

Rapport annuel d'activité

2015

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



**Année d'exercice
2014**

SOMMAIRE

Résumé analytique.....	4
1/ Missions et organisation du CNR.....	6
2/ Activités d'expertise	6
2-1. Evolutions des techniques	6
2-2. Activités d'expertise de l'année 2014, évolutions observées.....	7
2-2.1 Echantillons réceptionnés et étudiés au CNR	7
2-2.2 Niveau de caractérisation réalisé	12
2-2.3 Sensibilité aux anti-infectieux : nombre de souches testées et résultats.....	16
2-2.4 Souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.....	17
2-2.5 Évolution des tendances en termes d'activités.....	17
3/ Activités de surveillance	18
3-1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	18
3-1.1 <i>Vibrien cholérique</i>	18
3-1.1.1 Réseau des partenaires	18
3-1.1.2 Définition de l'échantillon de souches isolées.....	18
3-1.1.3 Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances	18
3-1.2 <i>Vibrions non cholériques</i>	20
3-1.2.1 Réseau des partenaires	20
3-1.2.2 Définition de l'échantillon de souches isolées.....	21
3-1.2.3 Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances	21
3-2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	24
3-3. Participation aux réseaux de surveillance	26
3-3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.....	26
3-3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	27
3-4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	28
4/ Alerte	28
4-1. Procédure d'alerte	28
4-2. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année.....	29
5/ Activités d'information, de formation et de conseil.....	29
5-1. Enseignements et formations	29
5-2. Accueil de stagiaires.....	29
5-3. Guides élaborés	30
5-4. Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR	30
5-5. Activités de conseil aux professionnels	31
5-6. Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS.....)	31
6/ Travaux de recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	32
6.1. Etudes appliquées à la surveillance du choléra	33
6.2. Études des vibrions non cholériques.....	34
6.3. Liste des publications et communications.....	35
7/ Coopérations avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	36
8/ Programme d'activité 2014-2015	37

<i>ANNEXES</i>	38
<i>Annexe 1 : Missions et organisation du CNR</i>	39
1.1 <i>Missions et objectifs majeurs du CNR</i>	39
1.2 <i>Description de l'équipe et organigramme</i>	42
1.3 <i>Locaux et équipements</i>	44
1.4 <i>Démarche qualité du laboratoire</i>	47
<i>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR</i>	49
2.1 <i>Techniques de référence</i>	49
2.2 <i>Marqueurs épidémiologiques disponibles</i>	54
2.3 <i>Collection de souches, antigènes ou immun-sérums de référence</i>	56
2.4 <i>Techniques recommandées par le CNR</i>	57

Résumé analytique

Enjeux de santé publique

• **Le choléra**, maladie à déclaration obligatoire au niveau national et international, a été déclaré priorité de santé publique en 2011 par la 64^e Assemblée mondiale de la Santé. Cette maladie est l'un des principaux indicateurs du développement social, les populations exposées au risque de flambées de choléra sont toujours plus nombreuses et l'émergence de nouvelles souches ainsi que l'accroissement de la résistance aux agents anti-infectieux aggravent le tableau clinique. Le nombre réel de cas de choléra diffère des nombres de cas notifiés, représentant une charge estimative de 1.4 à 4.3 millions de cas et de 28 000 à 142 000 décès par an, selon l'OMS. La sous notification peut être volontaire, par crainte de sanctions économiques, mais est également liée aux limites des systèmes de surveillance, aux incohérences dans les définitions des cas et au manque de moyens de laboratoire, ces derniers éléments pouvant contribuer aussi bien à une sous-notification qu'à une sur-notification. En 2013, des cas ont été déclarés par toutes les régions du monde, le plus grand nombre de cas étant rapporté par la région des Amériques (Haïti et la République Dominicaine), puis par le continent africain. La mortalité est importante chez les malades non traités, le taux de létalité a dépassé 13% dans un pays d'Afrique.

Des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques surviennent de façon sporadique dans les pays développés dont la France. La détection de ces cas et leur investigation systématique restent justifiées afin de détecter tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave et du fait du risque de choléra chez les co-exposés à la source de contamination. Les risques de propagation sont réels dans les territoires français d'outre-mer, du fait des conditions de vie et du statut de groupes de populations en situation irrégulière qui peut nuire à la détection des cas et à l'accès aux soins.

• **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. Aux États-Unis et au Japon, ces infections représentent un véritable problème de santé publique, et *V. vulnificus* est aux Etats-Unis la première cause de décès consécutifs à la consommation de produits de la mer. Peu de données existent sur l'incidence réelle de ces infections en Europe, mais les vibrions font partie des risques sanitaires susceptibles d'être exacerbés par le changement climatique et la modification des comportements humains, habitudes alimentaires et mondialisation des échanges commerciaux. Ces germes sont présents dans l'environnement marin français et dans les produits de la mer consommés en France. Une amélioration de la surveillance des infections qu'ils provoquent chez l'homme passe en priorité par une prise de conscience accrue par les cliniciens et biologistes, la surveillance microbiologique de ces germes et dans les aliments est également une composante essentielle pour faire évoluer la connaissance des risques.

Axes majeurs de la mission 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). 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. Il s'intéresse à la biodiversité bactérienne et étudie la dynamique des populations (suivi des souches par des techniques d'épidémiologie moléculaire, recherche des facteurs de pathogénicité, surveillance de la sensibilité aux agents anti-infectieux). Il s'intéresse à la conception de nouveaux outils pour l'identification moléculaire et le typage.

Faits marquants, points clefs, principaux résultats contribuant à la surveillance et à l'alerte.

- **Un cas de choléra** a été déclaré en 2014 chez un patient de retour d'un séjour en Inde, selon les critères de notification définis sur la fiche de DO d'un cas de choléra en France, qui sont "un tableau clinique évocateur de choléra et l'identification d'un vibrion cholérique avec confirmation par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra.
- **Douze cas d'infections à VNC** ont été rapportés au CNR en 2014, 10 d'entre eux ayant nécessité une hospitalisation (6 dus à l'espèce *V. cholerae*, 4 à l'espèce *V. parahaemolyticus*, 1 à l'espèce *V. alginolyticus*, 1 à l'espèce *V. furnissii*). Parmi eux deux cas inhabituels, une septicémie à *V. alginolyticus* et une gastroentérite à *V. furnissii*, espèce déjà impliquée dans des gastroentérites mais rarement isolée. **La notion de contact direct des patients avec l'eau ou de consommation de produits de la mer a été établie pour 9 cas, la contamination a eu lieu sur le territoire français pour tous les cas.** Ces données, associées aux résultats d'une étude des produits de la mer consommés en France, menée conjointement avec l'ANSES, montrent une exposition des consommateurs au risque *Vibrio* sur le territoire français. **La recherche de *Vibrio* dans les selles ne doit donc pas se limiter à la seule investigation des cas de choléra chez des patients de retour de zone d'endémie. 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.**
- Le CNR a participé en 2014 à la confirmation bactériologique d'épidémies de choléra en République Démocratique du Congo (RDC), au Nigéria et au Sud Soudan, par l'étude de prélèvements envoyés par Médecins Sans Frontières. Différents variants de *V. cholerae* O1 El Tor, circulant simultanément sur le continent africain, ont été caractérisés.
- 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). Une réunion de cette Task force en Juin 2014 a permis de définir des priorités d'action, un groupe de travail international dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du cholera s'est réuni à l'Institut Pasteur en décembre 2014, sous la coordination du CNR.

1/ Missions et organisation 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 présenté en *annexe 1*.

La description de l'organisation du CNR, équipe, locaux et équipement, est également présentée en *annexe 1*.

2/ Activités d'expertise

2-1. Evolution des techniques

Techniques développées en 2012-2014

- PCR en temps réel (qPCR) permettant la détection et le dénombrement des espèces *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* dans l'environnement et les aliments.
- Optimisation de la méthode d'analyse des prélèvements de selles reçus d'organisations non gouvernementales (ONG) internationales comme Médecins Sans Frontières (MSF) pour la recherche de vibrions cholériques, portant sur :
 - La méthode d'extraction d'ADN,
 - La détection directe des gènes spécifiques d'espèce (ISR), de gènes codant pour des facteurs de pathogénicité, de gènes codant pour les spécificités antigéniques O1 et O139, par les techniques de PCR classiques et par qPCR.
- Méthode MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1, basée sur l'analyse de 6 loci présentant des séquences répétées.
- Utilisation d'un système miniaturisé pour la détection par qPCR des vibrions pathogènes par voie alimentaire dans les produits de la mer (GeneDisc Rapid Microbiology System).

Techniques en cours de développement

- Poursuite de la validation de l'analyse MLVA comme outil de suivi de souches épidémiques de *V. cholerae* O1 : mise au point la méthode MLVA en PCR multiplex, et collaboration internationale pour une harmonisation de la technique et des critères d'interprétation.
- Développement d'une qPCR pour rechercher les séquences *rfbO1* et *rfbO139* dans les prélèvements.
- Amélioration du système GeneDisc pour la détection par qPCR des vibrions pathogènes par voie alimentaire dans les produits de la mer.

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, avant commercialisation. Deux lots ont été testés en 2014.
- Un test de diagnostic rapide du choléra initialement mis au point à l'IP est commercialisé par une société indienne. Le CNR effectue des évaluations de sensibilité des différents lots vis à vis de matériel purifié, lipopolysaccharides ou cultures bactériennes.

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 des souches de *Vibrio*.
- Le CNR a transféré en 2011 et en 2013 sa démarche analytique et ses techniques de caractérisation moléculaire des espèces *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* au LNR *Vibrio* sp. dans les produits de la pêche du laboratoire de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer.

2-2. Activités d'expertise de l'année 2014, évolutions observées

2-2.1 Echantillons réceptionnés et étudiés au CNR

Durant l'année 2014, **465** échantillons, souches isolées (n=**156**), prélèvements (n=**92**), échantillons d'eau (n=**44**), ADN (n=**173**), d'origine humaine, alimentaire et environnementale, en provenance de France ou de l'étranger, ont été envoyés au CNR, dans le cadre d'activités d'expertise et de travaux en collaboration. Leur étude a permis d'isoler et/ou identifier et caractériser **188** souches, parmi lesquelles **184 souches de *Vibrio*** et 4 souches d'*Aeromonas*. Elle a également permis de mettre en évidence à partir d'échantillons d'ADN la présence de *V. parahaemolyticus* (n=27), *V. vulnificus* (n=9) et *V. cholerae* (n=2) dans différentes matrices alimentaires

• Echantillons d'origine clinique isolés sur le territoire français

Le CNR a réceptionné 21 échantillons :

- **Huit prélèvements de selles** pour la recherche d'un vibriion cholérique,
- **Treize souches isolées** pour la confirmation d'identification d'un VNC.

