Tableau 6 : Résistance aux antibactériens des souches de VNC isolées en France - 2017

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=10)	2	2	-	1	-	-	-	-	9	9	1	(1)	-	(1)	2
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=8)	-	-	-	3	-	-	-	-	6	5	-	-	-	1(6)	-
<i>V. alginolyticus</i> (n=3)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	(1)	(1)	-	3
<i>V. fluvialis</i> (n=3)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>V. vulnificus</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
<i>Grimontia hollisae</i> (n=1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Antibiotiques testés et abréviations utilisées : AM, ampicilline ; AZM, azithromycine ; C, chloramphénicol ; CIP, ciprofloxacine ; CF, cephalotine ; E, Erythromycine ; FT, nitrofuranes ; NA, acide nalidixique ; PB, polymyxine B ; S, streptomycine, SSS, sulfamides ; SXT, Sulfaméthoxazole + triméthoprime ; TE, tétracycline. () : intermédiaire

Tableau 7 : Résistance aux antibactériens des souches de VNC isolées à l'étranger - 2017

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=2)	1	(1)	(1)	-	-	-	-	-	2	2	1	1	-	1	-
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=1)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Antibiotiques testés et abréviations utilisées : AM, ampicilline ; AZM, azithromycine ; C, chloramphénicol ; CIP, ciprofloxacine ; CF, cephalotine ; E, Erythromycine ; FT, nitrofuranes ; NA, acide nalidixique ; PB, polymyxine B ; S, streptomycine, SSS, sulfamides ; SXT, Sulfaméthoxazole + triméthoprimine ; TE, tétracycline. () : intermédiaire

Les souches de VNC isolées en France restent globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés, ce qui est en faveur d'une origine environnementale. Les souches présentant le niveau de résistance le plus élevé sont associées aux cas importés d'infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139.

➔ Parmi les cas français, une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 importée du Mexique, était multi-résistante, aux sulfamides, à l'association triméthoprimine/sulfaméthoxazole, aux polymyxines, au composé vibriostatique O129, à l'acide Nalidixique, et de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones. Une souche importée d'Algérie était également résistante aux sulfamides et à l'association triméthoprimine/sulfaméthoxazole.

➔ Parmi les souches isolées à l'étranger, une souche de RDC était multi-résistante, aux sulfamides, à l'association triméthoprimine/sulfaméthoxazole, aux polymyxines, au composé vibriostatique O129, à l'acide Nalidixique, et de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones. Une souche isolée au Liban était sensible à tous les antibiotiques testés, à l'exception des polymyxines.

➔ Les souches de *V. parahaemolyticus* étaient également globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés. Une résistance à l'ampicilline est classiquement décrite pour cette espèce. Il n'a pas été noté de différence dans le niveau de résistance des souches d'origine française ou étrangère.

3.2.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à vibrions non cholériques. Il est demandé à tout biologiste envoyant un échantillon au CNR de remplir une fiche détaillée de recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques sur l'exposition du patient, concernant notamment l'existence d'un terrain prédisposant et la notion ou non de contact avec la mer ou l'ingestion de produits de la mer. Cette fiche d'accompagnement de souches est accessible en ligne sur le site internet du CNR, <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/fiches-de-renseignements>.

Cette procédure permet au CNR de suivre l'évolution du nombre et des formes cliniques des infections provoquées par des vibrions autres que le vibron cholérique, et des facteurs de risque qui peuvent leur être associés. Tout événement inhabituel, tel qu'augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques, isolement d'un nouvel agent ou modification des voies de contamination, est immédiatement signalé à Santé publique France, Direction des maladies infectieuses. De même tout signalement d'un cas suspect fait par un biologiste aux Agences Régionales de Santé (ARS) fait immédiatement l'objet d'échanges entre le CNR et Santé publique France.

Les données du CNR concernant les infections à vibrions non cholériques sont régulièrement communiquées à Santé publique France, par le biais du rapport annuel d'activité, ou sur demande à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

3.2.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Le CNR a été sollicité en novembre 2017 par Santé publique France et la Cire Bourgogne Franche-Comté pour une suspicion de TIAC à *V. parahaemolyticus* chez 4 personnes âgées d'un établissement de santé. Après contact entre le CNR et le laboratoire impliqué dans le diagnostic, il s'est avéré que le diagnostic n'avait pas été confirmé. Les informations cliniques et épidémiologiques n'étaient pas en faveur d'une telle suspicion.

- Santé Publique France a transmis au CNR pour information, en août 2017, un signalement de la veille internationale de l'ECDC concernant l'isolement d'une souche de *V. cholerae* O1 biotype El Tor sérotype Ogawa à partir d'un échantillon d'eau de rivière en Ukraine, sans qu'aucun cas humain de choléra n'y ait été associé. Des mesures de précaution ont été mises en œuvre dans la région, y compris des restrictions sur la baignade et la pêche. Le CNR a confirmé que des souches de *V. cholerae* O1 environnementales, non toxigéniques, sont isolées dans toutes les régions du monde, et ne présentent a priori pas plus de risques d'infection que les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139.

- Le CNR a participé le 15 septembre 2017 à une journée d'échanges informels avec Santé publique France sur les infections à *Vibrio* d'origine alimentaire en France et aux USA. Les différents points abordés ont concerné le WGS en surveillance de routine, les dernières investigations d'épidémies, l'utilisation de méthodes diagnostic sans culture. L'augmentation du nombre de cas d'infections à VNC aux Etats-Unis est basée sur des méthodes de diagnostic PCR telles que les PCR syndromiques, sans confirmation et isolement de la souche par culture, ni différenciation de l'espèce, ni par culture ni par PCR. En effet les PCR syndromiques ne différencient généralement pas les espèces *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*.

- Le CNR a informé SPF des tests de diagnostic rapide choléra utilisés majoritairement sur le terrain, SD BIOLINE Cholera et Crystal VC Dipstick Test

<https://www.alere.com/en/home/product-details/sd-bioline-cholera-o1-o139.html>

<https://www.indiamart.com/proddetail/crystal-vc-dipstick-3819733797.html>

et a également transmis la "guidance note » publiée par l'OMS sur l'utilisation et l'interprétation des tests ((http://www.who.int/cholera/task_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1)).

- Une analyse des données de surveillance cliniques, microbiologiques et épidémiologiques, des cas d'infections à VNC confirmés depuis 1995 en France est menée depuis 2017 conjointement par le CNR et Santé Publique France à partir des données collectées par le CNRVC. Cette étude met en évidence les espèces les plus souvent impliquées dans les infections humaines, les syndromes cliniques majeurs associés, les voies de contamination et les terrains prédisposants. Cette synthèse concourt à l'amélioration de la compréhension des infections à VNC et à l'amélioration du système de surveillance. Elle sera soumise en 2018 à une revue internationale pour publication.

4/ Alerte :

4.1. Procédure d'alerte

- Le choléra est une maladie à déclaration obligatoire en France. Cette déclaration doit permettre au médecin inspecteur de santé publique de réagir rapidement pour mettre en place les mesures de prévention individuelle et collective autour des cas, et de déclencher des investigations pour identifier l'origine de la contamination et agir pour la réduire. Ces investigations peuvent impliquer les Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire), Santé publique France et le CNR.

- Les médecins et les biologistes qui suspectent un diagnostic de choléra (cas probable d'après la clinique et le contexte épidémiologique) doivent en informer le médecin inspecteur de santé publique de l'ARS de leur lieu d'exercice (signalement) et les biologistes doivent envoyer la souche suspecte au CNRVC. **Le signalement**, procédure d'urgence et d'alerte, s'effectue sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie). Il n'existe pas de support spécifiquement dédié au signalement, c'est généralement la fiche de Déclaration Obligatoire (DO) qui en fait effet, disponible sur le site internet du CNR ainsi que sur le site de Santé publique France,

https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa_12197.do

- **La notification** intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNR. Les médecins ou les biologistes déclarants notifient le cas au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS du lieu d'exercice au moyen de la fiche de DO choléra.

De son côté, le CNR déclare l'identification d'une souche de vibrion cholérique sur le territoire français (France Métropolitaine, DOM et Mayotte) à la DGS et à Santé publique France, par courrier. Le ministère de la Santé et des Solidarités peut être amené à assurer la déclaration internationale des cas confirmés à l'OMS, si le cas entre dans les critères de déclaration du Règlement Sanitaire International en vigueur.

- Dans le cas des infections à vibrions non cholériques, le CNR informe systématiquement Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail ou par téléphone en cas de phénomène anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (infections à *V. cholerae* atypiques, infections à *V. vulnificus*).

4.2. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année

↳ **Signalement de l'isolement d'une souche atypique de *V. cholerae***

Le CNR a signalé à Santé publique France l'isolement d'une souche atypique de *V. cholerae* non-O1/non-O139, porteuse des gènes de la toxine cholérique, considérée comme le facteur de virulence majeur des souches de *V. cholerae* O1 et O139, et associée au potentiel épidémique des souches de vibrions cholériques. Cette souche a été isolée à partir d'un prélèvement de selles envoyé au CNR par un LBM suite à un signal *Vibrio spp* positif par un système de PCR multiplex commercialisé. La fiche de recueil des données cliniques et épidémiologiques renseignée par le laboratoire expéditeur et les contacts pris avec le biologiste ont montré que cette souche a été associée à un cas de gastroentérite sévère mais n'ayant pas nécessité d'hospitalisation, ayant évolué vers la guérison après 3 jours de traitement. Deux souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 toxigènes, non liées entre elles sur le plan épidémiologique, avaient déjà été isolées au Maroc en 2009. Ces trois souches seront

analysées par séquençage complet du génome au cours du travail de séquençage des vibrions non cholériques initié au CNR en 2018.

