

Rapport annuel d'activité

2020

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



**Année d'exercice
2019**

SOMMAIRE

Résumé analytique.....	4
Analytical summary.....	5
1/ Missions et organisation du CNR.....	6
1-1. Equipe et organigramme du CNR.....	6
1-2 Démarche qualité du CNRVC en 2019.....	6
2/ Activités d'expertise.....	7
2-1. Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2019.....	8
2-2. Evaluation des techniques et réactifs.....	8
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	9
2-4 Collections de matériel biologique.....	9
2-5 Activités d'expertise de l'année 2019.....	9
2-5.1 Echantillons étudiés.....	10
2-5.2 Niveau de caractérisation réalisé.....	11
2-6 Activités de séquençage.....	13
3/ Activités de surveillance.....	13
3-1. <i>Vibrio cholérique</i>	13
3-1.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	13
3-1.2 Evolution et caractéristiques des infections.....	14
3-1.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux.....	15
3-1.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	18
3-1.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	20
3-2. <i>Vibrions non cholériques</i>	20
3-2.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	20
3-2.2 Evolution des caractéristiques des infections.....	22
3-2.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux.....	25
3-2.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	26
3-2.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	26
4/ Alerte.....	27
4-1. Procédure d'alerte.....	27
4-2. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année.....	28
5/ Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	28
5-1. Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	28
5-1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé.....	28
5-1.2 Accueil de stagiaires.....	29
5-1.3. Guides élaborés.....	30
5-1.4. Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNR.....	30
5-1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé.....	31
5-2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires nationales et internationales.....	31
6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	32
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2019.....	33
6.2. Liste des publications et communications 2019.....	35
7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	37
8/ Programme d'activité 2020-2021.....	38

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

1.2 Organisation du CNR

1.3 Locaux et équipements

1.4 Collections de matériel biologique

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Techniques de référence, marqueurs épidémiologiques disponibles

2.2 Techniques recommandées par le CNR

Annexe supplémentaire : Déclaration d'intérêt

Résumé analytique

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

• **Le choléra** reste aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique dans toutes les régions du monde, représentant une charge estimative de près de 3 millions de cas et 95 000 décès par an, selon l'OMS. Le continent africain est le plus touché, le choléra est également très présent en Asie où il circule de manière endémique. Le RSI 2005 encourage les pays confrontés à des épidémies de choléra à rapporter les cas à l'OMS. Cette maladie est à déclaration obligatoire en France, où des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques peuvent survenir de façon sporadique. La détection et l'investigation systématique des cas sur le territoire français restent justifiées afin d'identifier tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave, surveiller les co-exposés à une même source de contamination, et du fait des risques de propagation dans certains groupes de populations dans les territoires français d'outre-mer. La déclaration doit être faite dans les délais les plus brefs aux autorités de santé après confirmation d'identification par le CNR. **En 2019, cinq cas de choléra ont été diagnostiqués sur le territoire français, tous importés d'Asie du Sud.**

Le CNR a poursuivi ses collaborations avec les pays étrangers soumis à des épidémies de choléra, en apportant une aide à l'identification et la caractérisation des souches, également au suivi de leur résistance aux antibactériens. C'est ainsi qu'il a participé à la surveillance des souches responsables d'épidémies au Cameroun, Bénin, Somalie, également au Yémen, qui rapporte depuis 2016 l'épidémie la plus importante jamais enregistrée. La description d'une nouvelle sous-lignée de souches de vibrions cholériques associée à cette épidémie a été publiée en 2019 dans la revue « Nature ».

Le CNR a poursuivi en 2020 son implication au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, partenariat entre plus de 50 institutions, par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire", concourant à la réalisation de la feuille de route mondiale de l'OMS ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030. Deux pays membres de la GTFCC, le Sud-Soudan, régulièrement touché par le choléra et tout particulièrement depuis 2014, et Haïti, soumis à une épidémie désastreuse depuis 2010, n'ont signalé aucun cas de choléra depuis 2017 et fin janvier 2019 respectivement.

• **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. La consommation de produits de la mer et l'exposition de plaies au milieu marin sont les deux voies de contamination. Le nombre de souches isolées est en constante augmentation depuis 2016 et **69 cas cliniques d'infections à VNC ont été confirmés en 2019**, majoritairement associés à *V. parahaemolyticus* (n=37) et *V. cholerae* (n=25). Un lien avec le milieu marin, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer, a été établi dans plus de 70% des cas, l'ingestion d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits en particulier, étant la voie essentielle de contamination. Plus de 90 % des cas d'infections se sont manifestés par des gastroentérites. A noter la confirmation de gastroentérites à *V. fluvialis* (4 cas en 2019), espèce bien identifiée aujourd'hui par spectrométrie de masse, concordant avec ce qui est rapporté au niveau mondial depuis quelques années.

Le CNR a poursuivi ses échanges avec ses laboratoires correspondants sur leurs méthodes d'identification, PCR multiplex syndromique et/ou spectrométrie de masse. L'évolution des techniques de diagnostic peut expliquer l'augmentation du nombre de cas, mais il est clair qu'elle est également associée aux températures élevées mesurées en 2018 et 2019, l'ANSES ayant également observé une augmentation du nombre d'échantillons de produits de la mer positifs à *Vibrio*. Une des conséquences de cette évolution est l'augmentation du nombre de souches ou échantillons biologiques envoyés par des laboratoires de ville, et une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés.

Analytical summary

The French national reference center for vibrios and cholera (CNRVC) is responsible for the microbiological surveillance of cholera and other *Vibrio* infections (non-cholera *Vibrio* (NCV) infections) in France. It is also involved in monitoring and combating cholera at the international scale, and it works with laboratories specializing in food hygiene or environmental microbiology for the surveillance of NCV infections.

• **Cholera** remains a major public health problem in all regions of the world, with an estimated burden of about three million cases and 95,000 deaths per year, according to the WHO. Africa is the continent worst affected, but cholera is also present in Asia, where it circulates in an endemic manner. International Health Regulation (IHR) 2005 encourages countries confronted with epidemics of cholera to report cases to the WHO. Cholera is a notifiable disease in France, where isolated cases of imported cholera in travelers returning from zones in which cholera is endemic or epidemic may occur in a sporadic manner. The detection and systematic investigation of cases on French soil remains justified, to ensure the detection of all cases likely to progress to a serious form, to monitor individuals exposed to the same source of contamination, and due to the risk of propagation in certain groups of populations in French overseas territories. Cases must be declared to the health authorities as soon as possible after the diagnosis is confirmed by the national reference center (the CNRVC, in France). **In 2019, five cases of cholera were diagnosed on French soil, all imported from South Asia.**

The CNR has pursued its collaborations with other countries subject to cholera epidemics, providing assistance with the identification and characterization of strains and the monitoring of antibiotic resistance. In this way, it participated in surveillance of the strains responsible for the epidemics in Cameroon, Benin, Somalia and Yemen, which has been since 2016 in the grip of the largest epidemic ever recorded. The description of a new sublineage of cholera *Vibrio* strains associated with this epidemic was published in Nature in 2019.

In 2019, the CNR continued its work within the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) of the WHO, a partnership of more than 50 institutions, as the leader of the Laboratory Surveillance Working Group, supporting the WHO roadmap, with the objective of decreasing the number of deaths due to cholera by 90% by 2030. Two member states of the GTFCC, South Sudan, which is regularly affected by cholera, particularly since 2014, and Haiti, which has been suffering from a disastrous epidemic since 2010, have reported no new cases of cholera since 2017 and the end of January 2019, respectively.

• **Non-cholera vibrios** (NCVs) of medical interest, essentially the species *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, cause sporadic infections, gastroenteritis, suppurative infections, septicemia, which may follow an extremely severe course, and, more rarely, collective cases of food poisoning. The consumption of seafood and the exposure of wounds in marine environments are the two routes of contamination. The number of strains isolated has been steadily increasing since 2016, and **69 clinical cases of NCV infection were confirmed in 2019**, mostly associated with *V. parahaemolyticus* (n=37) and *V. cholerae* (n=25). A link to the marine environment, the consumption of seafood or direct contact with seawater was established in more than 70% of cases, with the ingestion of contaminated foods, raw or undercooked seafood in particular, being the major route of contamination. More than 90% of infections manifest as gastroenteritis. The confirmation of cases of gastroenteritis due to *V. fluvialis* (4 cases in 2019), a species well-identified today by mass spectrometry, is consistent with reports of cases worldwide over the last few years.

The CNR has continued its exchanges with collaborating laboratories concerning their identification methods: syndromic multiplex PCR and/or mass spectrometry. Changes in the techniques used for diagnosis may explain the increase in the number of cases, but it is clear that this increase is also associated with the high temperatures recorded in 2018 and 2019, with the ANSES also observing an increase in the number of seafood samples testing positive for vibrios. One of the consequences of this development is an increase in the number of strains or biological samples sent by private medical testing laboratories, improving the detection of paucisymptomatic cases not requiring hospitalization.

1/ Missions et organisation du CNR

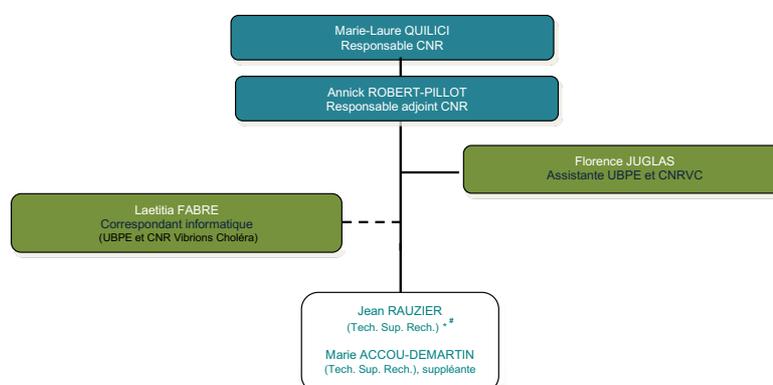
Les missions et objectifs majeurs du CNR sont présentés en *annexe 1* du présent rapport.