➤ Confirmation de cas de choléra (recherche de vibriion cholérique ou d'anticorps vibriocides)

- **Huit prélèvements** de selles ont été adressés au CNR pour recherche de vibriion cholérique, par des laboratoires hospitaliers ou des LBM privés, ne disposant pas des milieux d'enrichissement et des milieux sélectifs nécessaires à leur recherche :

- Un prélèvements en provenance de Toulouse a été étudié au CNR, du fait d'un contexte clinique et épidémiologique potentiellement compatible avec un cas de choléra
- Sept prélèvements, en provenance de France métropolitaine, envoyés au CNR par des LBM via le CERBA, ont été transmis au Centre Médical de l'Institut Pasteur (CMIP), du fait de contextes cliniques et épidémiologiques peu évocateurs de choléra.

↳ **Tous ces prélèvements étaient négatifs en vibriion cholérique**

- **Une souche** de *V. cholerae*, isolée à l'Hôpital d'Instruction des Armées de Brest des selles d'un patient de retour d'Inde, a été envoyée au CNR pour confirmation d'identification et sérotypage.

↳ Cette souche a été confirmée *V. cholerae* séro groupe **O1** sérotype **Ogawa**.

➤ Souches de vibriions non cholériques

- En 2014, **12** souches isolées en France, de selles (n=5), sang (n=6), suppuration (n=1), ont été adressées au CNR pour confirmation d'identification.

↳ **Les 12 souches** ont été identifiées comme des vibrions non cholériques :

- 7 *V. cholerae* non-O1/non-O139,
- 1 *V. alginolyticus*,
- 3 *V. parahaemolyticus*,
- 1 *V. furnissii*

Le contexte d'isolement des souches de *Vibrio* est détaillé dans le *Tableau 8*, présenté dans ce rapport au titre des activités de surveillance.

- Un cas d'infection à *V. parahaemolyticus* a été rapporté sur la base d'une fiche d'information, sans envoi de souche.

Les souches /selles/ fiches d'information ont été envoyées au CNR par des laboratoires

- de 6 Centres Hospitaliers : Groupe Hospitalier de La Rochelle-Ré-Aunis, CHU de Toulouse, CHR d'Orléans, CHU de Nantes, CH de Saint Nazaire, CH de Cannes.
- privés : MEDILAB-Group, Chauray ; LAM Darrasse et Associates, Biarritz, et le laboratoire CERBA, qui centralise les demandes de recherche de *V. cholerae* envoyées par des LBM.

• **Echantillons d'origine clinique isolés à l'étranger (République Démocratique du Congo, Nigeria, Sud Soudan, Niger)**

Le CNR étudie des souches isolées ainsi que des prélèvements de selles qui lui sont adressés par des microbiologistes étrangers, par l'OMS et par des organisations humanitaires, pour la confirmation bactériologique d'épidémies de choléra et/ou des travaux en collaboration. Ces études permettent un suivi des souches de vibrions cholériques responsables d'épidémies de choléra dans le monde, et en particulier susceptibles d'être importées en France.

- En 2014, **84 prélèvements de selles** ont été adressés au CNR par Médecins Sans Frontières (MSF) pour la recherche de vibrion cholérique.
 - ↳ **30 étaient positifs** en vibrions cholériques, *V. cholerae* séro groupe **O1 biotype ElTor**.
 - ↳ 3 souches d'*Aeromonas* et 1 souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ont également été isolées.
- **29 souches** en provenance du Sud Soudan, isolées en 2014 en contexte épidémique, ont été envoyées au CNR dans le cadre d'une étude en collaboration, pour confirmation d'identification et caractérisation.
 - ↳ 27 souches ont été confirmées *V. cholerae* séro groupe O1.
 - ↳ Une souche a été identifiée *V. cholerae* non-O1/non-O139, une *Aeromonas*.
- 25 souches isolées entre 1971 et 1992 dans différentes régions du monde (24 *V. cholerae* O1, 1 *V. cholerae* non-O1/non-O139), et 25 souches de *V. cholerae* O1 isolées au Niger en 2010 ont été étudiées dans le cadre d'un projet de recherche mené dans l'unité.

• **Echantillons d'origine alimentaire isolés en France**

En France, 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) dans les produits de la mer présentés à l'importation peut être demandée par le Ministère de

l'Agriculture et de la Pêche. Le CNR a collaboré depuis de nombreuses années avec des laboratoires spécialisés dans le contrôle des produits de la mer, avant la désignation du Laboratoire de sécurité des aliments de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer comme du LNR *Vibrio* sp., et ce d'autant qu'une note de la DGAL du 28 octobre 2004 (DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255), concernant la « Gestion des lots de produits de la pêche importés trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles en poste d'inspection frontalier » demandait au Laboratoire National Vétérinaire et aux Laboratoires Vétérinaires Départementaux d'envoyer au CNR ou au Laboratoire des Produits de la Pêche de l'ANSES de Boulogne sur mer, les souches suspectées appartenir au genre *Vibrio* pour confirmation d'identification et recherche de facteurs de pathogénicité.

Le CNR est toujours sollicité par certains laboratoires, essentiellement pour l'analyse de souches de *V. cholerae*.

➤ **51 souches isolées d'aliments en France** ont été envoyées en 2014 par des laboratoires français, dans le cadre de contrôles réglementaires ou d'autocontrôles (produits présentés à l'importation ou produits locaux) pour confirmation d'identification et recherche des facteurs de pathogénicité. Les laboratoires expéditeurs sont listés dans le point 7 de ce document, « Coopérations avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux ».

↳ 49 appartenaient au genre *Vibrio*. Leur répartition par espèce est présentée dans le Tableau 1.

➤ **173 ADN extraits** de bouillons d'enrichissement réalisés à partir de différentes matrices alimentaires (poissons, crustacés), pour une étude de prévalence de *V. parahaemolyticus* pathogènes, *V. cholerae* et *V. vulnificus* dans les produits de la mer consommés en France, ont été étudiés dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'ANSES.

↳ La présence de *V. parahaemolyticus* a été confirmée dans 27 échantillons

↳ La présence de *V. vulnificus* a été confirmée dans 9 échantillons

↳ La présence de *V. cholerae* a été confirmée dans 2 échantillons

• **Echantillons d'origine environnementale isolés de l'environnement français**

- **5 souche** isolée d'eau de mer et identifiée comme *V. cholerae* a été envoyée au CNR, pour confirmation d'identification et sérotypage.

↳ Toutes ont été confirmées *V. cholerae*, non toxigènes.

• **Echantillons d'origine environnementale isolés de l'environnement à l'étranger**

- **44 échantillons d'eau** prélevés en différents points de stations d'épurations au Maroc, pour une étude de prévalence de *V. cholerae*, ont été étudiés dans le cadre d'une collaboration (Projet PRAD), par des méthodes de bactériologie classique et par des méthodes moléculaires. Seul un échantillon était positif en *V. cholerae* non-O1/non-O139, une souche a été isolée.

• *Autres types d'échantillons étudiés :*

- **6 souches ont été étudiées dans le cadre d'un contrôle qualité externe**
- **1 souche de collection de référence (CIP) a été caractérisée**

La répartition par espèce de toutes les souches isolées et confirmées *Vibrio* en 2014, d'origine humaine, alimentaire ou environnementale, françaises ou étrangères, est présentée dans le *Tableau 1*.

**Tableau 1 : Souches de *Vibrio* d'origine humaine, alimentaire, environnementale ou animale, isolées en 2014 et étudiées au CNR
Distribution par espèce en fonction de l'origine écologique et géographique des prélèvements.**

Origine écologique Espèce identifiée	Homme			Aliments			Environnement			Animal			Total / espèce
	France		Etranger	France		Etranger	France		Etranger	France		Etranger	
	Métropole	France d'outre-mer		Métropole	France d'outre-mer		Métropole	France d'outre-mer		Métropole	France d'outre-mer		
<i>V. cholerae</i> O1	1		57										58
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	7		2	33			5		1				48
<i>V. parahaemolyticus</i>	3			12									15
<i>V. alginolyticus</i>	1			3									4
<i>V. vulnificus</i>													
<i>V. furnissii</i>	1												1
<i>V. cincinnatiensis</i>				1									1
Total	13		59	49			5		1				127
<i>Aeromonas</i>			4										
			63										131

Ce tableau ne tient pas compte

- des souches étudiées dans le cadre de travaux en collaboration (50)
- des souches étudiées dans le cadre d'un Contrôle Qualité externe (6)
- de souche CIP (1)

2-2.2 Niveau de caractérisation réalisé

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

• Sur les prélèvements:

Les 85 prélèvements étudiés au CNR en 2014 ont été soumis aux étapes classiques d'enrichissement et d'isolement pour ainsi qu'à des analyses moléculaires, après extraction de l'ADN directement à partir des échantillons : PCR et/ou qPCR pour recherche de l'espèce *V. cholerae*, des gènes codant pour la toxine cholérique et les antigènes O1 et O139.

• Sur les souches humaines, alimentaires ou environnementales

➤ Identification

- Méthodes de bactériologie classique : caractères morphologiques, biochimiques et culturels.
- Méthodes moléculaires : i) PCR spécifiques d'espèces, plusieurs étant réalisées simultanément sur une même souche lorsque les caractères différentiels sont insuffisants pour distinguer des espèces proches (*V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* en particulier), ii) amplification des gènes *rrs* et/ou des gènes *rpoB* et séquençage des produits amplifiés pour les souches de *Vibrio* non identifiées au niveau de l'espèce par les méthodes bactériologiques et moléculaires.

➤ Détermination du sérotype/sérogroupe par agglutination pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées,

➤ Recherche des facteurs de pathogénicité par PCR pour les souches des espèces *V. cholerae* (gènes *ctxA* et *ctxB*) et *V. parahaemolyticus* (gènes *tdh* et *trh*). Les gènes des toxines *tdh* et *trh* ont également été recherchés chez les souches de *V. alginolyticus*.

➤ Séquençage des produits d'amplification des gènes *tdh* et *trh* pour les souches de *V. parahaemolyticus*.

➤ Séquençage des produits d'amplification des gènes *ctxB* (détermination du toxinogénotype), *tcpA* et *rstR* pour toutes les souches de vibriens cholériques, françaises ou étrangères.

➤ Typage moléculaire par électrophorèse de l'ADN total en champ pulsé (PFGE) après restriction par 2 endonucléases, *NotI* et *SfiI*,

- ✓ pour toutes les souches de vibriens cholériques isolées en France et à l'étranger,
- ✓ pour les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en France.

et comparaison des profils à l'aide du logiciel Bionumerics (AppliedMaths).

Remarque 1 : lors de l'étude de prélèvements, plusieurs souches sont généralement isolées d'un même échantillon, des tests d'oxydase et d'agglutination sont réalisés sur plusieurs colonies, avant leur sélection pour isolement et caractérisation d'une souche.

Remarque 2 : L'étude des souches d'origine alimentaire est facturée aux laboratoires demandeurs lorsqu'il s'agit d'autocontrôles.

• **Sur les ADN :**

- qPCR pour la recherche des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*
- qPCR pour la recherche des facteurs de pathogénicité, *ctxA*, *tdh*, *trh*.

Parmi les échantillons d'origine alimentaire étudiés au CNR en 2014,

- ↳ Aucune des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ne possédait les gènes de la toxine cholérique.
- ↳ Aucune des souches de *V. parahaemolyticus* ne possédait les gènes des hémolysines.
- ↳ Les gènes de pathogénicité (*tdh* et/ou *trh*) ont été mis en évidence chez 9 des 27 échantillons positifs pour *V. parahaemolyticus*.