5/ Activités de rétro-information, de formation et de conseils

5.1. Conseils et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé

Les cours ci-dessous s'adressent à des médecins, pharmaciens, vétérinaires, scientifiques et ingénieurs "souhaitant se spécialiser dans les relations entre agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement":

- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, "Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque", "Le Choléra, épidémiologie et prévention", 30/01/2017 (M-L Quilici).
- Cours Master 2, Université Paris 6, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. Epidémiologie du Choléra, 25/09/2017 (M-L Quilici).

5.1.2 Accueil de stagiaires

Le CNR reçoit des stagiaires dans le cadre de formations diplômantes, BTS, masters, doctorants, et des stagiaires étrangers, dont certains du réseau international des Instituts Pasteur, qui viennent acquérir des techniques spécifiques phénotypiques et moléculaires, dans le cadre de collaborations scientifiques et à visée de transferts de technologies.

- Une étudiante en M2 Professionnel, Microbiologie-Immunologie, de l'université de Bordeaux, M^{elle} Sidra Bashir, a été accueillie au CNR pour son stage de fin d'études, du 16 janvier au 30 juin 2017 (24 semaines), pour une "Etude de la résistance aux antibiotiques de *Vibrio cholerae* O1, corrélation avec des données de génomes" (soutenance le 16 juin 2017).
- Une étudiante en M2 Recherche, spécialité évaluation et gestion des risques environnementaux et professionnels, de l'Université de Besançon, Mme Guyguy Kamwiziku Kusanzangana, a réalisé un stage de 3 mois, du 13 mars au 13 juin 2017, pour une étude intitulée "Genotyping of *V. cholerae* O1 isolated from endemic and epidemic areas in DRC» (soutenance le 19 juin 2017).
- Une étudiante en BTS Bioanalyses et Contrôles, Melle Emilie Le Bail, a été accueillie du 29 mai au 7 juillet 2017 (6 semaines), pour la validation de sa première année de formation, puis du 30 octobre au 22 décembre 2017 (8 semaines), pour son stage de fin d'études. Son travail a porté sur une "étude par MLVA de souches de vibrions cholériques isolées en RCA", et sur du "diagnostic du choléra par PCR à partir de papiers filtres secs".
- Un chercheur étranger, le Dr Daniela Cristea, biologiste à l'Institut de recherche Cantacuzène (Bucarest, Roumanie), membre du Réseau International des Instituts Pasteur, a été accueillie au CNR du 17 juillet au 31 août 2017, pour une session de formation au diagnostic du choléra comme première étape d'une étude en collaboration, "Role of the Black Sea in the history and the spread of the seventh cholera pandemic".

5.1.3 Guides élaborés

- Un article sur le diagnostic bactériologique du choléra a été rédigé pour la « Revue francophone des laboratoires », dans le cadre d'un numéro spécial consacré à la Pathologie Tropicale (ML Quilici, Le diagnostic bactériologique du choléra, (Elsevier Masson SAS), 431, 51-65, 2011.

- Une revue sur « Les Infections à Vibrions non cholériques » a été rédigée pour le traité Maladies Infectieuses de l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale; elle traite de parties techniques concernant l'identification des souches, en particulier les méthodes de fabrication des milieux utiles au diagnostic (Quilici ML, Robert-Pillot A. Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8- 026-F-15, 2011, 12 p, 2011).
- Un « Protocole provisoire de détection de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer », rédigé en collaboration avec le Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé, Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, et le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Produits de la Pêche, AFSSA-Site de Boulogne-sur-Mer, a été diffusé auprès des laboratoires vétérinaires départementaux dès 2003. Il a été et remis à jour en 2010, et est disponible sur le site internet du CNR, <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-reference-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-vibrions-et-du-cholera>
- Un article à destination des biologistes a été publié dans la revue Spectra Biologie, portant sur la recherche de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les selles en absence de milieux spécifiques (Quilici ML, Robert-Pillot A. Vibrio et gastroentérites : vigilance et bonnes pratiques. Spectra Biologie n° 215, Mai 2015, 67-70).
- Un chapitre « *Vibrio* » a été rédigé en 2016 pour le Précis de Bactériologie Clinique 3e Edition, ML Quilici, A Robert-Pillot, Eds : Riegel P, Favennec L, Paugam A, Pozetto B. Editions ESKA.

5.1.4 Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNR

(i) Auprès des partenaires :

- Santé publique France, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec Santé publique France ont été décrits au point 3-3.1 de ce rapport pour les vibrions cholériques. Un bilan des cas de choléra importés en France a été réalisé et publié conjointement par Santé publique France et le CNR en 2007. Concernant les vibrions non cholériques, le CNR signale à Santé publique France tout évènement inhabituel dont il a connaissance : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques. Les données de surveillance sont communiquées à Santé publique France sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles. Le CNR a publié des bilans des infections à vibrions non cholériques dans le bulletin de Santé publique France « Surveillance Nationale des Maladies Infectieuses », en 2003 et 2005, dans le traité Maladies Infectieuses de l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Infections à Vibrions non cholériques, en 2011, il a également été fait état de ces données dans un numéro thématique du BEH, « risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale, surveillance et évaluation », en 2012. Un bilan est fait annuellement dans le rapport d'activité.
- Auprès d'autorités partenaires telles que l'ANSES, l'IFREMER : nous communiquons régulièrement avec ces différentes instances, dans le cadre de programmes de recherche communs, ou à l'occasion d'enquêtes ponctuelles ou de sollicitations conjointes par les autorités partenaires (DGS ou Direction Générale de l'Alimentation, DGAL) pour la rédaction de textes réglementaires (Protocole provisoire de détection-identification des vibrions, à destination des Laboratoires Vétérinaires Départementaux, normes AFNOR, normes ISO, notes de service de la DGAL, fiche de description des dangers *Vibrio*, ...).

(ii) Auprès des professionnels de santé et des laboratoires correspondants :

Un retour d'information est systématiquement effectué auprès des microbiologistes et des cliniciens ayant envoyé une souche de vibron au CNR, sous la forme d'entretiens téléphoniques et/ou d'envoi de documents de référence (articles généraux publiés dans l'EMC et la Presse Médicale, bilans du CNR publiés par Santé publique France dans le BEH et dans les rapports de Santé publique France, Surveillance Nationale des Maladies Infectieuses, « case reports »). Une fiche de recueil de données cliniques et épidémiologiques est systématiquement demandée, l'importance de ce recueil est soulignée, d'autant que c'est l'interrogatoire du patient ou de son entourage, effectué le plus souvent *a posteriori*, plutôt que l'observation des manifestations cliniques, qui permet généralement d'évoquer l'hypothèse d'une infection à vibron non cholérique. Les résultats de l'identification bactériologique et de la recherche des facteurs de pathogénicité sont communiqués aux microbiologistes et/ou cliniciens par un courrier personnalisé, les sensibilisant à l'intérêt de la recherche des vibriens dans les prélèvements biologiques. Par ailleurs les médecins ou cliniciens sont encouragés à publier des « case reports ».

Les informations concernant le CNRVC (analyses réalisées, fiche de renseignements à compléter, condition d'envoi, de transport...) sont accessibles par le biais de pages Internet dédiées sur le site de l'Institut Pasteur : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/cnr/les-cnr/vibriens-cholera>

La dernière version du rapport du CNR est accessible en ligne sur ce site.

5.1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé

Le CNR est régulièrement sollicité par des laboratoires de biologie médicale, de sécurité alimentaire et des organismes de formation pour des demandes de méthodes ou de réactifs de référence. Les informations demandées sont généralement transmises par mail. Un alias vibriens@pasteur.fr a été mis en place pour la réception des demandes, par ailleurs la responsable du CNR est joignable sur son téléphone portable qui est communiqué aux correspondants par retour de mails ou par la messagerie téléphonique du CNR. Le volume d'activités est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

5.2. Conseils et expertises aux autorités sanitaires nationales et internationales

- La responsable du CNR a été sollicitée en 2017 pour la mise à jour d'une fiche de dangers *Vibrio* dans le cadre du CES BIORISK de l'ANSES, en tant que rapporteur.

- La responsable du CNR est leader du "Surveillance Lab Working group" de la GTFCC qui travaille spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Les objectifs de ce groupe sont i) de faire un point et donner des recommandations aux pays par le biais de « briefing notes » sur - les tests de diagnostic rapide du choléra, - les méthodes de typage moléculaire permettant la surveillance des souches, ii) définir les lacunes et les besoins des pays d'endémie cholérique en termes de capacités de laboratoire, iii) définir les étapes nécessaires à la mise en place d'un réseau de laboratoires au niveau global.

Elle a participé en 2017, aux meetings de la GTFCC suivants :

- Second meeting of the GTFCC Water, Sanitation and Hygiene Working Group (WASH), 28 February and 1 March 2017 in Dakar, Senegal, at UNICEF WCAR offices.
- GTFCC Policy and Advocacy Meeting 2 March 2017 Dakar, Senegal

- GTFCC Surveillance Laboratory and Epidemiology Working Group Meeting - 2 to 4 May 2017 in Tunis, Tunisia
- 4th Annual Meeting of the GTFCC 21 and 22 June 2017 in Cape Town, South Africa

6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

Le CNRVC développe, conformément à son cahier des charges, des activités de recherche appliquée permettant :

- Pour le choléra, d'assurer la surveillance et l'épidémiologie moléculaire du choléra par l'étude de la biodiversité des populations bactériennes et de leur résistance aux antibiotiques,
- Pour les vibrions non cholériques, de contribuer à l'amélioration des capacités de surveillance et d'alerte dans le cadre d'une politique de prévention, par la mise au point de méthodes moléculaires de détection et d'identification dans les aliments et l'environnement.