1.1 Equipe et organigramme du CNRVC

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

Organigramme du CNR

	Support d'enregistrement	Version
	Organigramme	E



Légende :

— Relation hiérarchique et fonctionnelle
- - - Relation fonctionnelle

* Correspondant Qualité du CNR
Correspondant Métrologie et Matériel du CNR



LA VERSION GARANTIE À JOUR DE CE DOCUMENT EST EN LIGNE SUR WEBCAMPUS
CE DOCUMENT EST À L'USAGE EXCLUSIF DE L'INSTITUT PASTEUR – REPRODUCTION & DIFFUSION INTERDITE

PAGE 1 SUR 1

1.2 Démarche qualité du CNRVC en 2019

Le CNRVC fait partie des 14 Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ils sont organisés en multi-site et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-site (LREMS).

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

- La synthèse 2019 de la démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) est présentée en Annexe 1, point 1-5, du présent rapport.

- L'année qualité 2019 du CNRVC s'est organisée comme suit :

CNRVC	Périodes de réalisation
Revue qualité	30/04/2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	03/06/2019
Audits internes qualité et technique	Qualité : 21/11/2019 Technique : 03/02/2020
Constitution du dossier de validation « sérogroupage de <i>V. cholerae</i> »	Validation en 2020

- Les perspectives 2020 pour le CNRVC se calqueront sur ce qui est présenté en Annexe 1 pour le LREMS.

- En 2019, le CNR a participé à un contrôle de qualité externe, organisé par le Centre National de référence de Belgique pour *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (CHU de Liège), par l'analyse de 5 souches de *Vibrio*, 3 *V. cholerae* et 2 *V. parahaemolyticus*. Les analyses portaient sur l'identification des espèces, la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 et sérotypes Inaba/Ogawa pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.

- La liste des techniques accréditées du CNRVC est disponible en annexe 2.

2/ Activités d'expertise

Les activités d'expertise présentées ici concernent :

- Les souches de vibrions cholériques isolées de cas importés sur le territoire français, également de cas diagnostiqués en zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, envoyées au CNR pour confirmation de diagnostic et caractérisation. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNR et permet de connaître les souches de vibrions cholériques circulant dans le monde et susceptibles d'être importées en France. Cinq cas de choléra ont été importés en France métropolitaine en 2019, le CNR a par ailleurs étudié 250 échantillons en provenance du continent africain et du Moyen Orient.

- Les souches de vibrions non cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le nombre d'échantillons, souches isolées et prélèvements envoyés au CNR en 2019 (n=91) confirme l'augmentation observée depuis 2017, en lien avec les températures élevées enregistrées cette année et l'évolution des méthodes de diagnostic, PCR multiplex entérique et spectrométrie de masse. La détermination des espèces par les laboratoires d'analyse médicale était concordante pour la quasi-totalité des souches isolées avec les résultats d'identification du CNR, une discordance a été notée pour l'identification *V. cholerae* /*V. mimicus*.

Les techniques disponibles au CNR sont décrites en *Annexe 2*.

2.1 Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2019

- La réalisation des antibiogrammes se fait systématiquement par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations techniques de l'EUCAST 2019 et /ou par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par ETEST® ou en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™ (plaque commerciale EUVSEC), selon les recommandations des référentiels. L'utilisation des microplaques pour la détermination des CMI en milieu liquide est en cours de validation au CNR. L'objectif à terme est d'utiliser ce système et de dessiner des plaques adaptées aux *Vibrio*.
- Le CNR développe une base de données protéomiques (spectrométrie de masse type Maldi-Tof, système Bruker Daltonics) pour l'identification de l'espèce *V. cholerae* (n=408, dont 137 *V. cholerae* O1 et 271 *V. cholerae* non-O1/non-O139, 17 d'entre elles appartenant à des sérogroupes connus) qui n'est pas distinguée de l'espèce *V. albensis* par l'outil Maldi-Tof de Bruker disponible sur la plateforme P2M.
- Le CNR développe une base de données génomiques pour les différentes espèces de *Vibrio*, et a mis en place depuis 2018 le séquençage complet des génomes bactériens (WGS, whole-genome sequencing) sur les souches de vibrions cholériques et non cholériques, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires. La présence des gènes d'intérêt pour le diagnostic et la détection des facteurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* mais l'utilisation de cette technique pour un rendu de résultats aux laboratoires (confirmation de l'espèce, présence des gènes codant pour des facteurs majeurs de pathogénicité) n'est pas réalisable actuellement en raison des délais d'obtention des séquences.

La base de données de séquences pour l'espèce *V. cholerae* est constituée de 967 génomes (dont 709 *V. cholerae* O1 et 258 *V. cholerae* non-O1/non-O139) issus de souches de la collection du CNR. Ces séquences, ainsi que d'autres séquences obtenues lors de travaux en collaboration, nous permettent une analyse phylogénétique des souches de *V. cholerae* O1 reçues au CNR en référence à une base de données de plus de 1400 génomes. Les séquences brutes sont stockées au CNR, les séquences ayant fait l'objet de publications sont rendues publiques.

2.2 Evaluation de techniques et réactifs

- Le CNR teste pour la société BIO-RAD les lots de sérums agglutinants polyvalents destinés au diagnostic de *V. cholerae* O1, sur un panel de 43 souches de référence de différents sérogroupes de l'espèce. Une expertise a été réalisée au CNR en 2019.
- Le CNR valide l'utilisation de la spectrométrie de masse type Maldi-Tof (système Bruker Daltonics) pour l'identification de différentes espèces de *Vibrio*, par l'analyse d'une collection de souches identifiées préalablement par les méthodes biochimiques traditionnelles (souches du Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur et du CNR) ; 199 souches représentatives de 27 espèces de *Vibrio* ont été testées. Les résultats d'identification se sont montrés 100% concordants pour les principales espèces pathogènes, *V. parahaemolyticus* (n=26), *V. alginolyticus* (n=17), *V. fluvialis* (n=6) et *V. vulnificus* (n=16), avec des critères d'identification de confiance élevée (scores > 2,1).

A noter cependant les difficultés d'identification de l'espèce *V. cholerae* (n=75), identifiée *V. albensis* par ce système, justifiant le développement d'une base de données spécifique.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNR est régulièrement sollicité par les laboratoires de biologie médicale pour des demandes de méthodes d'isolement et d'étude (par des méthodes de bactériologie classique et moléculaires) des différentes espèces de *Vibrio*.

- Le CNR a transféré en 2019 à 11 laboratoires français correspondant un protocole de recherche bactériologique des espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* à partir de prélèvements de selles, éventuellement sans utiliser les milieux d'enrichissement et d'isolement spécifiques aux *Vibrio*, que la plupart des laboratoires n'ont pas. Trois laboratoires français ont également reçu les techniques d'identification d'un vibriion cholérique à partir d'un prélèvement de selles.
- Le CNR a transféré en 2019 à des microbiologistes de 3 Instituts Pasteur du Réseau international des Instituts Pasteur (RIIP), Cameroun, Côte d'Ivoire et Maroc, les protocoles de recherche des vibrions cholériques et non cholériques à partir d'un prélèvement et les modalités d'identification et de caractérisation de ces vibrions par des techniques phénotypiques et génotypiques (PCR).
- Le CNR a transféré au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) de Yaoundé, Cameroun, ses protocoles de recherche et caractérisation par PCR du vibriion cholérique à partir d'échantillons de selles sur papiers filtres secs.

2.4 Collections de matériel biologique

- L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont présentées en *Annexe 1*.
- Toutes les souches de *Vibrio* confirmées au CNR chaque année sont conservées selon les modalités décrites dans cette annexe.
- Le CNR a donné des amorces nucléotidiques permettant de réaliser les PCR d'identification d'un vibriion cholérique, ainsi que des ADN témoins, aux Instituts Pasteur du Cameroun, Côte d'Ivoire et Maroc, et au LNSP de Yaoundé.
- Le CNR a envoyé 3 souches de *V. cholerae* O1 au National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, India.

2.5 Activités d'expertise de l'année 2019

- Le CNR étudie des souches isolées sur le territoire français, éventuellement des prélèvements en fonction du contexte et après accord préalable des responsables du CNR. Les prélèvements sont des échantillons de selles ou des fecal-swabs, parfois des sérums.
- Les échantillons étudiés en provenance de l'étranger peuvent être des souches isolées, envoyées pour confirmation d'identification et caractérisation, ou des prélèvements, adressés par des microbiologistes étrangers, par l'OMS et par des organisations humanitaires.