Les techniques moléculaires appliquées en 2014 à l'identification, la caractérisation et le typage des souches d'origine humaine, environnementale ou alimentaire reçues au CNR sont détaillées dans les tableaux suivants (Tableaux 2, 3, 4)

Tableau 2 : PCR d'identification/caractérisation des échantillons reçus au CNR en 2014

Séquence cible	analyse de 1 ^{ère} intention Souches isolées (n=188)	analyse de 1 ^{ère} intention Prélèvements (n=85)	Validation de méthodes	Activités de recherche	Spécificité
<i>toxR</i>	25	-	-	-	Identification de l'espèce <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>r72h</i>	25	-	-	-	Identification de l'espèce <i>V. parahaemolyticus</i>
16-23S rRNA ISR Vc	264	85	-	-	Identification de l'espèce <i>V. cholerae</i>
16-23S rRNA ISR Vm	3	-	-	-	Identification de l'espèce <i>V. mimicus</i>
<i>hly</i>	1	-	-	-	Identification de l'espèce <i>V. vulnificus</i>
<i>collagénase</i>	8	-	-	-	Identification de l'espèce <i>V. alginolyticus</i>
<i>rrs</i> (ARN 16S1)	5	-	-	-	Identification d'espèce
<i>rrs</i> (ARN 16S2)	5	-	-	-	Identification d'espèce
<i>rpoB</i>	4	-	-	-	Identification d'espèce
<i>tdh/trh</i> duplex	29	-	-	-	Facteurs de pathogénicité <i>V. parahaemolyticus</i> (hémolysines)
<i>tdh</i> mono	9	-	-	82	Hémolysine <i>tdh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>trh</i> mono	9	-	-	98	Hémolysine <i>trh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>toxRS</i>	1	-	-	-	Facteurs de pathogénicité <i>V. parahaemolyticus</i> (clone pandémique)
<i>orf8</i>	1	-	-	-	Facteurs de pathogénicité <i>V. parahaemolyticus</i> (clone pandémique)
<i>ctxA</i>	121	-	-	50	Facteurs de pathogénicité <i>V. cholerae</i> (sous unité A toxine cholérique)
<i>ctxB</i>	121	-	-	313	Facteurs de pathogénicité <i>V. cholerae</i> (sous unité B toxine cholérique)
<i>hlyA</i>	9	-	-	-	Hémolysine de <i>V. cholerae</i>
<i>stn</i>	9	-	-	-	Entérotoxine thermostable de <i>V. cholerae</i>
<i>tcpA</i>	91	-	-	50	Récepteur du phage CTXφ de <i>V. cholerae</i>
<i>rfb</i> O1/O139	67	85	-	-	Synthèse des polysaccharides O1 et O139
<i>gyrA</i>	57	-	-	-	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	1	-	-	-	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parC</i>	57	-	-	-	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parE</i>	1	-	-	-	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>rstR</i>	76	-	-	69	Répresseur du phage CTXφ
<i>qPCR r72H</i>	-	-	-	217	Détection/identification de l'espèce <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>qPCR tdh</i>	-	-	-	217	Détection de l'hémolysine <i>tdh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>qPCR trh</i>	-	-	-	217	Détection de l'hémolysine <i>trh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>qPCR Vc</i>	-	85	-	217	Détection/identification de l'espèce <i>V. cholerae</i>
<i>qPCR ctxA</i>	-	85	-	217	Détection de la sous unité A de la toxine cholérique
<i>qPCR Vv</i>	-	-	-	173	Détection/identification de l'espèce <i>V. vulnificus</i>
Séquences VNTR	-	-	162	-	Sous-typage MLVA

Tableau 3 : Produits d'amplification séquencés et nombre de souches caractérisées

Séquence cible	Nbre de réactions de séquence	Nbre de souches caractérisées	Spécificité
<i>rrs</i> (ARN 16S)	20	5	Identification espèce
<i>rpoB</i>	6	3	Identification espèce
<i>ISR 16-23S Vc</i>	50	25	Identification <i>V. cholerae</i>
<i>R72h</i>	14	7	Identification de l'espèce <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>toxR</i>	14	7	Identification de l'espèce <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>ctxB</i>	612	306	Sous-typage <i>V. cholerae</i> O1
<i>collagénase</i>	2	1	Identification de l'espèce <i>V. alginolyticus</i>
<i>tcpA</i>	204	102	Facteur de pathogénicité de <i>V. cholerae</i>
<i>tdh</i>	62	31	Facteur de pathogénicité <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>trh</i>	104	52	Facteur de pathogénicité <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>gyrA</i>	114	57	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	2	1	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parC</i>	114	57	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parE</i>	2	1	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>rstR</i>	254	127	Répresseur du phage CTX ϕ
Séquences VNTR	-	27	Sous-typage MLVA

Tableau 4 : Nombre d'analyses PFGE réalisées

PFGE	<i>NotI</i>	<i>SfiI</i>
	313	373

2-2.3 Sensibilité aux anti-infectieux

• Souches testées (n=72)

La surveillance de la résistance aux antibiotiques est effectuée **sur les souches humaines de *Vibrio*** isolées en France et à l'étranger, par :

- La réalisation d'un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. De 14 à 19 antibiotiques, dont la liste est détaillée en *Annexe 5*, sont testés, ainsi que la sensibilité au composé vibriostatique O129.
- La détermination de la CMI par Etest[®] (systématique pour NAL et CIP chez les souches résistantes à l'acide nalidixique, et pour tous les antibiotiques pour lesquels les souches présentent une résistance intermédiaire).
- L'amplification et séquençage des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* pour les souches présentant une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones. Les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont principalement 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.

• Résultats

Tableau 5 : Résistance aux antibactériens des souches isolées en France en 2014

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	NA	CIP	CF	S	O129
Vibrions non cholériques														
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=7)	0	0	0	1	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i> (n=1)	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=3)	(1)	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	(3)	0
<i>V. furnissii</i> (n=1)	(1)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Vibrions cholériques														
<i>V. cholerae</i> O1 (n=1)	1	1	(1)	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1

Tableau 6 : Résistance aux antibactériens des souches isolées à l'étranger en 2014

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	NA	CIP	CF	S	O129
Vibrions non cholériques														
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=2)	2	2	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	2	2
Vibrions cholériques														
<i>V. cholerae</i> O1 (n=57)	55	55	1	1	1	1	0	57	55	10	0	1	55	55

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

↪ La sensibilité aux fluoroquinolones a été évaluée de manière qualitative et quantitative pour toutes les souches de *V. cholerae* O1 testées.

- Onze souches résistantes à l'acide nalidixique par la méthode de diffusion en milieu gélosé présentaient une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, avec une CMI NAL >256 mg/L et une CMI Ciprofloxacine = 0,5 mg/L. Ces souches étaient isolées en France (n=1), en RDC (n=1), au Nigéria (n=1), au Sud Soudan (n=8).

La recherche de mutations dans les gènes cibles, *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*, par PCR, séquençage des produits amplifiés, et alignements de séquences sur le logiciel Bionumerics (AppliedMaths) a été réalisée pour ces onze souches. Toutes présentaient une mutation *gyrA* et *parC*.

- 47 souches intermédiaires à l'acide nalidixique par la méthode de diffusion en milieu gélosé étaient résistantes par la détermination de la CMI par Etest[®], avec une valeur comprise entre 24 et 256 mg/L. Toutes présentaient une mutation *gyrA*.

↪ De même la sensibilité aux fluoroquinolones a été évaluée de manière qualitative et quantitative pour les 2 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées à l'étranger (RDC et Sud Soudan) et résistantes à l'acide nalidixique par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Elles présentaient également une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, et une mutation *gyrA* et *parC*.

↪ Une souche isolée en RDC présentait un profil de multi résistance particulier (SSS, SXT, AM, TE, E, FT, PB, NA, CF, S).

2-2.4. Souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.

• Le CNR a envoyé 3 souches de *Vibrio* (1 *V. alginolyticus*, 2 *V. parahaemolyticus*) à l'Institut de Formation ALPA groupe à Lille, pour des sessions de formation à la sécurité alimentaire.

2-2.5 Évolution des tendances en termes d'activités

• Le nombre total de souches isolées reçues au CNR en 2014 a augmenté par rapport à 2013, essentiellement du fait du plus grand nombre de prélèvements envoyés au CNR par les ONG (12 échantillons en 2013, 85 en 2014).

• Le nombre de souches isolées envoyées pour la recherche de VNC est resté stable, malgré la sensibilisation menées par le CNR auprès des laboratoires de biologie médicale par le biais du contrôle national de qualité des Analyses de Biologie Médicale, 11BAC1, réalisé par l'AFSSAPS en 2011 et le retour fait en 2012 auprès de ces laboratoires. Pour la première fois, un laboratoire hospitalier a fait parvenir au CNR une fiche d'informations concernant un cas d'infection à *V. parahaemolyticus*.

• Le CNR est de plus en plus souvent sollicité pour l'analyses directe de selles pour la recherche de vibron cholérique par les laboratoires hospitaliers, qui ne réalisent pas souvent cette recherche et ne souhaitent pas accréditer cette méthode.

3/ Activités de surveillance :

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3-1.1. Vibrion cholérique

3-1.1.1. Réseau des partenaires

- *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 vibrion 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 a été sollicité d'avantage que les années précédentes en 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.

3-1.1.2. 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.

3-1.1.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances

• Les cas importés en France depuis 2005 proviennent essentiellement **de la région des Amériques (Caraïbes)**, qui a émergé comme origine géographique des contamination depuis la flambée épidémique majeure débutée en Haïti et en République Dominicaine fin octobre 2010, **et d'Asie** (Tableau 7). Aucun cas n'a été importé d'Afrique durant cette période.

- Contrairement aux cas importés depuis 2010, déclarés dans leur grande majorité dans les Antilles françaises, le cas importé en 2014 a été déclaré en métropole, chez un patient de retour d'Inde.

- Le cas déclaré en 2014 a présenté une déshydratation sévère nécessitant une hospitalisation. A noter que tous les cas importés depuis fin 2010 ont été hospitalisés, généralement en soins intensifs. Aucun des patients ne présentait de facteurs de risque connus. Aucun décès n'a été notifié.

La figure suivante présente l'évolution du nombre de cas de choléra survenus sur le territoire français depuis 1987.