Ces thématiques sont menées au CNR dans le cadre de projets en collaboration au niveau national, avec les acteurs de la sécurité alimentaire ou environnementale, et au niveau international.

Le CNR s'implique dans la lutte contre le choléra en apportant également un appui à la validation des outils de diagnostic rapide du choléra, ainsi qu'à l'évaluation de l'efficacité vaccinale.

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2017

- **Analyse de l'origine et l'évolution dynamique de l'épidémie de choléra de 2014 au Sud Soudan**, *Collaboration avec les Ministères de la santé du Sud Soudan et d'Ouganda, World Health Organization Cairo, Egypt, and South Sudan Country Office, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, USA, Makerere University School of Public Health, Ouganda, MSF/ Epicentre.*

La plupart des pays d'Afrique subsaharienne sont touchés par des épidémies de choléra tous les ans, ou selon des périodes variant de 3 à 5 ans. Le choléra a tendance à être signalé au niveau national ou infranational avec peu de tentatives pour comprendre comment il peut affecter simultanément plusieurs pays dans la même région. Les études publiées combinant à la fois des données microbiologiques et épidémiologiques sont également rares, alors qu'une meilleure compréhension de l'interdépendance de la propagation du choléra entre pays frontaliers pourrait améliorer la lutte contre la maladie en incitant les pays limitrophes à collaborer. La combinaison des données officielles des cas de choléra et des rapports d'enquête sur les flambées des ministères de la santé en Ouganda et au Soudan du Sud avec l'analyse moléculaire des souches de *V. cholerae* a révélé l'interdépendance des épidémies dans les deux pays en 2014, et montré la nécessité d'une collaboration transfrontalière.

- **Immunogénicité d'un vaccin anticholérique oral administré selon un schéma vaccinal impliquant une deuxième dose différée. Kalémie, République démocratique du Congo.**

Projet de recherche clinique n° 2016-032, mené en collaboration avec Médecins sans Frontières/Epicentre.

Un vaccin anticholérique oral (VCO) préqualifié par l'OMS est utilisé dans le cadre de campagnes vaccinales de prévention et riposte aux épidémies de choléra. Ce vaccin est normalement donné en deux doses à 14 jours d'intervalle, mais les schémas d'administration alternatifs, qui pourraient être plus pratiques à mettre en place au cours d'une épidémie, n'ont pas été étudiés. La région de Kalémie, en RDC, est une zone endémique pour le choléra. Une campagne de vaccination orale contre le choléra a été organisée en novembre 2013 dans le cadre de mesures préventives visant à protéger la population. Pour des raisons de sécurité, la deuxième dose n'a pas pu être administrée à 14 jours d'intervalle, et une nouvelle activité de vaccination a été entreprise en juillet 2014. Cette

situation a donné une opportunité unique pour mieux comprendre la réponse immunitaire à une deuxième dose différée du vaccin. L'objectif principal de cette étude est donc de comparer les niveaux d'anticorps vibriocides après deux doses de VCO administrées à 14 jours ou 8 mois d'intervalle. Pour cela des prélèvements de sang ont été effectués immédiatement avant la vaccination (J0), que les sujets aient été ou non préalablement vaccinés huit mois auparavant, à J14 et J28 ; 1124 sérums sont

en cours d'étude au CNR par la méthode de dosage des anticorps vibriocides et détection des Immunoglobulines impliquées dans la réponse immunitaire.

• **Etude de l'épidémie de choléra au Yemen, analyse des souches impliquées et suivi de l'épidémie**

Institut Pasteur, CNRVC et Unité BPE, Sanger Institute, Epicentre, Paris, France, Médecins sans Frontières, Health Authorities, Yemen,

Le Yémen a connu en 2017 la plus grande épidémie de l'histoire du choléra. Les origines et les voies possibles de transmission de l'épidémie ont été étudiées par le séquençage des génomes des souches de vibrions cholériques isolés au Yemen et dans des pays voisins, replacés dans l'arbre phylogénétique établi à partir d'une collection globale de 1070 isolats de *V. cholerae* O1 de la septième pandémie.

• **Etude de la résistance aux antibiotiques de *V. cholerae* O1, corrélation avec des données de génomes,**

CNRVC/Unité BPE

En l'absence d'un consensus international sur la définition des valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques pour les *Vibrio*, un travail visant à faire des propositions permettant d'établir des valeurs de cut-offs, en associant le contenu en gènes de résistance de souches sensibles et résistantes et les valeurs de CMI/diamètres obtenus au CNR, a été initié en 2017 au CNR.

• **Etude et comparaison des profils de résistance aux antibiotiques des souches de *V. parahaemolyticus* isolées d'aliments et de cas humains.**

Projet sur deux ans en collaboration avec l'ANSES de Boulogne-sur-Mer, financement de la Direction Générale de l'Alimentation.

Cette étude vise à apporter des données participant à la standardisation et à la définition de critères d'interprétation pour la réalisation des antibiogrammes pour *V. parahaemolyticus*, et des informations sur l'impact éventuel de souches alimentaires résistantes en santé publique après comparaison des profils de résistance aux antibiotiques des souches de *V. parahaemolyticus* isolées d'aliments et de zones géographiques diverse, et de cas humains.

6.2 Liste des publications et communications

- Publications nationales

M L Quilici, A. Robert-Pillot, "Vibrio". In 3^e édition du Précis de bactériologie clinique. Eds : Riegel P, Favennec L, Paugam A, Pozetto B. Editions ESKA.

- *Publications internationales*

Domman D, Quilici ML, Dorman MJ, Njamkepo E, Mutreja A, Mather AE, Delgado G, Morales-Espinosa R, Grimont PAD, Lizárraga-Partida ML, Bouchier C, Aanensen DM, Kuri-Morales P, Tarr CL, Dougan G, Parkhill J, Campos J, Cravioto A, Weill FX, Thomson NR. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. **Science**. 2017 Nov 10;358(6364):789-793. doi: 10.1126/science.aao2136.

Weill FX, Domman D, Njamkepo E, Tarr C, Rauzier J, Fawal N, Keddy KH, Salje H, Moore S, Mukhopadhyay AK, Bercion R, Luquero FJ, Ngandjio A, Dosso M, Monakhova E, Garin B, Bouchier C, Pazzani C, Mutreja A, Grunow R, Sidikou F, Bonte L, Breurec S, Damian M, Njanpop-Lafourcade BM, Sapriel G, Page AL, Hamze M, Henkens M, Chowdhury G, Mengel M, Koeck JL, Fournier JM, Dougan G, Grimont PAD, Parkhill J, Holt KE, Piarroux R, Ramamurthy T, Quilici ML, Thomson NR. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. **Science**. 2017 Nov 10;358(6364):785-789. doi: 10.1126/science.aad5901.

- *Communications nationales*

L'état viable mais non cultivable chez les *Vibrio*

Stéphanie Copin*, Virginie Ragueneau*, Maryse Bonnin-Jusserand**, Annick Robert-Pillot****
Congrès National de la Société française de Microbiologie, communication orale, 10 octobre 2017.

- *Conférence sur invitation*

4th Annual Meeting of the Global Task Force for Cholera Control (GTFCC) 21 – 22 June 2017, Cape Town, South Africa, " Update from the Laboratory and Surveillance Working Group"

Ending Cholera: A Global Roadmap to 2030, October 4, 2017 – Les Pensières, Veyrier du Lac, "Updates from Institut Pasteur and Sanger Institute", Marie Laure Quilici & Nick Thomson.

7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

- Dans le domaine de la santé alimentaire, le CNR collabore principalement, et depuis de nombreuses années, avec le Laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-Sur-Mer, désigné en 2011 LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche.
 - Le CNR avait été désigné comme laboratoire référent, par une note de service de la DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255 du 28 octobre 2004 (*Annexe 2*), pour la « Gestion des lots de produits de la pêche importés trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles en poste d'inspection frontalier », conjointement à ce laboratoire.
 - Le CNR et le laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-sur-Mer ont participé à l'élaboration d'un protocole expérimental pour la recherche de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer, en collaboration avec le laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé de l'École Nationale de la Santé Publique à Rennes. Ce protocole, rédigé à la demande de la DGAL, a été diffusé aux Laboratoires Départementaux Vétérinaires impliqués dans la recherche des vibrions dans les produits de la pêche, dans l'attente d'une norme ISO.
 - L'ANSES et le CNR communiquent régulièrement et échangent des souches pour expertise.
 - Par ailleurs l'ANSES et le CNR sont partenaires depuis 2006 dans le cadre de plusieurs projets de recherche financés concernant les Risques sanitaires émergents dans les produits de la mer.

- Dans le domaine de l'environnement, le CNR collabore avec l'IFREMER, LNR Microbiologie des coquillages, pour des confirmations d'identification et caractérisation de souches de *Vibrio*, dans le cadre d'enquêtes ponctuelles.
- En 2013 et 2014, le CNR, le LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche de l'ANSES et le LNR Microbiologie des coquillages de l'IFREMER avaient été sollicités conjointement par la DGAL pour la rédaction d'une note de service concernant la « conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles officiels ».
- La responsable du CNR a été sollicitée conjointement avec la responsable du LNR *Vibrio* de l'ANSES de Boulogne-sur-mer en 2017 pour la mise à jour d'une fiche de dangers *Vibrio* pour le CES BIORISK de l'ANSES.
- Un séminaire CNR-LNR a été co-organisé par Santé Publique France et l'ANSES, dans les locaux de SPF à Saint-Maurice, le 17 novembre 2017. Les interactions de longue date du CNRVC et du LNR *Vibrio* ont été soulignées.

8/ Programme d'activité pour 2018-2019

Le CNR a été reconduit, suite à l'appel à candidature lancé le 20 juin 2016 par Santé publique France en vue de la nomination des Centres Nationaux de Référence, pour la période 2017-2021. Il poursuivra donc son activité conformément au programme de travail quinquennal présenté dans le dossier de candidature de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques.