2.5.1 Echantillons étudiés

Durant l'année 2019, **366** échantillons, en provenance de France ou de l'étranger, ont été réceptionnés au CNR, dans le cadre d'activités d'expertise et/ou de travaux en collaboration. Les prélèvements (échantillons de selles) n'ont été envoyés que par des correspondants français, tous les échantillons reçus de l'étranger en 2019 étaient des souches isolées.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons reçus au CNR en 2019

Origine	Clinique		CQE	Total
	P	S	S	
France	18	73	-	91
Etranger	-	270	5	275
Total			5	366

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

Tableau 2 : Provenance et type des échantillons français d'origine clinique

Origine géographique	Expéditeur	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM/Plateaux techniques	16	55	71
	CHU/CH	2	16	18
Territoires OM	CH	-	2	2
Total		18	73	91

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CH : centres hospitaliers

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

Origine	Nbre d'échantillons reçus au CNR		Nbre de souches de vibrions isolées		Total souches isolées
	P	S	P	S	
France	18	73	7	71	78
Etranger	-	275	-	172	172
Total	18	348	7	243	250

Tableau 4 : Provenance des échantillons étrangers d'origine clinique

Pays	Expéditeur	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons
Niger	CERMES	39	Souches isolées
Yémen	CPHL Sanaa	120	Souches isolées
RCA	IP de Bangui	5	Souches isolées
Cameroun	CPC	57	Souches isolées
Somalie	NPHRL, Somalie, via NPHL, Kenya	10	Souches isolées
Bénin	Ministère de la Santé	19	Souches isolées
Liban	Université de Tripoli	1	Souche isolée
	Total	251	

CPHL: Central Public Health Laboratory; NPHRL : National Public Health Reference Laboratory; NPHL : National Public Health Laboratory

Autres échantillons étudiés

Tableau 5 : Echantillons étudiés pour des travaux de recherche

Source	Souches étudiées	Nombre
République tchèque, National Institute of Public Health	<i>V. cholerae</i> O1	4
Canada	<i>V. cholerae</i> O1	15
Total		19

La répartition par espèce de toutes les souches isolées et confirmées *Vibrio* en 2019, d'origine françaises ou étrangères, est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Souches de *Vibrio* étudiées au CNR en 2019. Distribution par espèce en fonction de l'origine écologique et géographique des prélèvements.

Origine écologique Espèce identifiée	Homme			Total / espèce
	France		Étranger	
	Métropole	France d'outre-mer		
<i>V. cholerae</i> O1	5		162	167
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	24	1	8	33
<i>V. parahaemolyticus</i>	38		2	40
<i>V. alginolyticus</i>	2			2
<i>V. vulnificus</i>	2	1		3
<i>V. fluvialis</i>	5			5
Total	76	2	172	250

Incluant les 5 souches du contrôle qualité de Liège.

Délais moyen de rendus de résultats

Le délai moyen de rendu de résultats du CNR aux laboratoires, incluant l'identification de l'espèce et la mise en évidence de gènes de pathogénicité, était de 4 jours ouvrés à partir de la date de réception d'une souche, conformes à l'objectif des 6 jours annoncés par le CNR sur son site internet. Les résultats rendus hors délais concernaient deux souches de *V. fluvialis* dont l'identification était liée au séquençage de produits PCR.

L'analyse des prélèvements ne faisant pas partie des missions du CNR, il n'y a pas d'engagement sur les délais de rendu de résultats. Le délai moyen de rendu était cependant identique à ce qui a été obtenu pour les souches isolées.

2.5.2 Niveau de caractérisation réalisé

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

• Analyses réalisées sur les souches isolées en France

Espèce (Nbre)	Id. bio	Id moléculaire	16S /rpoB et séquençage	Agglutination	PCR gènes pathogénicité	PCR clones pandémiques	Seq. gènes pathogénicité	ATB	Identification MALDI-TOF	WGS*
<i>V. parahaemolyticus</i> (38)	38	38	-	4	38	4	<i>tdh</i> (19) <i>trh</i> (28)	29	26	38
<i>V. cholerae</i> (31)	31	31	-	31	31	-	<i>ctxB</i> (5) <i>tcpA</i> (5) <i>rstR</i> (5)	31	31	31
<i>V. alginolyticus</i> (2)	2	2	-	-	-	-	-	2	2	-
<i>V. fluvialis</i> (5)	5	-	5	-	-	-	-	5	5	-
<i>V. vulnificus</i> (3)	3	3	-	-	-	-	-	3	3	-

Analyses réalisées sur les souches isolées à l'étranger

Espèces (Nbre)	Id. bio	Id moléculaire	Agglutination	PCR gènes pathogénicité et séquençage	ATB	Amplification et séquençage gènes R <i>gyrA/parC</i>	WGS
<i>V. cholerae</i> O1 (162)	162	162	162	<i>ctxB</i> (162) <i>tcpA</i> (162) <i>rstR</i> (162)	140	Recherche in silico par alignement de séquences à partir des données génomiques	150

- Identification biochimique : méthodes de bactériologie classique, caractères morphologiques, biochimiques et culturels
- Identification moléculaire : PCR spécifiques d'espèces, ou gènes *rrs* / *rpoB* et séquençage des produits amplifiés
- Agglutination : détermination du sérotype (O1 ou O139)/sérotype (Inaba, Ogawa) par agglutination pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées, recherche des clones pandémiques par détermination des antigènes somatiques et capsulaires pour *V. parahaemolyticus*.
- PCR gènes pathogénicité : recherche des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs pour les souches des espèces *V. cholerae* (gènes *ctxA* et *ctxB*, *tcpA*, *rstR*, *st*, *hlyA*) et *V. parahaemolyticus/V. alginolyticus* (gènes *tdh* et *trh*) par PCR.
- PCR clones pandémiques : Mise en évidence des gènes associés au potentiel pandémique des souches de *V. parahaemolyticus tdh+* (*orf8*, *toxRS*).
- Séquençage des produits d'amplification des gènes *tcpA*, *rstR* et *ctxB* pour toutes les souches de vibrions cholériques, séquençage des produits d'amplification des gènes *tdh* et *trh* pour les souches de *V. parahaemolyticus* et caractérisation des allèles.
- Réalisation d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé et Sensititre
- Amplification et séquençage des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* pour les souches de *V. cholerae* présentant une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones.

2.6 Activités de séquençage

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

Le séquençage n'est pas utilisé en première ligne au CNR comme outil d'identification ou de génotypage pour le suivi des souches isolées sur le territoire français à des fins de surveillance. Il est utilisé systématiquement comme outil de suivi des souches de vibriens cholériques, permettant de comprendre leur circulation et d'identifier de nouvelles sous-lignées.

Le CNR séquence systématiquement les souches des espèces *V. cholerae* (O1 et non-O1/non-O139) et *V. parahaemolyticus* associées aux cas cliniques en France. Le CNR a séquencé 31 souches de *V. cholerae* et 38 souches de *V. parahaemolyticus* étudiées en 2019, ainsi que 161 souches de *V. cholerae* O1 reçues de l'étranger (161). Des souches de *V. cholerae* O1 sont également séquencées dans le cadre de projets de recherche menés au CNR ou dans l'unité.

3/ Activités de surveillance

- **Cinq cas de choléra importés** ont été déclarés sur le territoire français en 2019. Tous ces cas étaient importés d'Asie du Sud (Inde et Bangladesh).

- **69 cas cliniques d'infections à VNC** ont été confirmés au CNR en 2019, se manifestant majoritairement par des gastroentérites. Un lien avec le milieu marin a été établi dans 72% des cas, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer. Pour la première fois depuis la mise en place de la surveillance des cas d'infections à VNC en France, la grande majorité des cas d'infections étaient liée à l'espèce *V. parahaemolyticus*. **Deux décès** ont été associés à des cas d'infections à *V. cholerae*, l'un associé à un cas de gastroentérite chez un patient âgé, le second à une septicémie primaire et choc septique chez un patient immunodéprimé, sans exposition retrouvée dans aucun des deux cas. Quatre cas de gastroentérites à *V. fluvialis* ont été diagnostiqués, cette espèce a également été isolée d'une suppuration, confirmant l'émergence de ce pathogène.

3.1. *Vibrien cholérique*

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

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

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

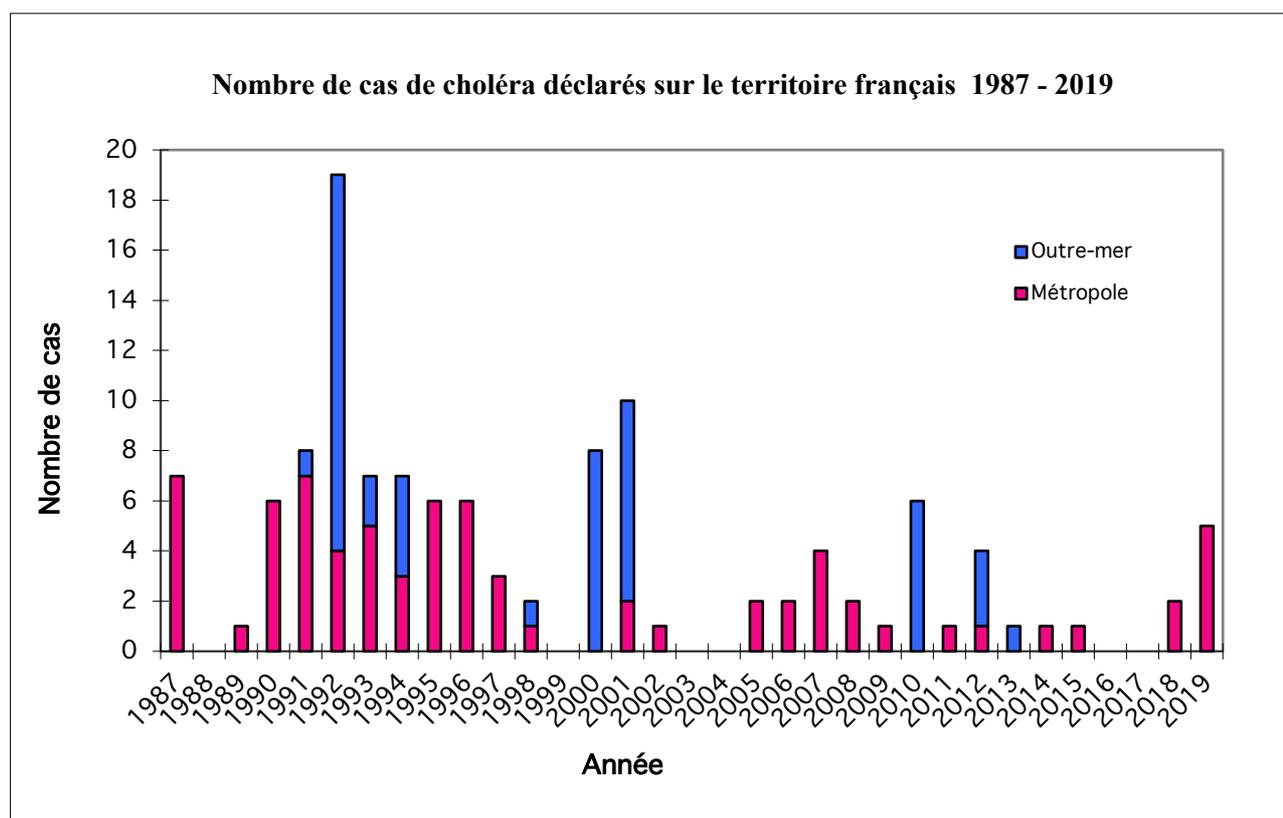
- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