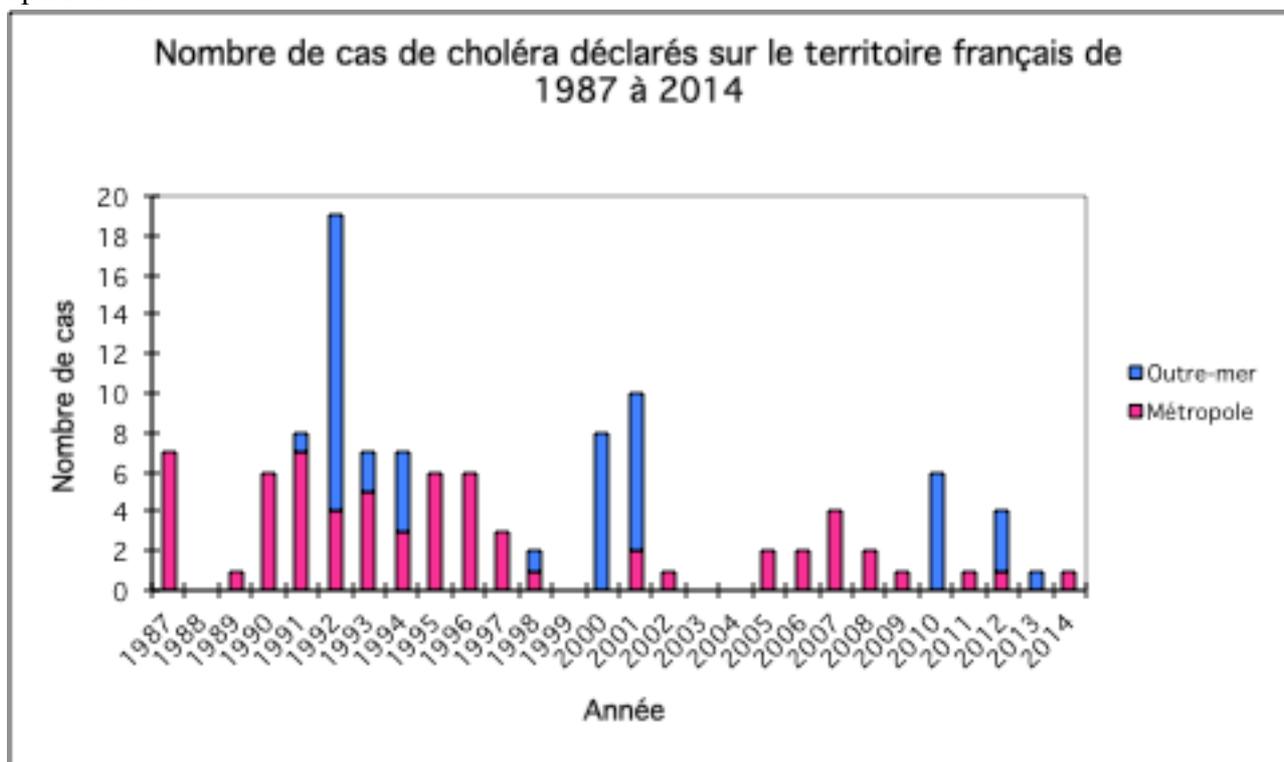


Tableau 7 : Cas de choléra importés sur le territoire français de 2005 à 2014 par lieu de contamination

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
Total	0	1	11	12	24

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

- Le cas déclaré en 2014 n'a donné lieu à aucune transmission secondaire.
- Une personne co-exposée a présenté des symptômes compatibles avec un cas de choléra, mais l'analyse des selles s'est révélée négative.
- Ce cas était dû à *V. cholerae* du séro groupe O1, sérotype Ogawa ; aucun cas dû à *V. cholerae* du séro groupe O139 n'a jamais été importé sur le territoire français.
- La souche est un **variant El Tor de *V. cholerae* O1 et appartient au toxinogénotype *ctxB7***. Ses caractéristiques génotypiques sont rapportées dans le *Tableau 9*, présenté au paragraphe 3.2 de ce document. De telles souches circulent en Inde et ont déjà été importées en France.

3-1.2. *Vibrions non cholériques*

3-1.2.1. *Réseau des partenaires*

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

Les souches sont le plus souvent envoyées au CNR par des microbiologistes de laboratoires hospitaliers, dans la mesure où le CNR a généralement connaissance des cas graves, hospitalisés, d'infections à vibrions non cholériques. Elles peuvent également être envoyées par des LBM. Les cas sont toujours isolés, il est à noter leur grande dispersion géographique à travers le territoire français. A noter cependant en 2014 une répartition focalisée sur la région de la Rochelle, département de la Charente-Maritime.

- *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 a 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 a montré que la raison essentielle du sous-diagnostic des cas est **une méconnaissance du monde médical des infections à VNC** plutôt que des difficultés techniques d'identification. Peu de laboratoires aujourd'hui recherchent les *Vibrio*, qui ne font pas partie du bilan étiologique des diarrhées demandé par les cliniciens et ne font pas l'objet de recommandations par la SFM, via son référentiel en microbiologie médicale.

Le CNR a souhaité sensibiliser les biologistes à la recherche de *Vibrio* par le biais du compte-rendu du CNQ sur le site de l'AFSSAPS et a sollicité leur participation afin d'améliorer l'exhaustivité du recueil de ces infections : « dans le but d'améliorer l'estimation de l'incidence des infections à VNC en France, la recherche de *Vibrio* dans les selles ne doit pas se limiter à la seule investigation des cas de choléra chez des patients de retour de zone d'endémie. 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 ou d'exposition au milieu marin ; les biologistes sont encouragés à la recherche systématique de *Vibrio* à partir d'un échantillon de selles chez les personnes développant une gastro-entérite aiguë après consommation de produits de la mer,

coquillages crus ou insuffisamment cuits en particulier ».

Cette sensibilisation et information des professionnels de santé est effectuée de façon permanente par le CNR lors des contacts avec les biologistes et cliniciens, à qui une participation active à la surveillance de ces infections est demandée.

➤ 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 du fait de sa capacité à pousser sur des milieux sans sels.

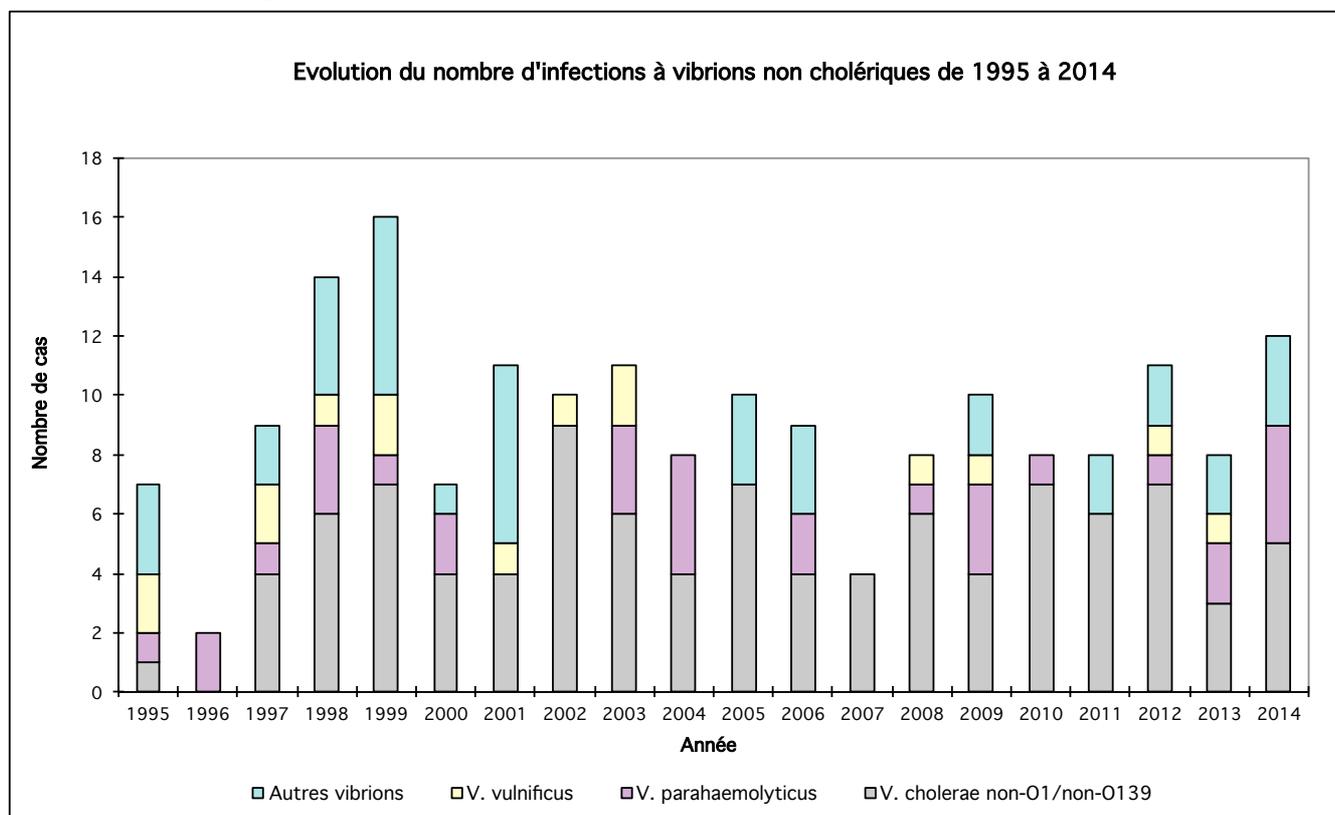
➤ De même, du fait de la rareté des infections à *V. vulnificus*, de la gravité des tableaux cliniques et de la relative facilité d'isolement de ces souches dans les hémocultures, il est probable également que le CNR soit également informé de la majorité des cas.

3-1.2.2. 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 vibriion 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.

3-1.2.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances

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



- ↳ Le bilan médico-épidémiologique des vibrioses non cholériques survenues en France en 2014 a montré :
 - La diversité des syndromes liés aux vibriens non cholériques, plus marquée pour les infections dues à l'espèce *V. cholerae*, dont l'habitat et donc les sources de contamination possibles sont plus diversifiés que pour les autres espèces.
 - L'influence du terrain (hépatopathies, cancers, hémochromatose, anémie, pathologies digestives) sur la sévérité de l'infection. Les manifestations cliniques les plus sévères sont survenues chez des patients présentant un terrain prédisposant.
 - La saisonnalité des infections, les cas ayant été majoritairement contractés durant les mois les plus chauds de l'année.
 - La diversité des espèces impliquées : l'espèce prédominante reste l'espèce *V. cholerae* ; un cas de gastroentérite était associé à une souche de *V. furnissii*, espèce initialement décrite comme un sous groupe de l'espèce *V. fluvialis*. Ces deux espèces très proches ont été associées à des gastroentérites faisant suite à la consommation de produits de la mer, plus rarement à des bactériémies et des surinfection de plaies suite à un contact direct avec l'eau de mer.
- ↳ Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés, la source potentielle de contamination était la consommation de produits de la mer ou une exposition directe à de l'eau de mer ou de l'eau douce pour la majorité d'entre eux.
- ↳ Aucune des 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 CTX ϕ . Aucune ne possédait le gène *stn*, codant pour une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*. Toutes les souches possédaient les gènes *hlyA*, codant pour une hémolysine dont le rôle dans la virulence est controversé.
- ↳ Trois cas de gastroentérites et une infection de plaie à *V. parahaemolyticus* ont été rapportés, l'un sur la base d'une fiche d'information envoyée au CNR par un laboratoire hospitalier; sur les 2 souches à l'origine de gastroentérites étudiées au CNR, seule une souche possédait les gènes des hémolysines *tdh* et *trh*, associées au pouvoir pathogène de l'espèce ; Une autre souche ne possédait pas de facteur de pathogénicité connu mais a été responsable d'une gastroentérite chez un hôte présentant des antécédents de pathologie digestive, dont l'évolution a été sévère puisque évoluant vers une forme septicémique et état de choc ayant entraîné un décès. A noter un cas d'infection cutanée chez un patient ne présentant pas de facteur de risque connu. Un tel cas avait été décrit en 2008 mais en association avec un autre germe pathogène.
- ↳ Un cas inhabituel d'infection cutanée et septicémie à *V. alginolyticus*, chez un patient immuno-déprimé ayant eu un contact direct avec l'eau de mer, a été confirmé. Des surinfections de plaies à *V. alginolyticus*, avec ou sans bactériémie, ont déjà été rapportées, mais rarement en Europe.