Concernant la partie recherche, les projets seront essentiellement centrés sur l'amélioration des méthodes de diagnostic et de typage appliquées aux investigations épidémiologiques, sur la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques des souches de vibrions cholériques, sur le développement d'outils permettant une amélioration des systèmes de surveillance des aliments et de l'environnement.

Seront poursuivis ou initiés :

- La caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 responsables de pathologies chez l'homme, leur comparaison avec des souches alimentaires ou environnementales d'origines géographiques diverses, avec comme objectif l'identification de marqueurs permettant l'amélioration de la prévention des infections. Le CNR dispose d'une collection de plus de 350 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées chez l'homme (plus de 160 souches cliniques d'origines géographiques diverses et associées à différents syndromes) ou dans les aliments, qui seront séquencées dans le but de décrire la structure des populations, d'identifier les facteurs de pathogénicité, de créer des banques de données génomiques et de développer un schéma Whole génome MLST. Un outil de génotypage in silico des VNC sera également développé.
- La transition entre bactériologie classique et génomique/protéomique haut-débit :
 - Les souches reçues au CNR seront séquencées à la Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) par la technique Illumina.

- L'utilisation de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) permettra de construire une base de données protéomiques des *Vibrio* pathogènes.

- Le CNR poursuivra son implication dans des études internationales participant à une meilleure connaissance de l'efficacité vaccinale choléra, en particulier par la poursuite de la recherche clinique initiée avec Epicentre, portant sur l'immunogénicité du vaccin anticholérique oral administré par un schéma vaccinal avec la deuxième dose différée.

- Le CNR poursuivra ses activités au sein de la GTFCC, en s'intéressant particulièrement aux méthodes moléculaires utilisées pour le typage des vibriens cholériques, aux méthodologies de surveillance environnementale, aux tests immunologiques appliqués à la sérosurveillance, et au renforcement des capacités laboratoire des pays soumis aux épidémies de choléra.

ANNEXES

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

1.2 Organisation du CNR

1.3 Locaux et équipements

1.4 Collections de matériel biologique

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Techniques de référence

2.2 Techniques recommandées par le CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

Le CNR des Vibrions et du Choléra (CNRVC) assure la surveillance microbiologique du choléra et des autres infections à vibrions (infections à vibrions non cholériques), conformément aux missions définies dans le cahier des charges. Il collabore avec les pays étrangers soumis à des épidémies de choléra, mais également avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou en microbiologie environnementale pour les VNC d'intérêt médical. Conformément aux axes de recherche développés dans l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, qui s'intéresse à la biodiversité bactérienne et étudie la dynamique des populations, il assure le suivi des souches (épidémiologie moléculaire, recherche des facteurs de pathogénicité, surveillance de la sensibilité aux agents anti-infectieux) et s'intéresse à la conception de nouveaux outils pour l'identification moléculaire et le typage. Concernant le choléra, cette approche est en totale adéquation avec les recommandations de l'OMS et la résolution WHA 64.15, adoptée en mai 2011 par l'Assemblée mondiale de la Santé, demandant d'appliquer « une approche intégrée et complète à la lutte anticholérique », passant en particulier par « l'amélioration du diagnostic, la surveillance des souches et l'échanges de données, axes majeurs de la lutte contre le choléra faisant partie d'un système intégré de surveillance ».

Cahiers des charges spécifiques du CNR

Vibrions et choléra

Le Centre national de référence des vibrions et du choléra et ses éventuels laboratoires associés s'engagent à assurer les missions définies par l'arrêté du 29 novembre 2004 fixant les modalités de désignation et les missions des CNR.

Il sera particulièrement demandé au Centre national de référence des vibrions et du choléra de :

Pour le Vibron cholérique

1. Apporter une expertise microbiologique :

- confirmer l'identification et typer les souches de vibron cholérique,
- caractériser la toxine CT des *V cholerae*,
- étudier et suivre la résistance aux antibiotiques,
- collaborer avec Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques pour l'étude des nouveaux mécanismes de résistance.

2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de veille sanitaire :

- en s'appuyant sur un réseau de laboratoires et en recensant les cas diagnostiqués, leurs principales caractéristiques et l'origine des cas importés,
- en contribuant à la détection et à l'investigation des cas groupés,
- en collaborant avec les réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE et les organismes compétents en santé humaine et dans le domaine de la sécurité alimentaire.

3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire, tout cas diagnostiqué en France Métropolitaine, dans les DOM, toute augmentation inhabituelle de cas, l'apparition de cas groupés, toute modification des formes cliniques (répartition, modification, de leur expression clinique, formes inhabituelles), toute modification des profils de résistance et l'apparition de souches inhabituelles, etc.

Pour les vibrions non cholériques

1. Apporter une expertise microbiologique :
 - apporter une expertise aux laboratoires de biologie médicale pour l'identification et le typage des souches de Vibrions (espèces peu courantes, rarement isolées par ces laboratoires),
 - diffuser les informations et techniques visant à identifier les vibrions halophiles (*V. parahaemolyticus*) dans un contexte de toxi-infection alimentaire d'origine halieutique ou marine.

2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de veille sanitaire :
 - en développant un réseau de laboratoires et en recensant les cas diagnostiqués en France et leurs principales caractéristiques,
 - en contribuant aux réseaux de surveillance internationaux,
 - en participant à l'investigation d'épisodes de cas groupés (typage de souches, comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources) ou d'autres événements inhabituels,
 - en collaborant avec les acteurs de la sécurité alimentaire (Ministère de l'Agriculture et de la pêche, l'Anses, la DGCCRF, etc) et avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou microbiologie environnementale.

3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas ; apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

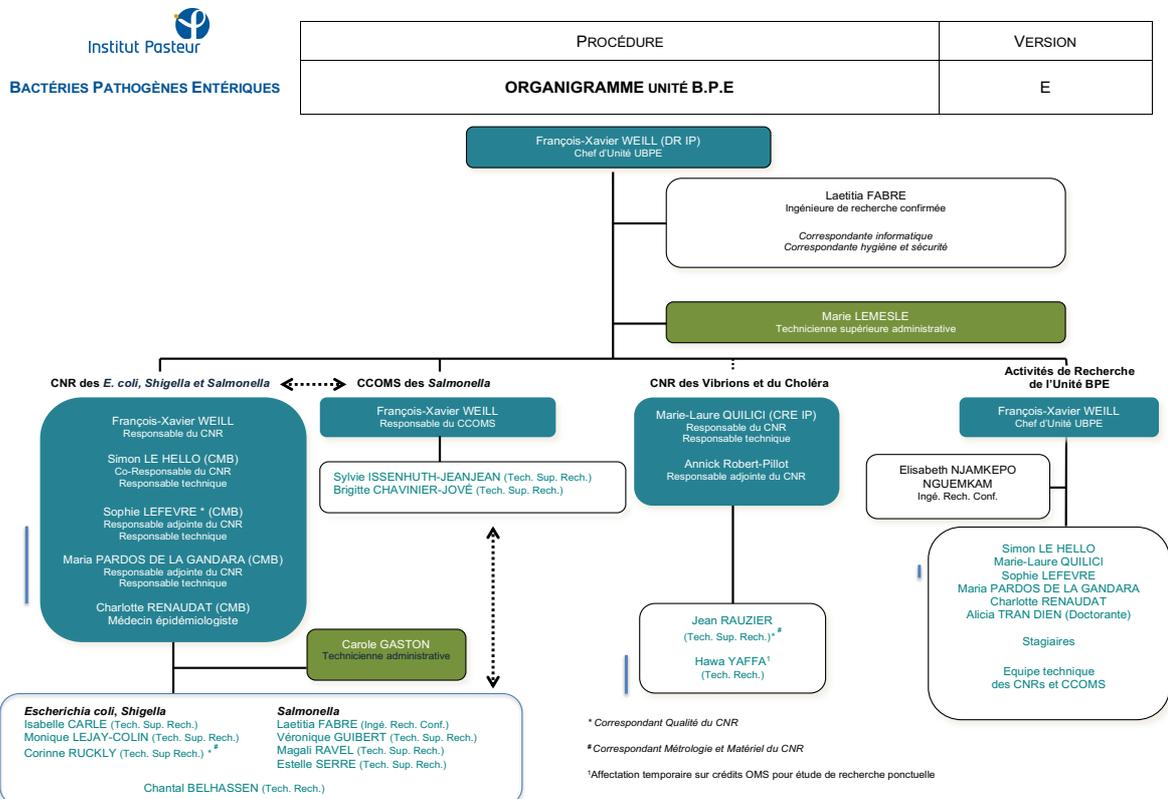
1.2 Organisation du CNR

Le CNR fait partie de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques (BPE), regroupant deux Centres Nationaux de Référence, le CNR *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Shigella*, et le CNR *Vibrio* et Choléra, et un centre collaborateur OMS *Salmonella*.

Effectif pour le CNR par catégories de fonctions

Nom - prénom	Qualifications*	ETP
QUILICI Marie-Laure	Scientifique (Responsable du CNR)	0,40
ROBERT-PILLOT Annick	Scientifique (Responsable-adjointe)	0,20
RAUZIER Jean	Technicien de laboratoire	0,75
LEMESLE Marie	Secrétaire	0,25
TOTAL 2017		1,6

Organigramme de l'Unité BPE



L'organigramme spécifique au CNRVC est présenté en partie 1 de ce rapport.

1.3 Locaux et équipements

1.3-1 Locaux

Le CNR-VC est situé dans l'unité des Bactéries Pathogènes Entériques à l'Institut Pasteur, dont les locaux sont formalisés en rouge sur le plan ci-dessous. Cette unité est localisée dans le bâtiment BIOTOP du campus du 28 du Dr Roux, Paris 15.