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

3.1.2 Evolution et caractéristiques des infections

Cinq cas de choléra ont été diagnostiqués en 2019 en métropole, quatre en milieu hospitalier, un par un laboratoire de ville.

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



- *Origines géographiques des lieux de contamination* : les cas importés en France de 2005 à 2019 proviennent essentiellement **d'Asie, à l'exception de la période 2010-2013 où la région des Amériques (Caraïbes)**, qui avait émergé comme origine géographique de contamination depuis la

flambée épidémique majeure débutée en Haïti et en République Dominicaine fin octobre 2010, a été majoritairement à l'origine des cas (*Tableau 7*). Aucun cas n'a été importé d'Afrique durant cette période.

Tableau 7 : Cas de choléra importés sur le territoire français de 2005 à 2019 par lieu de contamination

Année	Afrique	Maghreb	Amérique	Asie	Total
2005				2	2
2006				2	2
2007				4	4
2008		1*		1	2
2009				1	1
2010			6		6
2011				1	1
2012			4		4
2013			1		1
2014				1	1
2015				1	1
2018				2*	2
2019				5	5
Total	0	1	11	20	32

* 2 cas associés à une souche non toxigène, déclarés comme cas de choléra sur la base du tableau clinique.

- Caractéristiques des cas importés en 2019

- Les cas ont été importés en métropole, au retour de voyages en zone d'endémie et/ou épidémie cholérique dans des pays d'Asie (Inde, Bangladesh).
- La transmission de l'infection a été associée à la consommation d'aliments ou d'eaux contaminés.
- Aucun des patients ne présentait de facteur de risque. Il s'agissait de 3 femmes et 4 hommes, âgés de 27 à 57 ans.
- Tous les cas étaient symptomatiques, présentant des syndromes digestifs typiques évocateurs de cas de choléra.
- Quatre cas ont nécessité une hospitalisation, avec passage en réanimation pour l'un d'entre eux. Pour 2 cas pour lesquels l'information est documentée, la durée d'hospitalisation a été de 5 et 6 jours. Les cas ont été traités par antibiothérapie (ciprofloxacine, doxycycline, céphalosporine de 3^{ème} génération), associé à une réhydratation intra-veineuse pour un cas.
- Il n'y a pas eu d'autre cas confirmés parmi les co-exposés, certains ayant cependant présenté des symptômes compatibles mais n'ayant pas été testés. Aucun cas secondaire n'a été détecté dans l'entourage.

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

- Caractéristiques des agents pathogènes

- Tous les cas importés en 2019 étaient dus à *V. cholerae* du séro groupe O1. Aucun cas d'infection à *V. cholerae* O139 n'a jamais été rapporté sur le territoire français.

- Les cinq souches étaient toxigènes, portant les gènes *ctxA* et *ctxB* codant pour les deux sous-unités de la toxine cholérique. Les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches isolées en France depuis 2006, majoritairement importées d'Inde, sont présentées dans le *Tableau 8*.

- *Résistance aux anti-infectieux.*

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

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

Les méthodes utilisées pour la surveillance de la résistance aux anti-infectieux sont présentées en *Annexe 2* de ce rapport, *capacités techniques du CNR*.

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.

L'azithromycine a été recommandée depuis l'arrivée du choléra en Haïti en 2010, à la fois du fait de son efficacité et de sa simplicité d'utilisation par rapport à l'érythromycine (administration en une seule prise) ; 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 en situation d'urgence afin d'éviter l'introduction du choléra dans des zones non-endémiques. Des souches circulant en Afrique présentant un phénotype de résistance aux macrolides ont été détectées en 2018 et 2019, également au Yémen en 2019.

- Les profils phénotypiques d'antibiorésistance des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes d'origine étrangère isolées en 2019 sont présentées dans le *Tableau 9*.

Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes 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 Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2006/02	Inde	C Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/01	Inde	AM C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/02	Inde	Am C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/03	Inde	Am Cs Ft Nal O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2007/04	Inde	C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2008/01	Inde	Am Cs Ft Nal Su Sxt Te O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2009/01	Pakistan	C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2010/01	Haïti	Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2011/01	Bangladesh	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB1	-	+	+
2012/01	Rep Dom	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/02	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/03	St Martin	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2012/04	Rep Dom	Cs Ft Nal PB O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2013/01	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2014/01	Inde	C Cs Ft Nal PB Sm Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2015/01	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2018/02	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2019/01	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2019/02	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2019/03	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2019/04	Inde	Ft Nal O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	ctxB7	+	+	+
2019/05	Bangladesh	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.38	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 + triméthoprimine ; *Te*, tétracyclines ; *O129* : agent vibriostatique, dont la résistance est un marqueur de la résistance au triméthoprimine.

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

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

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

↪ Toutes les souches importées en 2019 étaient des variants du biotype ElTor, associées à la séquence *ctxB7* de la sous-unité B de la toxine cholérique, différant par 3 mutations de la séquence *ctxB3* initialement associée aux souches prototypes de ce biotype. Ces variants correspondent à la vague 3 actuelle, ils ont été associés en particulier à l'épidémie d'Haïti en 2010, et à l'épidémie du Yémen en 2016-2017. Depuis 2015, les souches importées d'Inde appartiennent à la sous-lignée T13, décrite lors de l'étude du choléra au Yémen en 2016-2017.

↪ Toutes les souches importées depuis 2006 sont multi-résistantes aux antibiotiques, présentant une résistance à l'acide nalidixique (CMI >256 mg/L) et une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (CMI 0,25 à 0,5 pour la ciprofloxacine), qui peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques.

Tableau 9 : Résistance aux antibactériens des souches de vibrions cholériques isolées à l'étranger étudiées en 2019

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	CTX	S	O129
<i>V. cholerae</i> O1 (n=140)	11	11(1)	1	10	0	10	10	131 (8)	118	117	139	DS* 140	9(1)	10	10 (3)	138

Antibiotiques testés et abréviations utilisées : AM, ampicilline ; AZM, azithromycine ; C, chloramphénicol ; CIP, ciprofloxacine ; CF, cephalotine ; Cs Colistine ; E, Erythromycine ; FT, nitrofuranes ; NA, acide nalidixique ; PB, polymyxine B ; S, streptomycine. SSS, sulfamides ; SXT, Sulfaméthoxazole + triméthoprimine ; TE, tétracycline. O129 : agent vibriostatique, dont la résistance est un marqueur de la résistance au triméthoprimine. () : intermédiaire

*Decreased susceptibility

→ Une multi résistance des souches de vibrions cholériques aux antibiotiques est rapportée dans toutes les régions du monde, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra (doxycycline, érythromycine, ciprofloxacine) ont été observées ces dernières années.

→ Toutes les souches de *V. cholerae* O1 toxinogènes testées étaient résistantes à l'acide nalidixique par évaluation quantitative par la mesure de la CMI par Etest® (CMI NA), avec des valeurs > 256 mg/L. Les souches étaient de sensibilité diminuée à la ciprofloxacine avec des CMI par Etest® (CMI CI) de 0,25 à 0,5 mg/L.

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

→ La résistance aux polymyxines est un marqueur phénotypique d'appartenance des souches de vibrions cholérique au biotype ElTor, agent de la septième pandémie, alors que les souches du biotype classique, associées aux pandémies antérieures, y sont sensibles. Depuis 2017, des souches du biotype ElTor sensibles aux polymyxines ont été décrites, ayant émergé en Inde. Les souches importées du sous-continent indien en France depuis 2015 présentent cette caractéristique phénotypique, des études de séquençage et des analyses phylogénétiques ont confirmé l'origine indienne de ces souches et leur appartenance à une même lignée, ce qui confirme l'intérêt de l'utilisation des profils de résistance comme marqueur épidémiologique.

→ Des souches multi-résistantes aux antibiotiques, tétracyclines et érythromycine, ont été mises en évidence en 2019 au Yémen. Les souches isolées depuis le début de l'épidémie au Yémen en 2016 étaient jusque-là particulièrement sensibles aux antibiotiques, l'origine plasmidique de leur résistance est en cours d'étude.