La distribution des espèces isolées en fonction des syndromes est présentée dans le *Tableau 8*.

Tableau 8 Distribution des espèces de *Vibrio* non cholériques isolées chez l'homme sur le territoire français en 2014 et rapportées au CNR- Syndromes associés et contexte clinique et épidémiologique des infections

Espèce	Mois d'isolement	Nombre de souches reçues au CNR	Formes cliniques	Terrain prédisposant	Hospitalisation	Décès	Contexte ou source de contamination
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)		7*					
	03		Gastroentérite + septicémie	oui	oui	0	ND
	06		Gastroentérite	non	oui	0	Consommation de produits de la mer
	07		Infection cutanée, septicémie	oui	oui	0	Contact direct avec l'eau, consommation de produits de la mer
	08		Septicémie	non	oui	0	ND
	09		Gastroentérite	non	non	0	Consommation de produits de la mer
	10		Gastroentérite + septicémie	oui	oui	0	Réservoir d'eau de pluie
<i>V. furnissii</i>		1					
	11		Gastro-entérite	non	oui	0	ND
<i>V. alginolyticus</i>	07	1	Infection cutanée, septicémie	oui	oui	0	Contact direct avec l'eau de mer
<i>V. parahaemolyticus</i>		3					
	07		Gastro-entérite	non	oui	0	Consommation de produits de la mer
	08		Infection cutanée	non	oui	0	Contact direct avec l'eau de mer
	10		Gastroentérite + septicémie	oui	oui	1	Consommation de produits de la mer
	10**		Gastro-entérite	non	non	0	Consommation de produits de la mer
Total de cas		12				1	

ND : Non Documenté ou absence de contexte évocateur

* : correspondant à 6 cas cliniques, 2 souches ayant été isolées de 2 sites anatomiques différents chez un même patient

** : cas enregistré sur la base d'une fiche de recueil de données cliniques et épidémiologiques. Pas de souche reçue au CNR

3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

La surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux est devenue essentielle pour les vibrions cholériques. En effet, si l'antibiothérapie n'est pas essentielle pour le traitement du choléra (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), 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 vibrion, 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 dans un espace temps donné.

- Toutes les souches humaines isolées en France ou à l'étranger sont testées par la méthode de diffusion en milieu gélosé, l'interprétation est faite à partir des abaques de lecture publiés par la Société Française de Microbiologie (SFM) 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 les 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, triméthoprime-sulfaméthoxazole) ou sur les valeurs définies par la SFM pour les Entérobactéries.

↪ **Une multi résistance des souches de vibrions cholériques** aux antibiotiques est classiquement rapportée, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra (tétracycline, doxycycline, furazolidone, triméthoprime-sulfaméthoxazole, érythromycine et chloramphénicol, et plus récemment fluoroquinolones) a été observée ces dernières années.

- 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.

- 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.

Les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes importées sur le territoire français depuis 2006, antibiorésistance, supports génétiques de la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones, distribution et comparaison des toxinogénotypes, sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 9 : 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	+	+	+

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 + triméthoprim ; *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

↪ **Les souches de VNC isolées en France restent sensibles** à la majorité des antibiotiques testés. Les souches de l'espèce *V. cholerae* étaient les plus sensibles, les espèces *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus* étaient multi résistantes et en particulier résistantes à l'ampicilline. Le détail des phénotypes de résistance des souches isolées en France est donné dans le tableau suivant :

Tableau 10 Phénotypes de résistance des souches de VNC isolées sur le territoire français en 2014

N° CNRVC	Espèce	Pays d'exposition	Lieu d'isolement	Phénotype de résistance
140015	<i>V. cholerae</i>	France	Orléans (45)	PB, Cs
140016	<i>V. cholerae</i>	France	Orléans (45)	PB, Cs
140050	<i>V. cholerae</i>	France	La Rochelle (17)	PB, Cs
140053	<i>V. cholerae</i>	France	Nantes (44)	PB, Cs, (Sm)
140082	<i>V. alginolyticus</i>	France	La Rochelle (17)	Su, Sxt, Am, Te, O129
140093	<i>V. parahaemolyticus</i>	France	La Rochelle (17)	(Am), PB, (Sm)
140097	<i>V. parahaemolyticus</i>	France	La Rochelle (17)	(Su), Am, PB, (Sm)
140111	<i>V. cholerae</i>	France	Bayonne (64)	PB, Cs
140114	<i>V. cholerae</i>	France	Chauray (79)	PB, Cs
140115	<i>V. parahaemolyticus</i>	France	La Rochelle (17)	Am, PB, (Sm)
140116	<i>V. cholerae</i>	France	Saint Nazaire (44)	Am, PB, Cs
140179	<i>V. furnissii</i>	France	Cannes (06)	(SS), O129

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.

() : Sensibilité intermédiaire

- Toutes les souches de VNC isolées en 2014 étaient sensibles au composé vibriostatique O129.

3.3. Participation aux réseaux de surveillance

3-3.1 Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS (échanges de données, périodicité, analyse commune)

• 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 l'InVS (Département International et Tropical), lui-même alerté 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 l'InVS. 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 l'InVS 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 l'InVS et à la DGS.

- Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à vibrions non cholériques. Dès que le CNR a connaissance d'un cas d'infection à vibrion non cholérique, 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, est adressée au microbiologiste et/ou au clinicien. Cette fiche est accessible en ligne sur le site internet du CNR,

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/recueil-des-fiches>

Cette procédure permet d'identifier très rapidement d'éventuels cas groupés d'infections à vibrions non cholériques, les renseignements obtenus permettent au CNR de suivre l'évolution du nombre et des formes cliniques des infections provoquées par des vibrions autres que le vibrion cholérique, et leurs facteurs de risque. 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 l'InVS, département 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 l'InVS.

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

3-3.2 Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

- Toute identification par le CNR d'une souche de vibrion 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), 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 vibrion 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 vibrion cholériques et non cholériques.
- Le CNR participe au réseau Africhol, dans le cadre d'un projet de surveillance du choléra en Afrique sub-saharienne. Le projet se base sur 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). Une réunion de cette Task force en Juin 2014 a permis de définir des priorités d'action, les domaines concernés incluent en particulier la surveillance, la vaccination, l'assainissement et l'administration des soins de santé.

- La première réunion d'un groupe de travail de la Global Task Force on Cholera Control de l'OMS, dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra, s'est réuni à l'Institut Pasteur le 19 décembre 2014, sous la coordination du CNR.

3.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Dans le but de contribuer à une meilleure appréciation du risque sanitaire microbiologique, une étude de prévalence des *Vibrio* pathogènes dans les produits de la mer consommés en France a été menée en collaboration avec le laboratoire de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer. L'exposition au risque *Vibrio* suite à la consommation de produits de la mer importés ou locaux a été démontrée, les résultats ont été publiés en 2014, *Int J Food Microbiol*, 2014 Oct 17;189:75-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.014. Epub 2014 Jul 18.

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), l'InVS 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.

- **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 d'une fiche de DO spécifique à chaque maladie. La fiche choléra est disponible sur le site de l'InVS, ainsi que sur le site internet du CNR :

<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-vibrions-et-du-cholera/missions-specifiques>

De son côté, le CNR déclare l'identification d'une souche de vibron cholérique sur le territoire français (France Métropolitaine, DOM et Mayotte) à la DGS et à l'InVS, 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 l'InVS, Département 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. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année

↳ En 2014, seul le cas de choléra confirmé bactériologiquement par le CNR a fait l'objet d'un signalement par le biologiste auprès de l'ARS concernée (ARS de Bretagne). Ce cas a été notifié après isolement et caractérisation de la souche au CNR.

5/ Activités d'information, de formation et de conseil :

5-1. Enseignements et Formations

- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, "Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque", "Le Choléra : épidémiologie et prévention", 04/02/2014 (M-L Quilici).
- Cours Micro-organismes pathogènes et aliments, Institut de Formation ALPA Groupe, Institut Pasteur de Lille, 18/09/2014 (M-L Quilici).
- Cours Master 2, Université Paris 6, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. Epidémiologie du Choléra, 24/10/2014 (M-L Quilici).

5-2. 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 Master 2, Master professionnel Diagnostic Microbiologique, Approches innovantes, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Athenaïs GERBER, a été accueillie au CNR du 3 février au 31 juillet 2014, pour une étude portant sur la « Génétique des populations de *V. cholerae* O1 du toxinogénotype ctxB7 isolées en Afrique depuis le début de la septième pandémie cholérique ».
- Une étudiante en 2^{ème} année de BTS Bioanalyses et Contrôles, Eva BOROME, a été accueillie en stage de formation pour une durée de 8 semaines, du 27 octobre au 20 décembre 2014 pour une caractérisation phénotypique et moléculaire de souches de *V. cholerae* O1 isolées en 2010 au Niger.
- Un doctorant marocain, M. Abdellah El Boulani, étudiant à la Faculté des sciences de l'université Ibnou Zohr d'Agadir, a été accueilli au CNR du 3 novembre au 31 décembre 2014. Son travail porte sur l'« Etude des performances épuratoires microbiologiques des bassins de sable de la station d'épuration des eaux usées de L'Mzar ». Ce stage s'inscrit dans le cadre d'un Projet PRAD 14-06 CAMPUS N° 30290SG0, « Recherche des Vibrions pathogènes véhiculés par les eaux usées, étude de leur impact sur l'environnement marin et les cultures ».
- Un chercheur marocain, M. Radouane KRIEM, a été accueilli du 15 au 21 décembre 2014, dans le cadre de ce même projet.

➤ Un stage d'observation en milieu professionnel d'une durée d'une semaine a été réalisé par une élève de 3^{ème}, Malou Le GLAND, du 15 au 19/12/2014.