Plan 1, 3^{ème} étage du bâtiment Biotop

- Les pièces 01A et 02, représentant deux laboratoires pour une surface totale de 26 m², sont plus spécifiquement dédiées aux activités de bactériologie (pièce 01A : laboratoire P2) et de biologie moléculaire du CNR (pièce 02) ; un de ces deux laboratoires (pièce 01A), dont l'accès est limité au personnel du CNR, est également la pièce d'archivage des dossiers.
- Les pièces 03/04 sont communes à l'URE-BPE, pour effectuer la saisie informatique des renseignements épidémiologiques accompagnant les souches, l'envoi et l'archivage des résultats.
- La pièce 11 est un bureau commun pour le personnel permanent du CNRVC, ainsi que pour les stagiaires.
- La pièce 01B est un bureau pour le responsable du CNR
- Des locaux techniques sont partagés entre l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques et l'Unité des Spirochètes :
- Une pièce climatisée de 16,1 m² (pièce 10) pour les migrations par électrophorèse en agarose, les thermocycleurs et l'appareil d'acquisition d'image de gels Geldoc,
- Une pièce de 11,6 m² (pièce 19) contenant des agitateurs Infors, 2 congélateurs à -80°C et une ultracentrifugeuse
- Une pièce de 12 m² (pièce 12) contenant les balances et une hotte chimique.
- Une chambre froide de 6,5 m² (pièce 22) contenant les milieux de cultures et certains réactifs.

Plan 2, 1^{er} étage du bâtiment Biotop

Au 1^{er} étage, des locaux (14, 14A, 14B, 15 et 15A, partagés avec l'Unité des Spirochètes) de 33,1 m² permettent de réaliser la PCR « marche en avant » dans le cadre de l'accréditation.

Plan 3, 4^{ème} étage du bâtiment Biotop

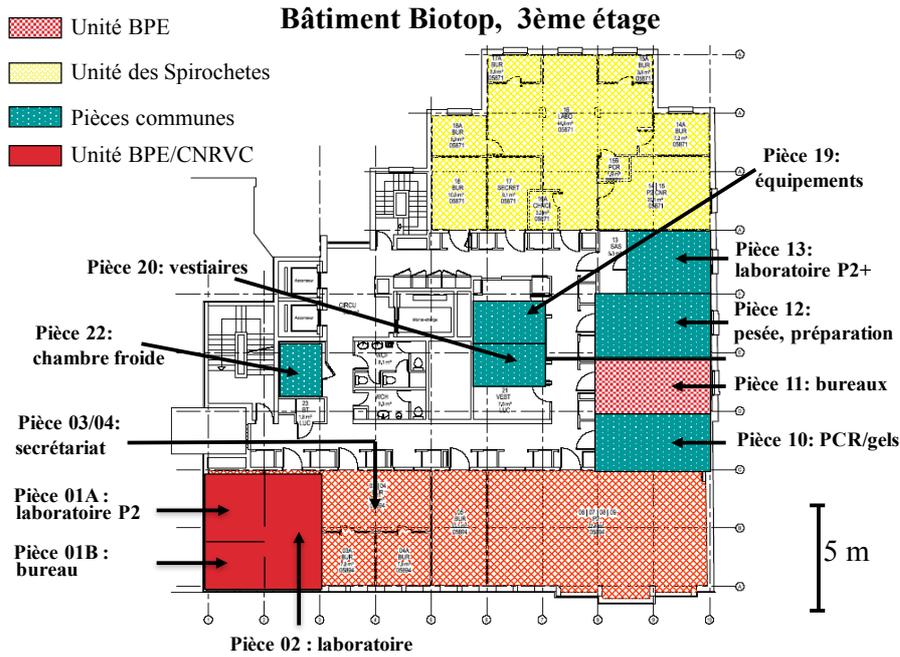
Laboratoire de 22,5 m² (03/04) pour faire les PCR hors accréditation et le PFGE

Le CNR-VC comprend également :

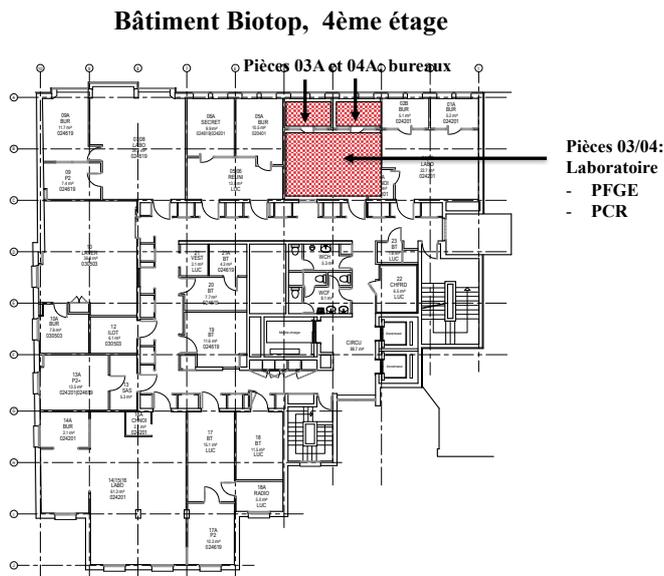
- Un local technique au sous-sol du Biotop partagé avec d'autres entités, abritant des congélateurs à -80°C, dont deux contenant une partie de la collection actuelle du CNR.
- Un local côté 25 rue du Dr Roux, partagé avec d'autres entités, abritant des containers d'azote liquide, dont deux contenant une partie de la collection de souches du CNR.
- Un local côté 28 rue du Dr Roux, hors Biotop, partagé avec d'autres entités et contenant les souches lyophilisées du CNR.

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

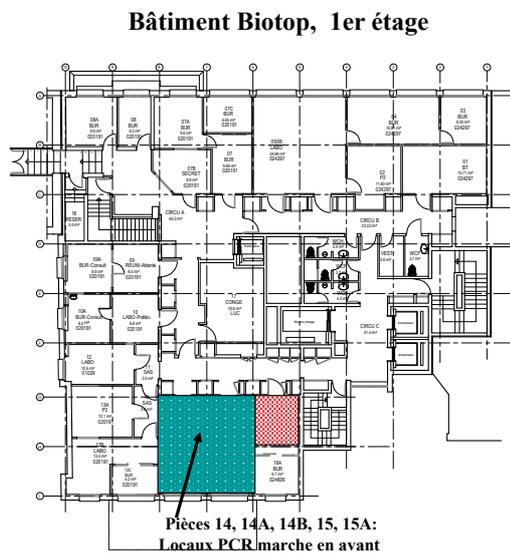
Plan 1



Plan 2



Plan 3



1.3-2 Équipements

Dans la structure

Spécifiques au CNR :

- Équipement courant d'un laboratoire de bactériologie : 2 enceintes climatiques (30°C, 37°C), 1 poste de sécurité microbiologique de classe II, un microscope, 2 bains-marie,
- 2 congélateurs à -80°C, 3 containers à azote liquide, 2 armoires de souches lyophilisées
- 1 lyophilisateur,
- Équipement de biologie moléculaire : 3 appareils à PCR, 1 appareil pour électrophorèse en champ pulsé (BioRad CHEF DR III, placé dans une pièce climatisée), 2 fours à hybridation, 1 système de transfert sous vide, 1 centrifugeuse de paillasse réfrigérée, 1 évaporateur concentrateur SpeedVac ADN, des générateurs et des cuves à électrophorèse, 2 Biophotomètres Eppendorf,
- Une hotte chimique,
- Une hotte pour PCR,
- Sept ordinateurs et 2 imprimante en réseau, 1 scanner,
- Un accès au logiciel d'analyse BioNumerics (Applied Maths)

Commun à l'Unité BPE :

- Un appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad)
- Un système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan

Partagé avec d'autres entités :

- Un système d'imagerie numérique (appareil d'acquisition d'image de gels Geldoc),
- 2 agitateurs Infors, 2 congélateurs à -80°C, 1 ultracentrifugeuse Beckman,
- 1 congélateur à -80°C de secours pour l'ensemble du bâtiment Biotop.

1.3-3 Moyens extérieurs à la structure et services supports

L'organisation générale et les moyens supports mis à disposition des unités hébergeant un CNR à l'Institut Pasteur concernent en particulier :

- La Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M),

qui permet la réalisation des séquençages de génomes bactériens en temps réel dans le cadre des activités de Santé Publique (extracteur automatique d'ADN et séquenceur à haut débit NextSeq 500 d'Illumina). La plateforme est également équipée d'un appareil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Comme la demande est très supérieure à l'offre (1,2 Equivalent-Temps-Plein (ETP) dédié), les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNR et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié. Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNR fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

- La Cellule d'intervention biologique d'urgence (CIBU)

Viennent également en support aux CNR :

- La **Plateforme Milieux**, qui réalise la fabrication des milieux, tampons et solutions simples et complexes en intégrant les normes ISO 9001 pour le management de la qualité et ISO 11133 pour la qualité des milieux de culture.
- La **Plateforme de génomique** qui permet le séquençage des génomes bactériens pour les activités de recherche (séquenceurs à haut débit MiSeq et HiSeq2500 d'Illumina).
- Le **Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie intégrative (C3BI)**, impliqué dans les analyses bioinformatiques et le développement d'interfaces web.
- L'**Animalerie centrale**
- Le **Service informatique** pour les infrastructures informatiques
- La **Médiathèque scientifique** avec la grande majorité des revues de microbiologie accessibles en ligne
- Le **Service de Coordination des CNR et des CCOMS**, chargé de coordonner les activités des Centres Nationaux de Référence et des Centres Collaborateurs de l'O.M.S. placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur.