3.1.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

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

traçage des cas, en collaboration avec les équipes de cliniciens, éventuellement du CNR, et l'appui de Santé publique France et des Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire) si nécessaire.

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

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

- Toute identification par le CNR d'une souche de vibron cholérique isolée sur le territoire français peut entraîner une déclaration internationale à l'OMS, en application du règlement sanitaire international de 2005.

- Le CNR collabore avec l'OMS (Division of Emerging and other Communicable Diseases Surveillance and Control ; Global Task Force on Cholera Control), les Instituts du Réseau International des Instituts Pasteur et Instituts associés, d'autres laboratoires situés à l'étranger, ainsi qu'avec des organisations humanitaires non gouvernementales, MSF en particulier. Le CNR est sollicité pour confirmer l'identification du vibron cholérique à partir de prélèvements ou de souches isolées, communiquer l'antibiogramme des souches isolées, diffuser les méthodes de typage moléculaire des souches, recevoir et former des stagiaires de différents pays à l'identification et au typage des souches de vibron cholériques et non cholériques.

- Le CNR a participé au réseau Africhol, dans le cadre d'un projet de surveillance du choléra en Afrique sub-saharienne, avec un consortium comportant des organisations internationales, WHO, US CDC et CDC Foundation, EPIVAC Network, West African Health Organization (WAHO), l'Organisation de Coopération 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 depuis 2014 ses interactions avec l'OMS sur la thématique cholera en devenant membre à titre institutionnel de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC). Les priorités d'action définies par la GTFCC concernent la surveillance (laboratoire et épidémiologique), la vaccination, l'assainissement et l'administration des soins de santé, cinq groupes de travail thématiques ont été mis en place, dont un groupe dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Le CNR est présent au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, dans laquelle son responsable s'implique en particulier par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire" (Lab Working Group) qui réunit différents acteurs internationaux de la lutte contre le choléra, provenant de diverses institutions.

- Plusieurs notes et directives techniques ont été publiées en 2016 et 2017 par le groupe de travail surveillance sur le site de la GTFCC :

- The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests, Novembre 2016,

- http://www.who.int/cholera/task_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1

- Interim Guidance Document on Cholera Surveillance, Juin 2017

- http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf?ua=1

- Introduction of DNA based identification and typing methods to public health practitioners for epidemiological investigation of cholera outbreaks, Juin 2017,

https://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Laboratory-support-public-health-surveillance.pdf?ua=1

- Use of antibiotics for the treatment and control of cholera, Mai 2018,

https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1

- En octobre 2017, 35 partenaires de la GTFCC, dont l'Institut Pasteur, ont signé un engagement sans précédent dans la lutte contre le choléra passant par la mise en œuvre d'une feuille de route mondiale ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030.

3.1.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNR a été sollicité comme laboratoire de première intention pour le diagnostic microbiologique du choléra à partir de prélèvements de selles par 5 laboratoires correspondants en 2019.

- Trois échantillons positifs en PCR syndromique multiplex se sont révélés négatifs pour l'espèce *Vibrio* après étude par les techniques classiques d'enrichissements/isolements et par PCR directes sur échantillons biologiques et enrichissements. Les patients présentaient des symptômes compatibles mais les données épidémiologiques, en particulier les pays d'exposition (retour d'Iran, du Maroc, pas de notion de voyage identifiée) n'étaient pas en faveur d'un diagnostic de choléra. Ces cas avaient fait l'objet de déclarations de suspicion de choléra aux ARS par les biologistes ou les médecins concernés.
- Deux cas de choléra importés ont été confirmés au CNR, qui a isolé deux souches de *V. cholerae* O1 (selles et Fecal Swab) chez deux patients de retour d'Inde et du Bangladesh.

3.2 Vibrions non cholériques

3.2.1 Réseau des partenaires

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

Le recensement des cas se fait sur la base des déclarations volontaires de la part des biologistes après l'isolement des souches par les laboratoires d'établissements publics ou privés de santé.

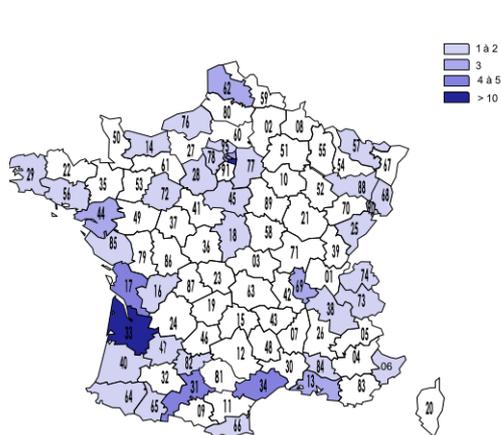
Le CNR avait activement sollicité les biologistes en 2011 en réalisant une campagne d'information et sensibilisation par le biais d'un contrôle qualité réalisé sur l'ensemble de la France auprès de 3281 laboratoires participants, et avait à cette occasion incité les laboratoires à envoyer leurs souches au CNR sur la base du volontariat.

Les souches sont envoyées au CNR par des microbiologistes de laboratoires hospitaliers, en lien avec les cas graves, hospitalisés, d'infections à vibrions non cholériques, mais également par des microbiologistes de LBM, regroupés en plateformes de biologie médicale. L'évolution récente des méthodes de diagnostic participe également grandement à la connaissance des *Vibrio* par le monde médical et à l'augmentation du nombre de souches ou échantillons biologiques envoyés par des laboratoires de ville.

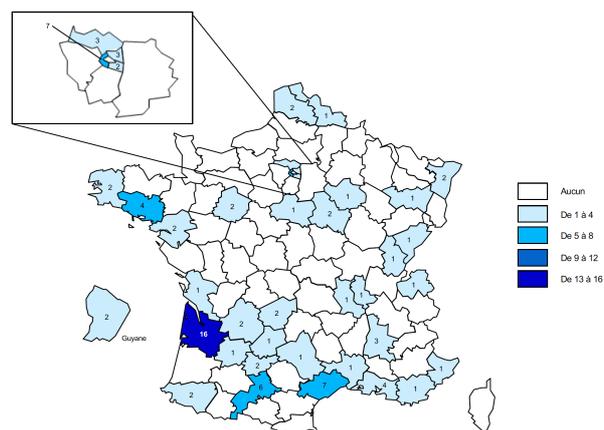
- *Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau*

Une analyse des cas détectés sur le territoire français entre 1995 et 2017 a mis en évidence une dispersion des cas et des laboratoires correspondants du CNR, avec cependant un tropisme pour les zones côtières et la région Nouvelle Aquitaine, sur les côtes Atlantiques. Ceci s'est également vérifié en 2018 et 2019.

Le CNR collabore de façon durable avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire, dont la localisation géographique est restée relativement constante depuis 1995.



Distribution géographique des laboratoires correspondants entre 2016 et 2018



Distribution géographique des laboratoires correspondants en 2019 associés au nombre d'échantillons

Entre 2016 et 2018, 87 correspondants ont été identifiés ; en 2019, le CNR a identifié 22 nouveaux correspondants, et a échangé avec 16 centres hospitaliers et 29 LBM, répartis dans 39 départements dont 10 départements côtiers. Le nombre de cas est resté plus élevé sur les côtes Atlantiques. A noter que les souches isolées dans le département de la Gironde, qui rapporte au CNR le plus grand nombre de cas, sont envoyées par un seul laboratoire de biologie multi-sites correspondant.

L'évolution des techniques de diagnostic mises à disposition aujourd'hui, en particulier les PCR multiplex syndromique et la spectrométrie de masse, permettent d'identifier plus facilement les *Vibrio* que les méthodes de bactériologie traditionnelles et d'améliorer ainsi l'exhaustivité du recueil de ces infections, en particulier par une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés. Ces techniques présentent également l'avantage d'attirer l'attention des biologistes sur ces agents pathogènes, et le CNR est régulièrement contacté par des professionnels de santé, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR. Ceci représente une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance.