5-3. 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, Revue Francophone des Laboratoires (Elsevier Masson SAS), Dossier Les Maladies Tropicales, 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>

5-4. Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR

(i) Auprès des partenaires :

• InVS, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec l'InVS ont été décrits au point 3-3.1 de ce rapport pour les vibrions cholériques. Pour rappel, tout cas de choléra déclaré sur le territoire français fait l'objet d'interactions immédiates entre le CNR et l'InVS. De même la DGS est informée par le CNR dès confirmation d'un cas de choléra, ou lors de la survenue de tout phénomène lié aux *Vibrio* susceptible d'avoir une répercussion en santé publique (infections par des souches atypiques de vibrions cholériques, infections graves à *V. vulnificus*). Un bilan des cas de choléra importés en France a été réalisé et publié conjointement par l'InVS et le CNR en 2007, un bilan des cas importés entre 2010 et 2013 est en cours de rédaction. Concernant les vibrions non cholériques, le CNR signale à l'InVS 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 l'InVS sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles. Le CNR a publié des bilans des infections à vibrions non cholériques dans le bulletin de l'InVS « 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 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 références (articles généraux publiés dans l'EMC et la Presse Médicale, bilans du CNR publiés par l'InVS dans le BEH et dans les rapports de l'InVS, Surveillance Nationale des Maladies Infectieuses, « case reports »). Une fiche de recueil de données cliniques et épidémiologiques est systématiquement envoyée, l'importance de ce recueil est souligné, 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 infections 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 vibrions dans les prélèvements biologiques. Par ailleurs nous encourageons les médecins ou cliniciens à publier des « case reports ».

- Le CNR participe très activement à des enseignements, au niveau national et international, auprès de microbiologistes et professionnels de santé, transmettant à cette occasion les dernières méthodes de détection et d'identification des vibrions.
- Le rapport du CNR est accessible en ligne sur le site de l'Institut Pasteur. Les publications faisant état des données de surveillance sont listées dans la rubrique « actualités-rapports, principales publications du CNR des Vibrions et du Choléra classées par thèmes ».

5-5. Activités de conseil aux professionnels

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 vibrions@pasteur.fr a été mis en place pour la réception des demandes. Le volume d'activités est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

5-6. Activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

- La responsable du CNR est membre du groupe de travail « *Vibrio* » de l'AFNOR (agence française de normalisation) depuis 2010, sollicité pour réexaminer la méthode expérimentale XP ISO/TS 21872 : « Méthode horizontale pour la recherche des *Vibrio* potentiellement entéropathogènes. Partie 1 : Recherche de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* ».

- Le CNR a été sollicité en 2013 et en 2014 par la Direction Générale de l’Alimentation (DGAL), ministère de l’agriculture, de l’agroalimentaire et de la forêt, pour avis concernant la rédaction d’une note de service ayant pour objet le « Jugement de conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles officiels », demandés lors de contrôles à l’importation ou dans le cadre d’investigation de TIAC. Bien qu’aucun cas d’infection par voie alimentaire n’ait été documenté en France, ni même en Europe, il a été envisagé pour la première fois de prendre en compte le risque lié à la présence de *V. vulnificus* dans les aliments. La position de la DGAL a évolué suite aux dernières données épidémiologiques rapportées, faisant état d’une augmentation du nombre de cas d’infection aux Etats-Unis, au Japon, et dernièrement de trois cas en Nouvelle-Calédonie, clairement associés à la consommation d’huîtres crues. A noter qu’aux Etats-Unis, les infections à VNC sont des maladies à déclaration obligatoire depuis 2007 et que la Food and Drug Administration a une tolérance « zéro » pour l’espèce *V. vulnificus* dans les fruits de mer.

- La responsable du CNR a été invitée par l’OMS, en tant qu’expert au « First Meeting of the Global Task Force for Cholera Control (GTFCC) », Genève, Suisse, les 26 -27 Juin 2014. L’objectif de cette Task Force est la réduction de la mortalité et de la morbidité du choléra à travers le monde. La GTFCC vise à atteindre cet objectif par le renforcement de la collaboration internationale et une meilleure coordination entre les parties prenantes actives dans les activités liées au choléra.

- La responsable du CNR a été invitée par MSF, Operational Center of Geneva, à un Workshop “Diarrheal Diseases, Ongoing Challenges and Perspectives” le 30 septembre 2014. L’objectif était de lancer un débat sur les différentes stratégies de lutte contre le choléra, identifier les lacunes potentielles et réfléchir à améliorer les possibilités de diagnostic sur le terrain pour les maladies entériques.

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. Etudes appliquées à la surveillance du choléra

Collaborations internationales

• Etude de l'efficacité d'un vaccin anticholérique oral en mesure réactive face à une épidémie

Partenaires : Epicentre, Paris, France, Médecins sans Frontières, Geneva, Switzerland, Ministry of Health, Conakry, Guinea, African Cholera Surveillance Network, Agence de Médecine Préventive Paris, France, Direction Préfectorale de la Santé, Ministry of Health, Conakry, Guinea, Section de Recherche, Ministry of Health, Conakry, Guinea, Médecins sans Frontières, Conakry, Guinea, World Health Organization, Conakry, Guinea, National Reference Centre for Vibrions and Cholera, Enteric Bacterial Pathogens Research & Expertise Unit, Institut Pasteur, Paris, France, Department of Microbiology, University of Valladolid, Valladolid, Spain

Un vaccin anticholérique oral bivalent (O1 et O139) à germes entiers inactivés, produit en Inde, a été présélectionné par l'OMS, qui recommande aujourd'hui son utilisation de façon réactive « pour réduire la mortalité dans les zones où d'autres interventions ne peuvent être mises en place efficacement », intégrant ainsi la vaccination comme moyen de lutte contre les épidémies de choléra. Ce vaccin avait fait la preuve de son efficacité en mesure de prévention, il a été utilisé ici en mesure réactive durant l'épidémie de choléra survenue en République de Guinée en 2012. Une étude cas-témoins a montré l'efficacité rapide du vaccin oral, démontrant l'intérêt de son utilisation en mesure réactive, comme instrument de contrôle des épidémies.

Ce travail a été publié en 2014,

Luquero FJ, Grout L, Ciglenecki I, Sakoba K, Traore B, Melat Heile, Alpha Amadou Diallo, Christian Itama, Page AL, **Quilici ML**, Menguel MA, Jose Maria Eiros, Micaela Serafini, Dominique Legros, MD, Rebecca F. Grais. Effectiveness of a killed whole cell *V. cholerae* vaccine as a part of the epidemic response, Guinea, 2012. *N Engl J Med.*, 370(22):2111-20. doi: 10.1056/NEJMoa1312680

• Surveillance épidémiologique du choléra au Tchad : analyse de la structure des populations des souches de *V. cholerae* O1 par développement d'un système de sous-typage moléculaire par la méthode MLVA

Collaboration avec Action contre la faim (ACF), l'Hôpital Général de Référence Nationale (HGRN) de Ndjaména, financement de l'European Community Humanitarian Office (ECHO).

• Analyse génomique de *V. cholerae* O1

Collaboration avec N. Thomson du Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Royaume Uni.

Afin de mieux comprendre l'émergence du choléra en Afrique dans les années 1970, son évolution sur ce continent et l'expansion du choléra vers le continent sud américain, plus de 300 génomes de *V. cholerae* O1 sont actuellement séquencés au Wellcome Trust Sanger Institute.

• Collaboration avec les Instituts du réseau international des Instituts Pasteur.

Le CNR collabore avec les Instituts Pasteur de République Centrafricaine (RCA), de Côte d'Ivoire et du Cameroun pour la description des souches de vibrions cholériques responsables des épidémies de choléra dans ces différents pays.

• Analyse de l'origine et l'évolution dynamique de l'épidémie de choléra de 2014 au Sud Soudan, collaboration avec le Ministère de la santé du Sud Soudan, World Health Organization South Sudan Country Office, Kenya Medical Research Institute, MSF / Epicentre.

• **Immunogénicité d'un vaccin anticholérique oral administré par un schéma vaccinal avec la deuxième dose différé. Kalemie, République démocratique du Congo**

Collaboration avec Epicentre, Paris, France, Médecins Sans Frontières, Paris, France, New York, USA, Lubumbashi, DRC, Ministère de la Santé Publique, DRC, Organisation mondiale de la santé Genève, Suisse

En 2010, l'OMS a révisé ses recommandations pour soutenir l'utilisation du vaccin anticholérique oral (VCO) en réponse aux épidémies. Souvent, les campagnes de vaccination dans des contextes précaires sont interrompues. Par conséquent, des informations sur l'immunogénicité d'un schéma vaccinal prolongé, avec une deuxième dose administrée plus tard que ce qui est actuellement recommandé, seraient utiles aux autorités de santé et aux organismes internationaux afin de comprendre les avantages et les risques des schémas vaccinaux élargis. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'immunogénicité du VCO *Shanchol* © administré selon un schéma vaccinal incluant une deuxième dose différée de 8 mois, contre la pratique actuelle d'administration à 14 jours. La comparaison des niveaux d'anticorps vibriocides après deux doses de vaccin oral administrées à 14 jours ou à 8 mois d'intervalle est en cours, plus de 1300 sérums ont été prélevés en RDC en 2014.

6-2. Études des vibrions non cholériques

Collaborations nationales

• **Étude de prévalence des *Vibrio* pathogènes dans les produits de la mer consommés en France**

En collaboration avec le laboratoire de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer, la CITPPM (Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes), l'UMF (Union du Mareyage Français). Financement par France Agrimer dans le cadre des programmes OFIMER et PREVAVIB

L'efficacité d'une méthode combinant les procédures NPP et PCR pour la mise en évidence des souches pathogènes de *V. parahaemolyticus* a été démontrée. Une PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été développée et évaluée, permettant la détection des *V. parahaemolyticus* totaux et pathogènes après une période d'enrichissement de moins de 6 h dans des crevettes contaminées artificiellement ou naturellement, même avec un taux de contamination initial <5 bactéries/g. La méthode qPCR a été étendue à la détection des espèces *V. cholerae* et *V. vulnificus*, et à l'analyse d'autres matrices alimentaires. Une étude de prévalence des espèces de *Vibrio* pathogènes dans les produits consommés en France, d'origine locale ou importés, a été réalisée.

Les résultats ont été présentés sous forme de communication affichée,

Copin S, Robert-Pillot A, Himber C, Gay M, Quilici ML. Occurrence of the three major pathogenic Vibrio spp. in seafood products available in France. VIBRIO 2014 Conference, 1-4 April 2014 – Edinburgh - United Kingdom,

Et ont fait l'objet d'une publication dans une revue internationale,

Robert-Pillot A, Copin S, Himber C, Gay M, Quilici ML. Occurrence of the three major pathogenic Vibrio in seafood products consumed in France: detection and quantification by real-time PCR. Int J Food Microbiol, 2014 Oct 17;189:75-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.014. Epub 2014 Jul 18.

• **Développement d'un système miniaturisé pour la détection des vibrions pathogènes par voie alimentaire dans les produits de la mer par PCR en temps réel.**

En collaboration avec l'ANSES, Laboratoire de sécurité des aliments, sites de Maisons-Alfort et de Boulogne-sur-Mer, la CITPPM (Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes), le SGM, Syndicat Général des Mareyeurs. Financement par France Agrimer dans le cadre du projet GENVIB

Dans cette étude, une méthode de PCR en temps réel multiplex miniaturisée et automatisée (GeneDiscCycler®) permettant de détecter simultanément dans des matrices d'origine alimentaire la présence des trois espèces de *Vibrio* pathogènes par voie alimentaire a été développée. La méthode a été appliquée à 342 échantillons artificiellement contaminés à différentes concentrations bactériennes ainsi qu'à 280 produits de la mer frais ou congelés. Les résultats obtenus étaient variables selon le lot de disques (production expérimentale pour ce programme), le type de matrice, le gène ciblé et le niveau de contamination. L'application sur des produits naturellement contaminés à faibles niveaux nécessite encore une optimisation. Le système GeneDiscCycler®, qui a fait ses preuves pour d'autres pathogènes (*E. coli* et *Salmonella*), pourrait être un outil de diagnostic pour la détection et la caractérisation des *Vibrio*.