Les CNR de l'unité de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques bénéficient également de l'assistance :

- d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé au CNR pour enregistrer les analyses,
- de la Société Eurofins (Cochin, Paris), prestataire de service pour des séquençages de type Sanger ou pour migration des produits MLVA.

1.4 Collection de matériel biologique

- Toutes les souches appartenant au genre *Vibrio* collectées dans le cadre des activités du CNR sont conservées par congélation à -80°C et en azote liquide. Les souches de *V. cholerae* étaient jusqu'en 2000 également conservées sous forme lyophilisée.
- Les souches issues de collaborations scientifiques nationales ou internationales sont également conservées dans l'unité par congélation à -80°C et en azote liquide. La majorité d'entre elles sont des souches de vibrions cholériques. Ce matériel biologique permet de suivre l'évolution des populations bactériennes.
- Toutes les souches du CNR mises en collection ont été caractérisées par l'étude de leurs caractères biochimiques et culturels, et par des techniques moléculaires effectuées systématiquement, en fonction des critères définis précédemment et des techniques mises en place au CNR depuis 1998.

- Production d'immun sérums de référence :

Le CNR préparait jusqu'en 2011 des immuns sérums polyclonaux de lapins pour le diagnostic bactériologique du choléra par agglutination (sérums anti-O1 et anti-O139), ainsi que pour la détermination du sérotype des souches de vibrions cholériques (sérums anti-Ogawa et anti-Inaba), à partir d'une collection de souches de référence. Un stock de ces sérums est actuellement maintenu au CNR, mais leur préparation n'est plus assurée, ces sérums étant maintenant commercialisés.

- Le CNR peut être amené à assurer une distribution de certaines souches, utilisées comme souches de référence (souches témoins de PCR par exemple), ou dans le cadre de collaborations scientifiques. L'accès aux souches et données associées collectées dans le cadre de l'activité des CNR se fait après accord du responsable du CNR. Il est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) et d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.

Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limité au projet initial.

En terme de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.

A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2017

Historique : En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le Guide de Bonne Exécution des Analyse en Biologie Médicale (GBEA) et, depuis 2008, dans le cadre des inspections de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur : le CNRVC fait partie des 14 Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ces CNR sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- La Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- La Direction des Affaires médicales et de Santé Publique ;
- La Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

12 CNR et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr

Les 2 autres CNR, le CNR-VC et le CNR-ESS, ont déposé leur demande d'extension le 1^{er} avril 2016. Leur audit d'extension s'est déroulé du 23 au 25 janvier 2018 et la confiance des évaluateurs a été accordée à ces CNR. Les conclusions officielles de l'évaluation doivent être communiquées au LREMS et publiées sur le site du COFRAC prochainement.

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

Le CNR-VC est engagé dans la démarche qualité depuis 2000. Il est inclus dans la 4^{ème} vague d'accréditation des activités analytiques. La rédaction des procédures et modes opératoires analytiques et documents d'enregistrement pour ses activités de diagnostic a été réalisée, avec une gestion documentaire électronique des documents et leur mise en ligne sur la plateforme webcampus de l'Institut Pasteur, dans l'espace dédié au CNR.

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

La démarche qualité spécifique au CNRVC en 2017 a été présentée au point 1-3 de ce rapport. Un audit interne externalisé sera effectué en 2017, sur la technique de « détection des gènes de la toxine cholérique par PCR en point final ». Le dossier de validation de cette méthode est finalisé, à terme la portée d'accréditation du CNRVC concernera le diagnostic des infections à vibrions cholériques et non cholériques par l'identification moléculaire des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*.

Perspectives 2018 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Audit de surveillance ET d'extension	23-25 janvier 2018
Revue qualité LRE	janvier-avril 2018
Audits internes qualité et technique	mai -juillet et septembre - novembre 2018
Revue de direction LRE-MS	16 mai 2018
Groupe de Travail MALDI TOF – Validation de méthode	juin ou octobre 2018
Portée d'accréditation complète	octobre 2020

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Techniques de référence

2.1-1 Techniques disponibles

- Recherche des vibrions à partir de prélèvements par des techniques d'enrichissement/isolement.
- Recherche des vibrions à partir de prélèvements par des techniques de PCR classique et qPCR pour les espèces *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* dans l'environnement et les aliments.
- Diagnostic bactériologique présomptif du choléra.
- Identification par des techniques bactériologiques classiques et moléculaires et par des techniques sérologiques (agglutination) des espèces de vibrions pathogènes pour l'homme.
- Recherche par PCR et caractérisation par séquençage des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité et pour les antigènes O d'intérêt (O1 et O139).
- Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux.
- Mesure du titre d'anticorps vibriocides de sérums vis à vis des vibrions cholériques.
- Elution et PCR sur échantillons déposés sur papiers filtres secs (selles ou enrichissement), pour la confirmation de la présence de vibrions cholériques.
- Typage moléculaire des souches de vibrions par PFGE.
- Méthode MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1.

2.1-2 Enrichissement/isolement du vibron cholérique à partir de prélèvements

Le CNR peut être amené à rechercher le vibron cholérique directement sur des prélèvements de selles. Ces prélèvements sont le plus souvent envoyés par des organisations humanitaires, et proviennent de pays en zone d'endémie cholérique et/ou exposés à un risque d'épidémie. Leur analyse revêt toujours une notion d'urgence. Des prélèvements peuvent également, dans un contexte clinique et épidémiologique bien défini, être adressés au CNR, après entente téléphonique préalable, par des microbiologistes français.

Le rôle du laboratoire de bactériologie est très important soit pour le diagnostic de cas isolés - cas dits "d'importation" - soit pour le diagnostic des premiers cas d'un nouveau foyer épidémique. En effet, devant la diversité des tableaux cliniques associés au choléra, pouvant aller de formes bénignes à un syndrome cholérique vrai, le diagnostic de certitude repose sur l'identification d'une souche de vibron cholérique. La rapidité du diagnostic permettra de déclencher une action locale, nationale ou internationale immédiate, la rapidité de la prise en charge étant déterminante pour prévenir ou limiter, selon le contexte, le nombre de cas secondaires ou la progression d'une épidémie.

- La technique d'enrichissement/isolement consiste en un enrichissement systématique des selles par une succession de cultures en eau peptonée hyper salée alcaline (EPSA) à 37°C, favorisant la croissance du vibron cholérique par rapport à d'autres germes habituellement présents dans les selles, puis d'isollements sur milieux sélectifs (milieu TCBS, qui favorise la croissance des *Vibrio* par rapport à d'autres germes, et Gélose nutritive alcaline ou GNA).
- Le diagnostic présomptif du vibron cholérique, qui va entraîner une déclaration aux autorités sanitaires, associe l'étude de quelques caractères - morphologiques, culturels et biochimiques - à la recherche de l'agglutination des colonies suspectes par les sérums anti *V. cholerae* O1 et O139.

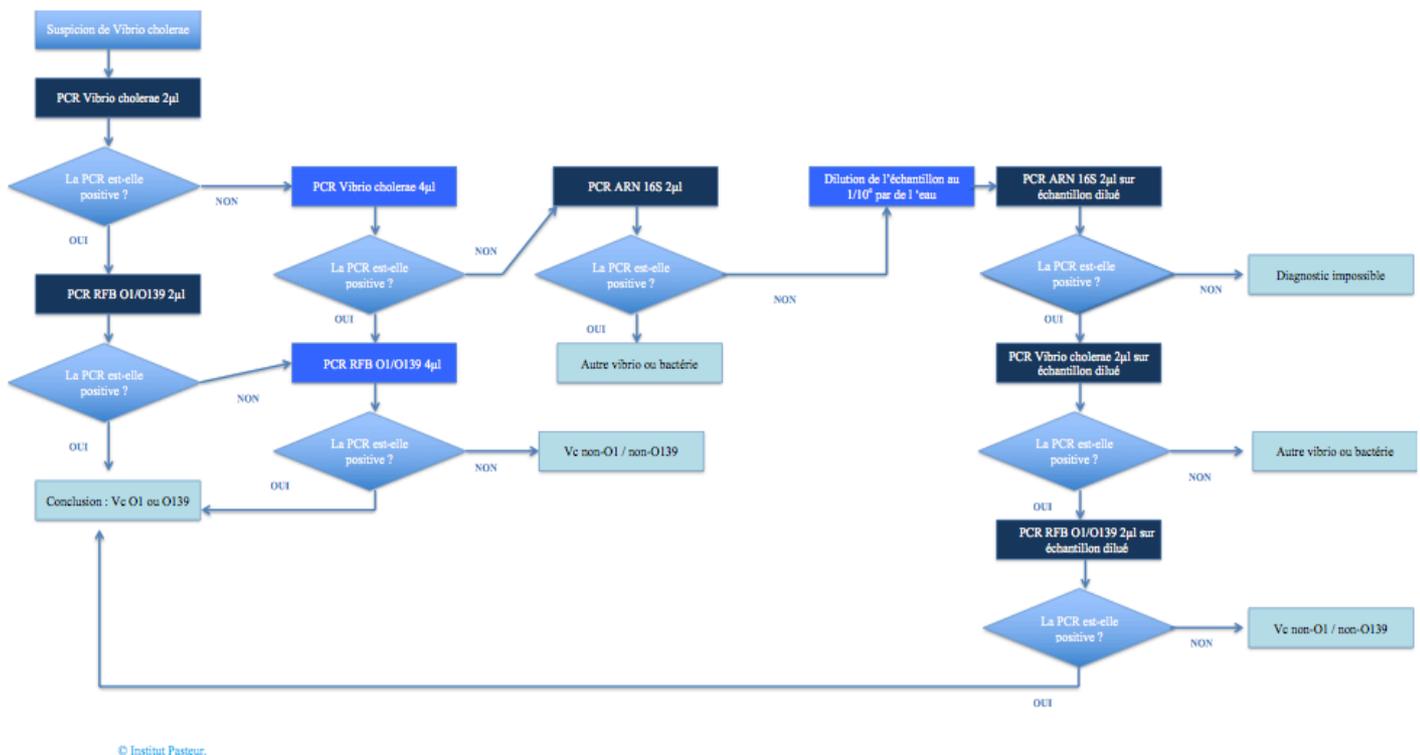
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

- La confirmation du diagnostic est réalisée ensuite par des techniques bactériologiques classiques, identiques à celles mises en œuvre pour l'identification des vibrions non cholériques, et par des techniques moléculaires. La PCR est systématiquement pratiquée pour rechercher les gènes de la toxine cholérique.
- Des tests de diagnostic rapide en bandelettes, mis au point en collaboration entre les Instituts Pasteur Paris et Madagascar et commercialisés par une société indienne, permettent de porter un diagnostic de choléra en quelques minutes à partir d'échantillons biologiques. Ils sont utilisés au CNR pour la recherche des vibrions cholériques, *V. cholerae* O1 et O139, soit directement sur les prélèvements reçus si la nature et le volume de l'échantillon s'y prêtent, soit sur les premiers tubes d'enrichissement. L'isolement de l'agent pathogène reste cependant indispensable pour la réalisation de la surveillance de la sensibilité aux anti infectieux ainsi que le suivi des souches.