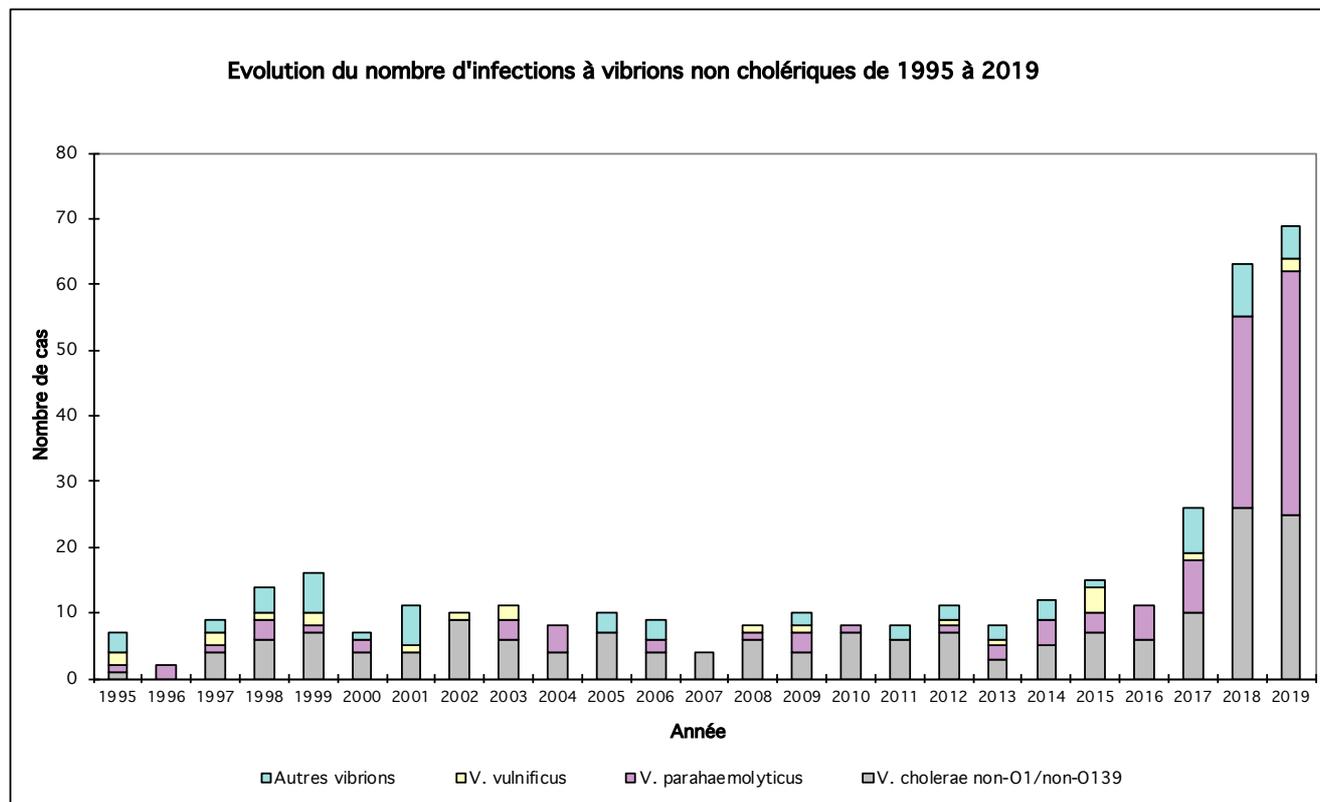
- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

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. Les cas pour lesquels

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

3.2.2 Évolution et caractéristiques des infections

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



On note une persistance de l'augmentation du nombre de cas en 2019, avec 69 cas cliniques documentés, ce qui confirme l'augmentation significative amorcée en 2017 par rapport à la moyenne de 10 cas cliniques annuels rapportés entre 1995 et 2016.

- Caractéristiques des cas importés en 2019

- L'âge médian des cas d'infection était de 55 ans, avec des extrêmes de 12 et 100 ans. Les cas étaient majoritairement des hommes (58%).
- **4 espèces** de *Vibrio*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. fluvialis* ont été à l'origine des 69 cas cliniques diagnostiqués en 2019. **Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont restées les espèces prépondérantes**, avec proportionnellement une nette progression du nombre de cas d'infections rapportées à *V. parahaemolyticus*. **L'émergence de l'espèce *V. fluvialis*** se confirme, probablement liée à sa bonne identification par les laboratoires, associée à l'évolution des techniques de diagnostic (spectrométrie de masse).
- **Les manifestations cliniques étaient majoritairement des gastroentérites**, représentant 91% des cas ; 57% d'entre eux étant associés à l'espèce *V. parahaemolyticus*, 37% à l'espèce *V. cholerae*, 6% à l'espèce *V. fluvialis*.

- **Six cas ont présenté des formes septiques**, 4 à *V. cholerae* et 2 à *V. vulnificus*, bactériémies faisant suite à une primo-infection (gastroentérite ou surinfections de plaies) ou septicémies primaires. Tous les patients présentaient des terrains prédisposants. Un cas de septicémie primaire à *V. cholerae* a entraîné 1 décès. Trois cas de suppurations diverses, 1 à *V. parahaemolyticus*, 1 à *V. vulnificus* et 1 à *V. fluvialis*, associés à un contact direct avec le milieu marin, ont également été rapportés.
- 19% des cas pour lesquels l'information était disponible (63/69) ont été hospitalisés, parmi eux 90% présentaient un terrain prédisposant, diabète, immunosuppression, traitement anti-acide, antécédents de pathologies digestives. Des terrains prédisposants ont été mis en évidence chez des personnes non hospitalisées (11 cas sur 43 documentés), immunodépression, alcoolisme, antécédents de pathologies digestives. *A noter un nombre croissant d'informations non renseignées à la fois sur les antécédents et l'exposition possible des patients, du fait du nombre croissant d'examens réalisés en LBM, n'ayant pas la notion d'infection à Vibrio à priori et la possibilité d'interroger le patient à posteriori.*
- Plus de 97% des cas d'infection à *V. parahaemolyticus* était des gastroentérites liées à la consommation de produits de la mer. Un cas d'infection a fait suite à un contact direct avec le milieu marin (suppuration). A noter la diminution du nombre de cas hospitalisés, qui était en moyenne de 40% entre 1995 et 2017, et de 7% pour les années 2018 et 2019.
- Les cas d'évolution les plus défavorables ont été liés à l'espèce *V. cholerae*, qui a été associée à deux décès. L'un a fait suite à une gastroentérite chez un patient ne présentant pas d'autre facteur de risque que son âge (95 ans), le second à une septicémie primaire et choc septique chez un patient immunodéprimé. Aucune exposition n'a été retrouvée dans ces deux cas.
- Distribution géographique des cas :
 - le nombre de cas d'infections contractés à l'étranger (20) ou hors métropole (2) est resté sensiblement identique à ce qui a été observé en 2018 (29% des cas en 2019, 30% en 2018), avec cependant une répartition des pays d'importation beaucoup plus large que les années précédentes : Asie, Maghreb, Amérique du Sud, Caraïbes, Afrique, Moyen-Orient. Les cas importés se sont manifestés par des gastroentérites à l'exception d'un cas (otite externe), la consommation de produits de la mer ou un contact avec le milieu marin ont été documentés dans 73% des cas.
 - Les cas autochtones se sont distribués sur une large partie du territoire, avec une plus grande fréquence sur la côte atlantique, ce qui est observé de façon récurrente depuis 1995.
- Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.
- La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année (juin à septembre).

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

Tableau 10 - Distribution des espèces de *Vibrio non cholériques* isolées chez l'homme sur le territoire français en 2019 rapportées au CNR - Syndromes associés et contexte clinique et épidémiologique des infections

Espèce	Nombre de souches reçues au CNR	Formes cliniques (nbre de cas)	Hospitalisation (nbre de cas)	Terrain prédisposant (nbre de cas)	Décès (nbre)	Contexte ou source de contamination
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	25	Gastroentérite (20)	oui (4)	oui (3)	1	Conso. produits de la mer (5), contact milieu marin (1), NR (1), ND (3) Voyage Etranger (9) dont conso. pdts de la mer (2), crudités (3), NR(4)
		Gastroentérite + septicémie (3)	oui (3)	oui (3)	0	Conso. produits de la mer (2), ND (1)
		Septicémie (1)	oui (1)	oui (1)	1	ND (1)
		Péritonite appendiculaire (1)	oui (1)	oui (1)	0	ND (1)
<i>V. parahaemolyticus</i>	37	Gastroentérite (36)	oui (1)	oui (6)	0	Voyage à l'étranger (8) dont conso. produits de la mer (4) Consommation produits de la mer en France (25), NR (2)
		Suppuration (1)	non	non	0	Contact avec le milieu marin (1)
<i>V. fluvialis</i>	5	Gastroentérite (4)	non	oui (2)	0	Consommation de produits de la mer (4) (deux voyages à l'étranger)
		Otite externe (1)	non		0	Voyage à l'étranger et contact avec le milieu marin (1)
<i>V. vulnificus</i>	2	Septicémie (1)	oui	oui	?	Contact avec le milieu marin (territoires d'Outre-Mer) (1)
		Infection cutanée, septicémie (1)	oui	oui	0	Contact avec le milieu marin (1)
Total de cas	69				2	

NR : Non Renseigné (pas d'information transmise)

ND : Non Documenté (pas d'exposition compatible mise en évidence)

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

Caractérisation des souches analysées en 2019

Echantillons d'origine clinique isolés sur le territoire français

- ➔ Aucune des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origine clinique ne possédait les gènes de la toxine cholérique, ni les gènes du récepteur du phage CTX ϕ . Deux souches possédaient le gène *stn*, codant pour une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*. Toutes possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la grande majorité des souches cliniques, quels que soient les syndromes associés, et chez les souches environnementales.
- ➔ 32 souches de *V. parahaemolyticus* responsables de gastroentérites, soit 89%, possédaient les gènes des hémolysines TDH et/ou TRH associées au pouvoir pathogène de l'espèce. Quatre souches appartenaient au clone pandémique O3:K6, caractérisé par la présence des gènes codant l'hémolysine TDH et les gènes *orf8* et *toxRS*. Ces quatre souches étaient importées respectivement de Turquie, Colombie, Côte d'Ivoire et Cambodge.

A noter que 4 souches à l'origine de diarrhées aiguës ne possédaient pas les gènes des hémolysines TDH et TRH.

Sensibilité aux anti infectieux

La méthodologie et les critères d'interprétation sont détaillés en *Annexe-2* de ce document

Tableau 11 : Résistance aux antibactériens des souches de VNC isolées en France - 2019

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=25)	10	4	-	2	3	1(1)	(1)	1	19	21	5(1)	2(2)	-	4(1)	6
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=37)	3(9)	-	-	10	-	(2)	-	-	27	26	-	(3)	-	2(5)	3
<i>V. vulnificus</i> (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i> (n=5)	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3(1)	-	3

Antibiotiques testés et abréviations utilisées : AM, ampicilline ; AZM, azithromycine ; C, chloramphénicol ; CIP, ciprofloxacine ; CF, céphalotine ; CS, colistine ; E, Erythromycine ; FT, nitrofuranes ; NA, acide nalidixique ; PB, polymyxine B ; S, streptomycine, SSS, sulfamides ; SXT, Sulfaméthoxazole + triméthoprime ; TE, tétracycline. O129 : agent vibriostatique, dont la résistance est un marqueur de la résistance au triméthoprime.