Collaborations internationales

• Programme franco-marocain de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD)

Le Ministère français des Affaires Étrangères et le Ministère marocain de l'Agriculture et du Développement Rural se sont associés pour participer au financement de projets conjoints de recherche entre la France et le Maroc dans le domaine de la recherche agronomique pour le développement (Partenariats Hubert Curien, PRAD). Ces projets sont ciblés sur le développement de partenariats scientifiques et de formations. Nous avons obtenu en 2013 un financement pour une durée de 3 ans (2014-2016), la thématique porte sur la "Recherche des Vibrions pathogènes véhiculés par les eaux usées, étude de leur impact sur l'environnement marin et les cultures".

6-3 Liste des publications et communications

- Publications internationales

Luquero FJ, Grout L, Ciglenecki I, Sakoba K, Traore B, Heile M, Diallo AA, Itama C, Page AL, Quilici ML, Mengel MA, Eiros JM, Serafini M, Legros D, Grais RF. (2014). Use of Vibrio cholerae vaccine in an outbreak in Guinea. N Engl J Med., 370(22):2111-20. doi: 10.1056/NEJMoa1312680.

Robert-Pillot A, Copin S, Himber C, Gay M, Quilici ML. Occurrence of the three major pathogenic Vibrio in seafood products consumed in France: detection and quantification by real-time PCR. Int J Food Microbiol, 2014 Oct 17;189:75-81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.014. Epub 2014 Jul 18.

- Communication nationale

Copin S, Robert-Pillot A, Himber C, Gay M, Quilici ML Développement d'un système miniaturisé pour la détection des vibrions pathogènes par voie alimentaire dans les produits de la mer par PCR en temps réel. Journées des Plates-Formes de l'ANSES, La Plate-Forme Identypath, 30 janvier 2014, ANSES, Site de Maisons-Alfort

- Communications internationales

Copin S, Robert-Pillot A, Himber C, Gay M, Quilici ML. Communication affichée Occurrence of the three major pathogenic Vibrio spp. in seafood products available in France. VIBRIO 2014 Conference, 1-4 April 2014 – Edinburgh - United Kingdom,

Quilici ML. Communication orale *Mobilisation of the IP Paris and the International Network of Pasteur Institutes in the revitalisation of the global task force for cholera control (GTFCC). International Scientific Symposium - Institut Pasteur International Network - Paris, September 14-16, 2014*

- *Manuscrits soumis*

Deshayes S, Daurel C, Cattoir V, Parienti JJ, **Quilici ML** and de La Blanchardière A. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia: case report and literature review. SpringerPlus

Kriem M; Banni B; El Bouchtaoui H; Hamama A; El Marrakchi A; Chaouqy N; **Robert-Pillot A; Quilici ML.** Prevalence and characterization of *Vibrio* spp. in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) from Morocco and performance of a chromogenic medium for the isolation of *Vibrio* strains. *Letters in Applied Microbiology*

Copin S, **Robert-Pillot A**, Gay M, **Quilici ML.** *Vibrio* involved in human pathology: a study of their repartition in seafood consumed in France. *Bulletin Epidémiologique Santé animale– Alimentation.*

- *Conférence sur invitation*

Quilici ML, MSF Genève, communication orale, “Diarrheal Diseases, Ongoing Challenges and Perspectives” le 30 septembre 2014.

7/ **Coopération avec les laboratoires de santé animale, d’hygiène alimentaire, et 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 a 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.

- Les autres partenaires du CNR dans le domaine alimentaire ont été en 2014 :
 - PFI Nouvelle Vague (CEVPM) – Boulogne sur mer
 - Le Laboratoire SILLIKER, La Rochelle
 - Le laboratoire Adour Bio Conseil, Arzacq
 - Le LEHA, Laboratoire d'études et d'hygiène alimentaire de Rennes
 - Le laboratoire Départemental d'analyses du Morbihan (LDA 56)

- Dans le domaine de l'environnement, le CNR collabore régulièrement avec l'IFREMER, LNR Microbiologie des coquillages, pour des confirmations d'identification et caractérisation de souches de *Vibrio*, le plus souvent dans le cadre d'enquêtes ponctuelles. Une étude a été menée en 2012 pour déterminer l'origine d'un cas d'infection à *V. cholerae* non-O1 /non-O139.

- En 2014, le CNR a également collaboré avec IPL Atlantique – Bordeaux, laboratoire spécialisé en analyses de l'eau.

- 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 ont 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 ».

8/ Programme d'activité pour 2015-2016

Le CNR poursuivra son activité conformément au programme de travail quinquennal présenté dans le dernier dossier de candidature de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques pour être désignée CNR des Vibrions et du Choléra.

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

ANNEXES

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

- 1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR*
- 1.2 Description de l'équipe et organigramme*
- 1.3 Locaux et équipements*
- 1.4 Démarche qualité du laboratoire*

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

- 2.1 Techniques de référence*
- 2.2 Marqueurs épidémiologiques disponibles*
- 2.3 Collection de souches, antigènes ou immun-sérums de référence*
- 2.4 Techniques recommandées par le CNR*

Annexe 1 : Missions et organisation du 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 ».

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 Description de l'équipe et organigramme

Le CNR fait partie de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, 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	Libellé Emploi	Qualification - Echelle	% Act.	% Section Bud.	ETP
Mme QUILICI Marie-Laure	Scientifique	Chargée de Recherches – Responsable CNR	100,00	40,00	0,40
M. WEILL François-Xavier (jusqu'au 30 août 2014)	Cadre administratif et technique	Cadre confirmé B – Co-responsable CNR	100,00	10,00	0,07
M. GARIN Benoît (à partir du 1 ^{er} septembre)	Cadre administratif et technique	Cadre confirmé B – Responsable-adjoint CNR	100,00	10,00	0,03
M. RAUZIER Jean	Technicien supérieur de laboratoire	Technicien supérieur de laboratoire 1er degré Echelle 6	100,00	75,00	0,75
Mme LEMESLE Marie	Secrétaire	Secrétaire 2ème degré Echelle 4	100,00	25,00	0,25
TOTAL ETP					1,50

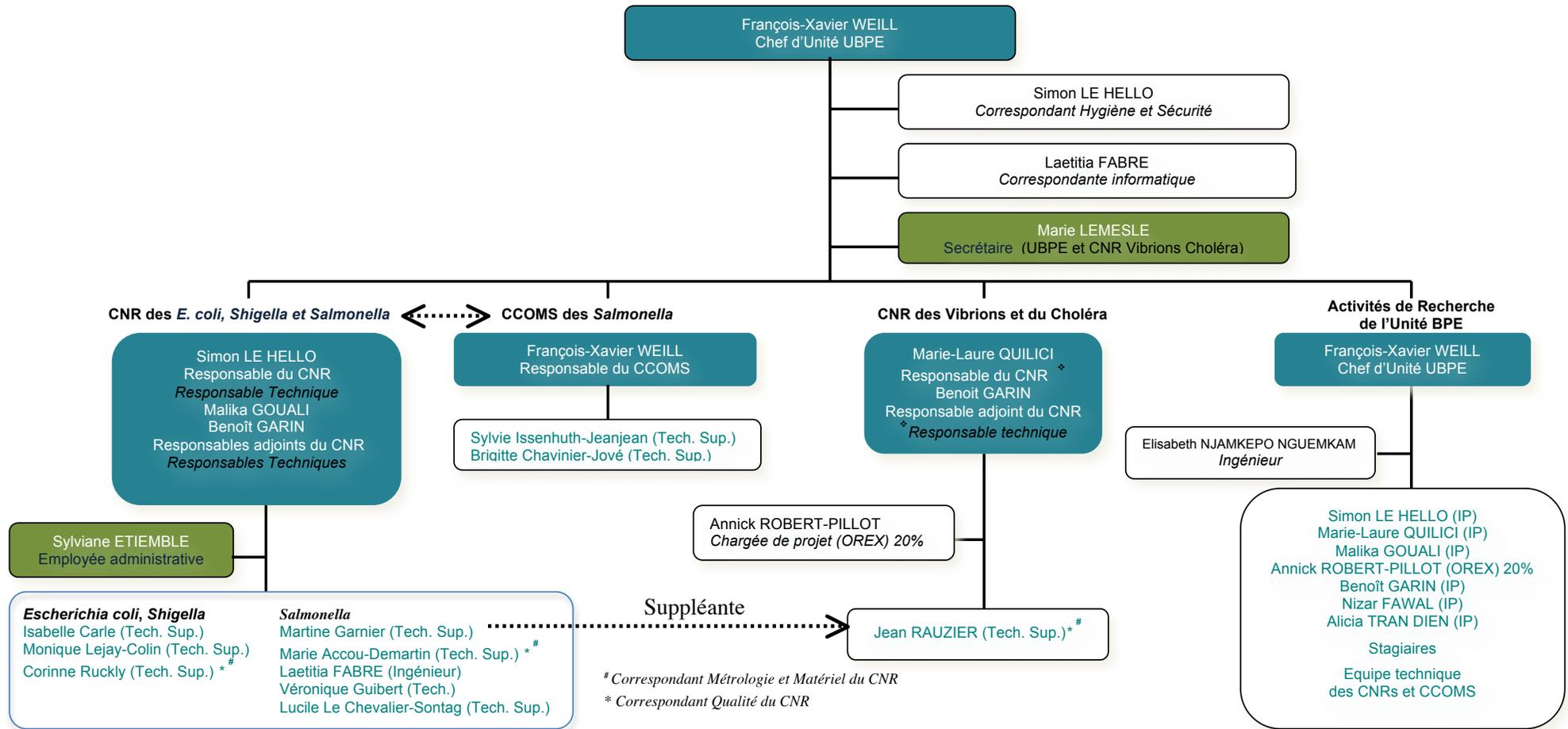
Ont contribué en 2014 à l'activité du CNR :

ROBERT-PILLOT* Annick	Scientifique contractuelle	Chargée de projet-OREX**	20,00	0,00	0,2
--------------------------	----------------------------	--------------------------	-------	------	------------

* Salariée ANSES en CDD, détachée à l'Institut Pasteur

**OREX : organisme de recherche extérieur

Organigramme de l'unité de recherche et d'expertise des Bactéries Pathogènes Entériques