2.1-3 Recherche du vibron cholérique à partir de prélèvements par des techniques de PCR classique et qPCR.

Les prélèvements de selles reçus au CNR sont analysés par des techniques de PCR classique (Séquences *ISR*, *ctxA* et *ctxB*, *rfbO1*, *rfbO139*) et par qPCR (Séquences *ISR* et *ctxA*), après extraction de l'ADN par le kit Qiagen Dneasy Blood and tissue kit. Les PCR sont réalisées sur différentes dilutions de l'ADN extrait, une PCR d'amplification des ARN 16S est réalisée simultanément pour vérifier la présence d'inhibiteurs.

Le CNR a défini le logigramme suivant pour optimiser l'identification de *V. cholerae* O1 à partir de prélèvements de selles :



Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1-4 Identification bactérienne

Tests phénotypiques :

- Mise en culture et isolements, examens macroscopiques. Les milieux de culture utilisés sont une gélose nutritive alcaline (GNA) pour l'espèce *V. cholerae*, le Marine Agar pour les autres espèces.
- Examens microscopiques,
- Galerie biochimique type API 20E associée à l'étude des décarboxylases et dihydrolase en tubes, ainsi que de caractères complémentaires si nécessaire,
- Étude des caractères culturels : cultures en concentrations croissantes de chlorure de sodium,
- Techniques immunologiques :
 - ✓ Détermination des sérogroupes/sérotypes par agglutination des souches de *V. cholerae* avec les sérums anti-O1, anti-O139, Ogawa et Inaba.
 - ✓ Agglutination des souches de *V. parahaemolyticus* avec les sérums permettant d'identifier les principaux clones pandémiques de l'espèce (O1, O3, O4, K6, K68). Cette étude n'est réalisée qu'après mise en évidence par PCR des gènes associés au potentiel pandémique des souches (*tdh*, *orf8*, *toxRS*).

Tests génotypiques :

L'utilisation de techniques moléculaires est nécessaire à l'identification des vibrions du fait du peu de marqueurs phénotypiques permettant de différencier les plus de 90 espèces décrites à ce jour. Des PCR permettent d'identifier ou de confirmer l'identification des souches appartenant aux principales espèces de *Vibrio* impliquées en pathologie humaine :

- Amplification de gènes spécifiques d'espèces :

Séquence cible	Espèces identifiées
<i>r72H / toxR</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>hly</i>	<i>V. vulnificus</i>
espace intergénique 16-23S	<i>V. cholerae</i>
espace intergénique 16S-23S	<i>V. cholerae</i> et <i>V. mimicus</i>
collagénase	<i>V. alginolyticus</i>

- Amplification et séquençage des gènes *rrs*, codant pour l'ARN 16S, et des gènes *rpoB* (codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase) et comparaison des séquences avec des séquences de référence dans des bases de données publiques ou spécifiques à l'unité BPE, pour les souches qui n'ont pas pu être identifiées au niveau du genre ou de l'espèce par d'autres techniques.

2.1-5 Recherche des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité

- La recherche par PCR des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité connus est systématiquement appliquée à toutes les souches de vibrions isolées chez l'homme.
- Dans le cadre du contrôle de l'environnement et des denrées alimentaires, la recherche des gènes de la toxine cholérique et des hémolysines *tdh* et *trh* est systématiquement appliquée à toutes les souches des espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*.
- Les souches de *V. parahaemolyticus* possédant le gène de l'hémolysine TDH, qu'elles soient d'origine humaine, alimentaire ou environnementale, sont testées pour la présence de gènes associés au potentiel pandémique de certains clones.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Séquence cible	Fonction	Espèce concernée
<i>ctxA</i> <i>ctxB</i>	Toxine cholérique	
<i>tcpA</i> classique <i>tcpA</i> El Tor	Toxin-corregulated pilus	<i>V. cholerae</i>
<i>hlyA</i> classique <i>hlyA</i> El Tor	hémolysine	
<i>rstR</i> <i>stn</i>	Répresseur du phage CTX ϕ Entérotoxine thermo-stable	
<i>tdh</i> <i>trh</i>	Hémolysine TDH Hémolysine TRH	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>orf8</i> <i>tox RS</i>	Séq. phage filamenteux Régulateur de transcription	

2.1-6 Typage moléculaire

- Electrophorèse en champ pulsé (PFGE). Cette méthode permet l'étude du polymorphisme de l'ADN génomique total après restriction par des endonucléases reconnaissant des sites de coupure rares (macro restriction). Une standardisation de la méthode pour les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* a été publiée par le réseau PulseNet USA afin de pouvoir effectuer des comparaisons de profils inter-laboratoires. Cette méthode est toujours disponible au CNR mais n'est plus appliquée à la surveillance épidémiologique des souches circulant dans le monde (diversification des populations, introduction éventuelle d'une nouvelle souche, origine des cas importés, ...), car insuffisamment discriminante.
- Surveillance de l'apparition ou de la circulation de variants des vibrions cholériques du biotype ElTor par amplification et séquençage de marqueurs génotypiques spécifiques des biotypes : 1) gène *ctxB* codant pour la sous unité B de la toxine cholérique, 2) gène *tcpA* codant pour la protéine TCP (Toxin-corregulated-pilus), récepteur du phage CTX Φ , 3) gène *rstR* codant pour un répresseur du phage CTX ϕ .
- Méthode MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis réalisée en PCR multiplex pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1, basée sur l'analyse de 6 loci présentant des séquences répétées.

2.1-2 Caractérisations supplémentaires

Les PCR suivantes sont également effectuées en routine au CNR:

Séquence cible	Fonction
<i>rfb</i> O1/O139	Synthèse des polysaccharides O1 et O139 de <i>V. cholerae</i>
<i>gyrA</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parC</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parE</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1-3 Détermination phénotypique et génotypique de la sensibilité aux agents antimicrobiens

- Un antibiogramme standard est réalisé selon les recommandations de l'EUCAST 2017 par la méthode de diffusion en milieu gélosé pour les bactéries à croissance rapide (méthode des disques) pour toutes les souches isolées chez l'homme, en France ou à l'étranger. De 14 à 19 antibiotiques sont testés, ainsi que la sensibilité au composé vibriostatique O129 :
 - Aminopénicillines : Ampicilline,
 - Quinolones et Fluoroquinolones : Acide Nalidixique, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacine, Pefloxacine.
 - Tétracyclines : Tétracycline, Doxycycline, Minocycline.
 - Sulfamides et associations : Sulfamides, Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.
 - Phénicolés : Chloramphénicol
 - Nitrofuranes
 - Macrolides : Erythromycine, Azithromycine
 - Polymyxines : Polymyxine B, Colistine.
 - Céphalosporines de 1^{ère} génération : Céfalotine
 - Céphalosporines de 3^{ème} génération : Céfotaxime

L'interprétation en catégories S (Sensible), I (Intermédiaire) et R (Résistant) est faite en accord avec l'édition la plus récente de l'EUCAST, basés sur le diamètre des zones d'inhibition des Entérobactéries, en l'absence de critères spécifiques aux vibrions définis par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Les résultats sont exprimés de manière qualitative en catégories cliniques (sensible, intermédiaire, résistant).

- L'OMS recommande le recours à la doxycycline chez l'adulte et à l'érythromycine chez l'enfant pour le traitement du choléra. Un point particulier à mentionner est l'interprétation des tests de sensibilité à ces deux antibiotiques par la méthode de diffusion en gélose, dont les résultats in vitro ne sont pas toujours corrélés à l'activité in vivo. La lecture interprétative de la sensibilité à la tétracycline permet de prédire la sensibilité possible des souches à la doxycycline. A noter par ailleurs que l'utilisation de l'Azithromycine dans le traitement du choléra est recommandée à la fois du fait de son efficacité et de sa simplicité d'utilisation par rapport à l'érythromycine (administration en une seule prise).
- La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par bandelettes Etest® (AB bioMérieux) est systématiquement effectuée pour détecter les souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, apparaissant comme sensibles par la technique de diffusion en gélose. De même les valeurs de CMI sont mesurées pour les antibiotiques pour lesquels les souches présentent une résistance intermédiaire. L'interprétation est faite à partir des valeurs de concentrations critiques publiées par le CLSI pour *V. cholerae* (Ampicilline, Tétracyclines, Chloramphénicol, Sulfamides, triméthoprime-sulfaméthoxazole) ou sur les valeurs définies par la SFM pour les Entérobactéries pour les antibiotiques pour lesquels les concentrations critiques spécifiques n'ont pas été déterminées.
- • Les supports de résistance aux fluoroquinolones (mutation des gènes cibles) sont caractérisés par amplification par PCR et séquençage des produits amplifiés, les mécanismes de résistance étant principalement des modifications, dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*, du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont principalement

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

des modifications au niveau du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. L'accumulation de mutations augmente le niveau de résistance de ces souches.