() : intermédiaire

Les souches de VNC isolées en France restent globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés. Les souches appartenant au clone pandémique O3:K6, originaires de pays hors Union Européenne, ne se sont pas montrées plus résistantes aux antibiotiques testés que les souches associées aux cas autochtones.

Le CNR poursuit la détermination phénotypique de la résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé et en parallèle par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide par la technique semi-automatisée sur microplaques Sensititre. Des

discordances ont été observées essentiellement avec les polymyxines, la détermination des CMI permettant d'identifier un plus grand nombre de souches résistantes.

La résistance des souches de *V. parahaemolyticus* à l'ampicilline classiquement décrite pour cette espèce a été observée pour 28% des souches quelle que soit la méthode utilisée (diffusion en gélose versus Sensititre).

3.2.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

• Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à vibrions non cholériques. Il est demandé à tout biologiste envoyant un échantillon au CNR de remplir une fiche détaillée de recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques sur l'exposition du patient, concernant notamment l'existence d'un terrain prédisposant et la notion ou non de contact avec la mer ou l'ingestion de produits de la mer. Cette fiche d'accompagnement de souches, remaniée en 2019, est accessible en ligne sur le site internet du CNR, <https://www.pasteur.fr/fr/file/3052/download>. Cette procédure permet au CNR de suivre l'évolution du nombre et des formes cliniques des infections provoquées par des vibrions autres que le vibron cholérique, et des facteurs de risque qui peuvent leur être associés. Tout événement inhabituel, tel qu'augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques, isolement d'un nouvel agent ou modification des voies de contamination, est immédiatement signalé à Santé publique France, Direction des maladies infectieuses. De même tout signalement d'un cas suspect fait par un biologiste aux Agences Régionales de Santé (ARS) fait immédiatement l'objet d'échanges entre le CNR et Santé publique France. Les données du CNR concernant les infections à vibrions non cholériques sont régulièrement communiquées à Santé publique France, par le biais du rapport annuel d'activité, ou sur demande à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

3.2.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Le CNR avait participé en 2018 à une enquête de surveillance microbiologique, envoyée par le CNR des *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, visant à évaluer le processus national de surveillance microbiologique avec l'arrivée récente des kits PCR multiplex pour les pathogènes entériques. Sur les 172 laboratoires ayant répondu, 29 utilisaient un panel PCR multiplex entérique incluant *Vibrio*, 6 en milieu hospitalier et 23 en LBM. Les laboratoires ayant répondu à l'enquête n'étant pas représentatifs des correspondants du CNRVC (seuls 15 d'entre eux avaient participé à l'enquête), le CNR avait mené en parallèle en 2018 une enquête sur les méthodes de diagnostic des *Vibrio* auprès de ses propres laboratoires correspondants depuis 2016. Sur les 87 laboratoires identifiés, répartis en 40 CH et 47 LBM, seuls 7 n'utilisaient ni la spectrométrie de masse ni la PCR multiplex syndromique, les autres laboratoires utilisant au moins l'un des deux systèmes. Parmi les 22 nouveaux correspondants identifiés en 2019, 17 étaient équipés de systèmes de PCR multiplex syndromiques et/ou de spectrométrie de masse.

- Le CNR et Santé Publique France ont poursuivi l'analyse des données de surveillance cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des cas d'infections à VNC confirmés depuis 1995 en France à partir des données collectées par le CNRVC. Cette étude, initialement menée sur la période 1995-2016, avait été prolongée sur 2017. Il a été décidé collégialement d'intégrer également les données 2018 et 2019, afin de refléter l'évolution majeure de la courbe épidémiologique.

- Le CNR apporte un soutien aux laboratoires utilisant la PCR syndromique, par l'étude, dans certains contextes spécifiques et après accord avec le laboratoire correspondant, d'échantillons de selles pour lesquels est observé un signal PCR positif. Sur 34 échantillons testés en 2017 et 2018, 30% avaient été positifs en culture. En 2019, 13 échantillons de selles ont été testés par le CNR pour recherche de VNC. Cinq (38%) ont été positifs par culture, 4 souches de *V. parahaemolyticus* et 1 souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ont été isolées.

4/ Alerte :

4.1. Procédure d'alerte

- Le choléra est une maladie à déclaration obligatoire en France. Cette déclaration doit permettre au médecin inspecteur de santé publique de réagir rapidement pour mettre en place les mesures de prévention individuelle et collective autour des cas, et de déclencher des investigations pour identifier l'origine de la contamination et agir pour la réduire. Ces investigations peuvent impliquer les Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire), Santé publique France et le CNR.
- Les médecins et les biologistes qui suspectent un diagnostic de choléra (cas probable d'après la clinique et le contexte épidémiologique) doivent en informer le médecin inspecteur de santé publique de l'ARS de leur lieu d'exercice (signalement) et les biologistes doivent envoyer la souche suspecte au CNRVC. **Le signalement**, procédure d'urgence et d'alerte, s'effectue sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie). Il n'existe pas de support spécifiquement dédié au signalement, c'est généralement la fiche de Déclaration Obligatoire (DO) qui en fait effet, disponible sur le site internet du CNR ainsi que sur le site de Santé publique France, https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa_12197.do
- La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNR. Les médecins ou les biologistes déclarants notifient le cas au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS du lieu d'exercice au moyen de la fiche de DO choléra. De son côté, le CNR déclare l'identification d'une souche de vibrion cholérique sur le territoire français (France Métropolitaine, DOM et Mayotte) à la DGS, Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires et sociales (CORRUS) et à Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail et par courrier. Le ministère de la Santé et des Solidarités peut être amené à assurer la déclaration internationale des cas confirmés à l'OMS, si le cas entre dans les critères de déclaration du Règlement Sanitaire International en vigueur.
- Dans le cas des infections à vibrions non cholériques, le CNR informe systématiquement Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail ou par téléphone, en cas de phénomène anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (formes cliniques inhabituelles, souches atypiques, infections à *V. vulnificus*,...).

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

• Six signalements ont été faits en 2019 par le CNR :

↳ **5 cas isolés de choléra ont été importés d'Inde** en 2019, en mars (1 cas), avril (2 cas non liés), et juin (1 cas). Pour 4 cas le CNR a été alerté par les laboratoires et a signalé les cas à Santé publique France et à la DGS, Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires et sociales (CORRUS) après confirmation de l'identification d'un vibriion cholérique. Pour 1 cas, le CNR a été alerté par SpF après réception d'une DO.

↳ **1 cas de choléra a été importé du Bangladesh** en décembre 2019 et a fait l'objet d'un signalement par le CNR à SpF et à la DGS.

Les cas sont déclarés sur la base des critères de notification en France, qui sont « un tableau clinique évocateur de choléra avec identification d'un vibriion cholérique, *V. cholerae* O1, avec confirmation par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra, et un contexte épidémiologique compatible (retour d'une zone d'endémie ou d'épidémie cholérique) ». Cependant, du fait de l'isolement de souches de *V. cholerae* O1 non toxinogènes rapporté à plusieurs reprises au cours des années précédentes, la caractérisation des souches par le CNR inclut systématiquement la mise en évidence des gènes de toxine cholérique avant confirmation des cas. Ceci est cohérent avec les dernières recommandations de l'OMS, qui demande la recherche des gènes de toxine pour la confirmation des cas hors zones épidémiques ou endémiques.

↳ **Signalements de suspicions de cas de choléra**

Le CNR et Santé publique France ont échangé sur 2 suspicions de cas de choléra, pour lesquels les biologistes ou cliniciens avait fait un signalement à l'ARS, concernant :

- une suspicion de choléra autochtone, qui n'a pas été confirmée suite aux investigations menées
- une suspicion de choléra pour un cas de retour de République Dominicaine en décembre 2019. Il s'agissait d'un cas d'infection à *V. cholerae* non-O1/non-O139.

↳ **Alerte dans le cadre d'une suspicion de TIAC à *V. parahaemolyticus***

L'ARS de Bourgogne Franche-Comté a sollicité le CNR via un centre hospitalier pour une demande de recherche de *V. parahaemolyticus* dans le cadre d'une suspicion de TIAC impliquant 3 cas suspect. La présence de *Vibrio* dans des échantillons de selles analysés au CNR n'a pas été confirmée.