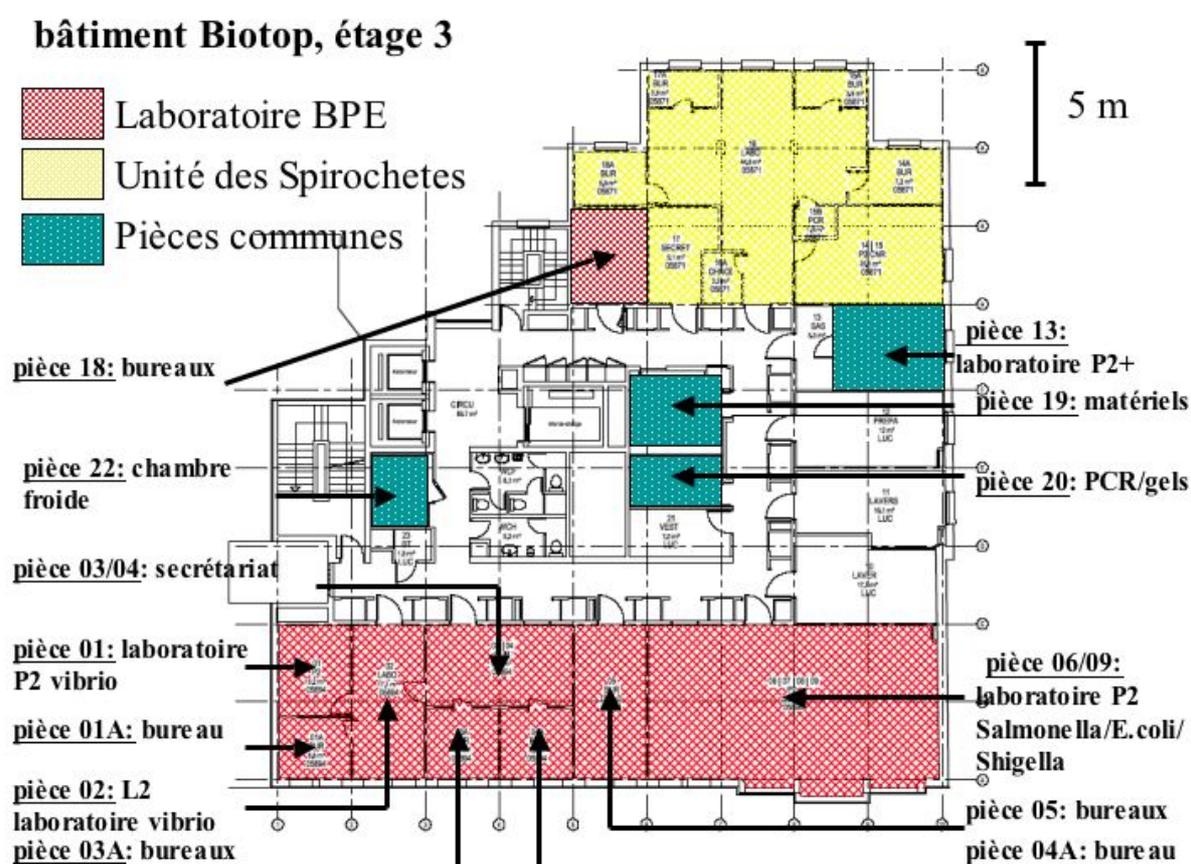
Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.3 Locaux et équipements

1.3-1 Locaux

Le CNR des Vibrions et du Choléra est situé dans l'unité des Bactéries Pathogènes Entériques à l'Institut Pasteur, qui inclut le Centre National de Référence des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* (CNR-ESS), le CNR des Vibrions et du Choléra et le Centre Collaborateur de l'OMS pour la Référence et la Recherche sur les *Salmonella*.

Cette unité est localisée au 3^{ème} étage du bâtiment Biotop :



En 2012, l'UBPE a acquis de nouveaux locaux situés aux 1^{er} et 4^{ème} étages du bâtiment Biotop.

Les pièces du 4^{ème} étage sont plus spécifiquement dédiées aux activités du CNR ESS.

Les locaux du 1^{er} étage, d'une superficie de 33 m², sont partagés entre l'unité BPE et le CNR des Leptospires (Unité des Spirochètes). Ils ont été aménagés pour un circuit de marche en avant pour la réalisation de PCR diagnostiques.

- Deux laboratoires (pièces 01 et 02), pour une surface totale de 26 m², sont spécifiquement dédiés aux activités de bactériologie (P2) et biologie moléculaire du CNR des Vibrions et du Choléra ; un de ces deux laboratoires, dont l'accès est limité au personnel du CNR, est également la pièce d'archivage des dossiers.

- D'autres locaux techniques sont partagés entre l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques et l'Unité des Spirochètes :
 - Un local réservé à l'électrophorèse en champ pulsé (pièce 13),
 - Une pièce climatisée pour les électrophorèses (pièce 20),
 - Une chambre froide (pièce 22),
 - Un local technique abritant du gros matériel (pièce 19).

- Le CNR-VC comprend également :
 - Un local technique au sous sol du bâtiment Biotop, abritant des congélateurs à -80°C contenant une partie de la collection du CNR, partagé avec d'autres entités.
 - Un local côté 25 rue du Dr Roux, abritant des containers d'azote liquide contenant une partie de la collection de souches du CNR, partagé avec d'autres entités.
 - Un local côté 28 rue du Dr Roux, hors Biotop, contenant les souches lyophilisées du CNR, partagé avec d'autres entités.
 - Un secrétariat commun à l'Unité,
 - Un bureau pour le responsable du CNR (pièce 01A),
 - Deux postes dans un bureau commun à l'ensemble du personnel de l'Unité, un pour le technicien du CNR et un pour un stagiaire (pièce 18).

1.3-2 Équipements

Spécifiques au CNR :

- Équipement courant d'un laboratoire de bactériologie : 2 enceintes climatiques (30°C , 37°C), 1 poste de sécurité microbiologique de classe I, 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.

Commun à l'Unité BPE :

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

Partagés 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
- 1 congélateur à -80°C de secours pour l'ensemble du bâtiment Biotop.

1.3-3 Moyens extérieurs à la structure et services supports

- 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.
- Animalerie.
- Cellule d'intervention biologique d'urgence (CIBU).
- Service de Coordination des CNR, 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.
- Réseau informatique de l'Institut Pasteur.
- Médiathèque Scientifique de l'Institut Pasteur.
- Assistance d'Epiconcept pour le bon fonctionnement et l'amélioration du logiciel « Lagon » utilisé au CNR pour enregistrer les analyses.

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.4 Démarche qualité du laboratoire

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Pour des raisons de coûts mais également d'harmonisation du système de management de la qualité, la démarche d'accréditation des différents CNR est considérée comme une accréditation multi-sites. L'ensemble des CNR faisant partie de ce que l'on a appelé : Le laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Sites (LREMS).

Projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur :

L'accréditation des activités analytiques au sein des différents CNR se fera en quatre vagues en tenant compte de leur état d'avancement de leur système de management de la qualité.

Bilan des actions réalisées en 2014 :

- Groupe de Travail Technique pour les validations de méthode (biologie moléculaire et sérologie) ;
- Mise à jour du manuel qualité (V2)
- Formations : WebCampus (utilisateur et administrateur) et Kalilab ;
- Audits internes techniques ISO 15189 pour les sites concernés par l'audit ISO 15189 ;
- Revue de direction LREMS ;
- Inclusion de la vague 3 (CNR Anaérobie, CNR Yersinia, CNR Mycose et antifongique et CNR E. Coli) dans la démarche d'accréditation ISO 15189.
- Création d'une vague 4 (CNR HPV, Vibriion Choléra, E. Coli)

Evènements d'importance en 2014 :

Des activités analytiques ont été accrédités au sein des CNR des Leptospires, de la Coqueluche et autres bordetelloses, Corynebactéries, Virus Influenzae et la Rage. Le LREMS est accrédité par le COFRAC selon la norme NF EN ISO 15189 pour une partie de ses activités analytiques depuis le 21 mars 2014.

Perspectives 2015 :

- Audits internes qualité et technique ISO 15189 : Mars à mai 2015
- Revue de direction LREMS : Mai 2015
- Finalisation dossiers de validation de méthode (3ème vague) : Mars 2015
- Audit de suivi ISO 15189 version 2007 avec extension du périmètre (nouvelles techniques et nouveaux sites) : janvier 2015
- Audit ISO 15189 de renouvellement en version 2012 (1ère, 2ème et 3ème vagues) : juin 2015

Pour le CNR des Vibrions et du choléra, la portée d'accréditation concernera le diagnostic des infections à vibrions cholériques et non cholériques par l'identification des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*.

- En 2014, le CNR a participé à un contrôle de qualité externe, organisé par le CHU de Liège, par l'analyse de 6 souches de *Vibrio*.

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.
- 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.
- Typage moléculaire des souches de vibrions.

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.
- 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.

2.1-4 Identification bactérienne

Tests phénotypiques :

- Mise en culture et isollements, 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.

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

2.1-6 Typage moléculaire

- Electrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour toutes les souches de *V. cholerae* O1 ou O139, ainsi que les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 et *V. parahaemolyticus* d'origine clinique, isolées en France et à l'étranger. 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), elle est appliquée à la surveillance épidémiologique des souches circulant dans le monde (diversification des populations, introduction éventuelle d'une nouvelle souche,

origine des cas importés, ...). Une standardisation de la méthode pour chacune de ces deux espèces a été publiée par le réseau PulseNet USA afin de pouvoir effectuer des comparaisons de profils inter-laboratoires.

- Typage moléculaire par AP-PCR pour les souches de *V. parahaemolyticus* d'origine humaine ou environnementale susceptibles d'appartenir aux différents clones pandémiques circulant dans le monde, sur la base des résultats de PCR.
- 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 CTXΦ, 3) gène *rstR* codant pour un répresseur du phage CTXφ.

2.1-7 Détermination phénotypique et génotypique de la sensibilité aux agents antimicrobiens

- Un antibiogramme standard est réalisé selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 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, Ofloxacine, Norfloxacin, Ciprofloxacine, Pefloxacine.
 - Tétracyclines : Tétracycline, Doxycycline, Minocycline.
 - Sulfamides et associations : Sulfamides, Triméthoprim-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 est faite à partir des abaques de lecture publiés par la Société Française de Microbiologie 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 bioMerieux) 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.

2.1-8 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 vibriion cholérique.

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.
- Techniques de typage moléculaire : deux techniques ont été couramment utilisées pour le suivi des souches de vibrions cholériques,
 - ✓ La ribotypie, qui 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) : cette méthode est utilisée par la plupart des laboratoires dans le monde selon un protocole standardisé (PulseNet) ; son pouvoir discriminant est cependant limité.

- ✓ Le profil de résistance aux antibiotiques est également un marqueur permettant un suivi épidémiologique des souches.

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).
 - ✓ AP-PCR pour la caractérisation des clones pandémiques de *V. parahaemolyticus*, circulant dans le monde depuis 1996

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.3 Collection de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

- 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. La majorité d'entre elles sont des souches de vibriens cholériques. Ce matériel biologique permet de suivre l'évolution des populations bactériennes.
 - Toutes les souches 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 vibriens 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) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

De même le CNR peut être amené à distribuer des immuns sérums de référence aux biologistes de pays déclarant des cas de choléra, dans le cadre de collaborations permettant au CNR l'étude de souches en provenance de l'étranger.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.4 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 vibrion 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.

- 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.