2.1-4 Mesure du titre d'anticorps vibriocides

Cette technique permet d'établir, par la mise en évidence dans un sérum d'anticorps ayant une action vibriocide vis à vis de souches de *V. cholerae* O1 ou O139, qu'un individu a été en contact avec le vibron cholérique. Une amélioration de la technique a été publiée par le CNR en 2003 (J Microbiol Methods. 2003 Dec;55(3):745-53). Une technique automatisée a été mise en place au CNR depuis 2014 pour une analyse de la réponse à la vaccination choléra par détermination du taux d'anticorps vibriocides dans les sérums de personnes vaccinées.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.2 Marqueurs épidémiologiques disponibles

2.2-1 Pour les vibrions cholériques

- Sérogroupes : 206 sérogroupes ont été décrits à ce jour au sein de l'espèce *V. cholerae*, seuls les souches des sérogroupes O1 et O139 sont à l'origine de cas de choléra. Ces deux sérogroupes sont systématiquement recherchés lors de l'identification d'une souche de *V. cholerae*, les anti-sérums O1 et O139 sont les seuls commercialisés.
- Biotypes : 2 biotypes, Classique et El Tor, sont décrits au sein du séro groupe O1. Le biotype El Tor, isolé pour la première fois en 1905 au lazaret d'El Tor, dans le Sinaï, est responsable de la septième pandémie actuelle, qui a débuté en 1961 aux Îles Célèbes, en Indonésie, le biotype classique étant associé aux précédentes pandémies. La détermination des biotypes est basée sur l'expression de caractères phénotypiques (production d'acétoïne ou réaction de VP, lyse des hématies de mouton, sensibilité à la Polymyxine B, sensibilité aux phages IV et V) qui ont varié au cours du temps et ne sont pratiquement plus utilisés, et sur l'expression de caractères génotypiques :
 - ✓ L'analyse de la séquence de produits d'amplification PCR de gènes tels que *tcpA* (toxin coregulated pilus), codant pour un déterminant majeur de la virulence intervenant dans l'adhésion de la bactérie aux cellules intestinales,
 - ✓ Toxinogénotype, *ctxB*, codant pour la sous unité B de la toxine cholérique, *rstR* (repeat sequence transcriptional regulator), codant pour un régulateur de la transcription, permet de caractériser les biotypes classiques ou ElTor, ou des souches de biotype « hybride » récemment mises en évidence, certaines d'entre elles ayant sensiblement affecté l'épidémiologie de la maladie. Les souches des biotypes Classique et El Tor sont en effet rapportées par certains auteurs comme différant non seulement dans leurs propriétés phénotypiques et génotypiques, mais aussi leur pouvoir pathogène et leur capacité à survivre dans l'environnement.
- Sérotypes : 3 sérotypes, Ogawa, Inaba et Hikojima, déterminés par une réaction d'agglutination au moyen d'antisérums commercialisés, sont associés aux souches de *V. cholerae* du séro groupe O1. Le sérotype Hikojima correspond à une forme de transition entre les 2 premiers sérotypes, qui sont exprimés simultanément par une même souche. L'intérêt de cette détermination comme marqueur épidémiologique est très discutable du fait de son manque de stabilité, l'apparition d'un nouveau sérotype au cours d'une même épidémie étant plus souvent associée à un phénomène de « switch », dû à une mutation dans le gène *wbeT* codant pour la synthèse de l'antigène O, qu'à l'émergence d'un nouveau clone.
- Le profil de résistance aux antibiotiques est également un marqueur permettant un suivi épidémiologique des souches.
- Techniques de typage moléculaire :
 - ✓ La ribotypie, permet d'établir des profils de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ribotypes). Cette méthode lourde à mettre en œuvre est peu utilisée aujourd'hui ;
 - ✓ L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ADN total après macro restriction enzymatique (pulsotypes) a été largement utilisée par la plupart des laboratoires dans le monde selon un protocole standardisé (PulseNet) et a longtemps été la méthode de

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

référence ; son pouvoir discriminant s'est avéré limité et l'utilisation de cette méthode est aujourd'hui abandonnée au CNR.

- ✓ La détermination des profils MLVA, utilisée au CNR selon une adaptation de la méthode initialement décrite par Danin-Poleg *et al* (J. Clin. Microbiol. 2007, 45(3):736), s'est montrée très discriminante pour différencier des isolats de la septième pandémie extrêmement proches. Son utilisation est recommandée pour des études épidémiologiques menées sur un temps limité, comme au cours d'une épidémie. Un inconvénient est son manque de standardisation entre les différents laboratoires, aussi bien au niveau de son utilisation que de l'interprétation des résultats.
- ✓ Le séquençage entier du génome est la méthode qui permet d'établir avec la plus grande fiabilité le degré de parenté entre les bactéries, et permet des analyses de phylogénomique sur le court et le long terme. La Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) permet la réalisation des séquençages de génomes bactériens en temps réel dans le cadre des activités de Santé Publique (extracteur automatique d'ADN et séquenceur à haut débit NextSeq 500 d'Illumina).

2.2-2 Pour les vibrions non cholériques

- Sérogroupes et antigènes capsulaires pour les souches de *V. parahaemolyticus* : 13 sérogroupes O et 71 sérogroupes K ont été décrits.
- Techniques de typage moléculaire :
 - ✓ Profils de migration en champ pulsé (PFGE) de l'ADN total après macro restriction enzymatique (pulsotypes), qui se révèle plus discriminant pour les VNC que pour les souches de *V. cholerae* O1. Les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 se montrent extrêmement hétérogènes par cette technique.
 - ✓ Séquençage entier du génome.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.3 Techniques recommandées par le CNR

Le diagnostic du choléra est basé sur les techniques de bactériologie classique, la culture étant le standard de référence pour la déclaration d'un cas de choléra. Ces techniques d'isolement et d'identification sont celles qui intéressent en première intention les pays confrontés aux épidémies de choléra. Elles sont présentées chaque année à l'occasion des cours donnés par le CNR sur le choléra, en France comme à l'étranger, et reprises dans les supports de cours rédigés à l'intention des étudiants.

Des articles sur le diagnostic bactériologique du choléra, régulièrement actualisés, sont publiés par le CNR depuis 1992 :

- *Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibriion cholérique et des autres vibrions. Paris; Institut Pasteur; 1992.*
- *Bougoudogo F, Fournier JM. Diagnostic bactériologique du choléra. Le Biotechnologiste International, 1994; 6: 22-26.*
- *Bougoudogo F, Fournier JM. Diagnostic bactériologique du choléra. Annales du Contrôle National de Qualité. 1997; 7: 79-89.*
- *Quilici M.-L. (2011). Le diagnostic bactériologique du choléra. Revue Francophone des Laboratoires (Elsevier Masson SAS), Dossier Les Maladies Tropicales, 431, 51-65.*

Le CDC a publié en 1998 un manuel sur le diagnostic du choléra :

- *WHO/CDS/CSR/EDC/99/8/EN, Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera, Atlanta, GA: CDC. 1999.* accessible en ligne à l'adresse suivante :
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm.

Une traduction française, réalisée en collaboration avec le CNR, a été publiée en 2002

- *WHO/CDS/CSR/EDC/99.8, Méthodes de Laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra », Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 2002*
http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_FR/en/index.html

Une méthode simplifiée permettant la mesure du titre d'anticorps vibriocides a été développée et publiée au CNR :

- *Boutonnier A, Dassy B, Dumenil R, Guenole A, Ratsitorahina M, Migliani R et al. A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to Vibrio cholerae O1 and Vibrio cholerae O139. J Microbiol Methods. 2003 ; 55 : 745-53.*

De même les méthodes mises en œuvre pour identifier les vibrions non cholériques sont diffusées à l'occasion de cours ou formations auprès d'étudiants ou de professionnels,

- un « Protocole provisoire de détection de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer », rédigé en collaboration avec le Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé, Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, et le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Produits de la Pêche, AFSSA-Site de Boulogne-sur-Mer, et remis à jour en 2010, a été diffusé auprès des laboratoires vétérinaires départementaux dès 2003, en attente d'une norme ISO portant sur la détection des *Vibrio* pathogènes. Ce protocole est toujours utilisé par de nombreux laboratoires, la spécification technique ISO, publiée en 2007, étant actuellement en cours de révision. Il est accessible sur le site du CNR.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

- Un article sur les Infections à vibrions non-cholériques, publié en 2011 dans l'Encyclopédie Médico Chirurgicale (Elsevier Masson SAS, Paris, Maladies infectieuses), décrit les méthodes d'isolement des VNC ainsi que les milieux à utiliser pour leur recherche
Quilici M.-L, Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non-cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-026-F-15, 2011, 12 p.
- Un protocole international PulseNet a été publié en 2006 pour le typage de *V. cholerae* par électrophorèse en champ pulsé, en 2007 avec mise au point en 2008 pour le typage de *V. parahaemolyticus*.
- Par ailleurs les techniques moléculaires d'identification et de typage des vibrions cholériques et non cholériques mises en œuvre au CNR sont largement diffusées auprès des stagiaires venant se former au CNR. Les modes opératoires sont distribués aux laboratoires qui en font la demande.
- Des renseignements techniques concernant toutes ces méthodes sont disponibles auprès du personnel du CNR, dont les contacts sont accessibles par le site Web de l'Institut Pasteur.