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

5.1. Conseils et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé

Les cours donnés en 2019 se sont adressés à des médecins, pharmaciens, vétérinaires, scientifiques et ingénieurs souhaitant se spécialiser dans les relations entre les agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement. Des cours ont également été donnés à des cadres bactériologistes du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), sur la surveillance microbiologique en Santé Publique dans le cadre d'un Programme RESER (Réseau d'Etude et de Surveillance des Pathogènes Émergents), dans

l'objectif de renforcer les capacités de référence de 6 instituts du RIIP en Afrique, pour une meilleure détection des maladies bactériennes et de leur émergence :

- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, "Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque", "Le Choléra, épidémiologie et prévention", Institut Pasteur, 05/02/2019 (M-L Quilici).
- Cours Master 2, Université Paris 6, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. "Epidémiologie du Choléra", Faculté de Médecine Saint-Antoine, 01/10/2019 (M-L Quilici).
- Cours RESER (Réseau d'Etude et de Surveillance des Pathogènes Émergents), Introduction aux techniques de bactériologie pour les activités de Référence en Santé Publique, Instituts de Madagascar, Cameroun, Côte d'Ivoire, Sénégal, Maroc et Tunisie, Module *Vibrio* et choléra, Institut Pasteur Paris :
 - Reser 2 : Introduction à l'épidémiologie des infections à *Vibrio*, 28/03/2019
 - Reser 3 : Les Vibriens non cholériques : que surveiller ? 17/10/2019

5.1.2 Accueil de stagiaires

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

Stagiaires accueillis en 2019 :

- Jean-Claude ANNÉ, responsable adjoint du CNR Choléra et Shigellose à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, en stage d'observation du 14 au 25 janvier 2019, dans le cadre du Programme RESER de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur.
- Leila AICHA OUMAR, Technicienne de laboratoire au Centre Pasteur de Garoua au Cameroun, en stage d'observation du 1er avril au 26 avril 2019, dans le cadre du Programme RESER de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur.
- Denis BIZARD, 1^{ère} et 2^{ème} années de BTS Bioanalyses et contrôles, stage du 20 mai au 28 juin 2019, puis du 28 octobre au 20 décembre 2019, sur le typage moléculaire de *V. cholerae* O1.
- Koichi N'DIN, technicien de laboratoire à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, stage du 3 juin au 28 juin 2019, dans le cadre du Programme RESER de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur.
- Hanyat ALI, BTS 2^e année Bioanalyses et contrôle, stage du 29 juillet au 29 août et du 28 octobre au 20 décembre 2019, sur l'étude de la résistance aux antibiotiques de souches environnementales de *V. parahaemolyticus*.

Un apprenti, Monsieur Hugo LEPY, a été accueilli en licence professionnelle de génomique sur l'année scolaire 2018/2019 pour le développement d'une base de données génomiques et protéomiques pour la caractérisation des espèces de *Vibrio* par spectrométrie de masse. Soutenance du mémoire le 6 septembre 2019.

Une biologiste à l'hôpital Bécclère de Paris, Caroline ROUARD, a été accueillie dans le cadre d'un Poste d'accueil de l'AP-HP, du 05 novembre 2018 au 31 octobre 2019, pour une étude de génomique comparative et évolutive des vibrions cholériques du biotype classique.

5.1.3 Guides élaborés

- Quilici M.-L., Robert-Pillot A. Chapitre *Vibrio*. In : Précis de bactériologie clinique, 3e Edition, Ed. ESKA 2018, Chap 67, 28 p.
- Un article à destination des biologistes a été publié dans la revue Spectra Biologie, portant sur la recherche de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les selles en absence de milieux spécifiques, Quilici ML, Robert-Pillot A. *Vibrio* et gastroentérites : vigilance et bonnes pratiques. Spectra Biologie n° 215, Mai 2015, 67-70.
- 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, 2011, 8- 026-F-15, 2011, 12 p.
- 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, Quilici ML, Le diagnostic bactériologique du choléra, (Elsevier Masson SAS), 2011, 431, 51-65.
- 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'Etudes 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-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-vibrions-et-du-cholera>.

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

(i)auprès des partenaires :

- Santé publique France, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec Santé publique France ont été décrits au point 3-3.1 de ce rapport pour les vibrions cholériques.

Un bilan des cas de choléra importés en France a été réalisé et publié conjointement par Santé publique France et le CNR en 2007. Concernant les vibrions non cholériques, le CNR signale à Santé publique France tout événement inhabituel dont il a connaissance : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques. Les données de surveillance sont communiquées à Santé publique France sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles. Le CNR a publié des bilans des infections à vibrions non cholériques dans le bulletin de Santé publique France « Surveillance Nationale des Maladies Infectieuses », en 2003 et 2005, dans le traité Maladies Infectieuses de l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Infections à Vibrions non cholériques, en 2011, il a également été fait état de ces données dans un numéro thématique du BEH, « risques microbiologiques alimentaires dans les produits d'origine animale, surveillance et évaluation », en 2012. Un bilan est fait annuellement dans le rapport d'activité.

- Après d'autorités partenaires telles que l'ANSES, l'IFREMER : le CNR communique régulièrement avec ces différentes instances, dans le cadre de programmes de recherche communs, ou à l'occasion d'enquêtes ponctuelles ou de sollicitations conjointes par les autorités partenaires (DGS ou Direction Générale de l'Alimentation, DGAL) pour la rédaction de textes réglementaires (Protocole provisoire de détection-identification des vibrions, à destination des Laboratoires Vétérinaires Départementaux, normes AFNOR, normes ISO, notes de service de la DGAL, fiche de description des dangers *Vibrio* et CES Biorisk, ...).

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

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

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

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

5.1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé

Le CNR est régulièrement sollicité par des biologistes 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, par ailleurs la responsable du CNR est joignable sur son téléphone portable qui est communiqué aux correspondants par retour de mails ou par la messagerie téléphonique du CNR. Le volume d'activités est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

5.2. Conseils et expertises aux autorités sanitaires nationales et internationales

- La responsable du CNR a été sollicitée en 2017-2018 pour la mise à jour d'une fiche de dangers *Vibrio* dans le cadre du CES BIORISK de l'ANSES, en tant que rapporteur. La fiche a été présentée au CES Biorisk le mardi 10 avril 2018, et publiée en décembre 2019, elle est accessible à l'adresse suivante <https://www.anses.fr/en/system/files/BIORISK2016SA0272Fi.pdf>

- Une instruction technique concernant la gestion de lots de produits aquatiques contaminés a été publiée par le bureau des produits de la mer et d'eau douce, DGAL, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, sous forme d'une Instruction technique DGAL/SDSSA/2019-486 du 02/07/2019. Les *Vibrio* spp. d'intérêt en santé publique ont été définis sur la base des données du CNR concernant les cas d'infections à VNC.

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

Elle a participé en 2019 aux groupes de travail internationaux suivants :

- 4th Meeting of the the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) - WASH Working Group 12 - 13 February 2019, Les Pensières Center for Global Health, Veyrier du Lac (France)
- GTFCC OCV Working Group, 3 et 4 décembre 2019, Domaine de Penthes, Genève, Suisse.

Et animé la réunion annuelle du groupe de travail « surveillance » pour la partie laboratoire :

4th GTFCC SURVEILLANCE Working Group Annual Meeting, 15-17 April 2019, Fondation Mérieux, Centre de Conférence des Pensières, Veyrier du Lac.

- La responsable du CNR a réalisé en 2019 l'expertise du dossier de candidature le Centre National de Référence Belge pour *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*.

- Le CNR a échangé et transmis des informations aux ARS qui l'ont sollicité en 2019 :

- ARS-DT69
- ARS Nouvelle-Aquitaine
- ARS d'Ile de France
- ARS PACA
- ARS de Bourgogne Franche-Comté

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

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

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

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

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

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2019

• **Immune response to two doses of killed whole cell cholera vaccine administered with an eight months delay in the Democratic Republic of Congo.** *Projet de recherche clinique n° 2016-032, Promoteur : Epicentre, Financier : Médecins sans Frontières, WHO. Collaboration Epicentre, MSF, Ministry of Health DRC, Institut Pasteur (CNRVC, Pierre Lafaye, Plate-Forme d'Ingénierie des anticorps). En cours de soumission à Plos Neglected Tropical Diseases.*

Un vaccin anticholérique oral (VCO) préqualifié par l'OMS est utilisé dans le cadre de campagnes vaccinales de prévention et riposte aux épidémies de choléra. Ce vaccin est normalement donné en deux doses à 14 jours d'intervalle. La région de Kalémie, en RDC, est une zone endémique pour le choléra. Une campagne de vaccination orale contre le choléra a été organisée en novembre 2013 dans le cadre de mesures préventives visant à protéger la population. Pour des raisons de sécurité, la deuxième dose n'a pas pu être administrée en 2013, et une nouvelle activité de vaccination a été entreprise en juillet 2014. Cette situation a donné une opportunité unique pour mieux comprendre la réponse immunitaire à une deuxième dose différée du vaccin oral anti cholérique. 1124 sérums ont été analysés par la recherche d'anticorps vibriocides et la caractérisation de la classe d'IG. Les réponses immunitaires après la deuxième dose de vaccin ont été similaires chez les groupes ayant ou non reçu une première dose huit mois auparavant, avec un bénéfice pour les enfants de moins de 5 ans ayant reçu une deuxième dose différée. Ces résultats montrent qu'il est possible d'envisager des schémas alternatifs d'administration vaccinale et encouragent à développer d'autres schémas d'administration chez les enfants de moins de cinq ans actuellement moins efficacement protégés que les adultes.

• **Etude de l'épidémie de choléra au Yémen, 2016-2017.** *Collaboration Epicentre, London School of Hygiene & Tropical Medicine, WHO Yemen, Egypt, CPHL Yemen, MSF, WHO Geneva, Johns Hopkins School of Public Health, UNICEF, Sana'a, Yemen.*

Des cas de choléra ont été signalés en septembre 2016 puis à partir d'avril 2017, à l'origine de la plus grande épidémie documentée de choléra des temps modernes. L'épidémie s'est manifestée sous forme de deux vagues distinctes avec une forte augmentation de la transmission en mai 2017. En collaboration entre l'Unité BPE et le Wellcome Trust Sanger Institute, le séquençage du génome de souches isolées des deux vagues cette épidémie ainsi que d'isolats récents de pays voisins a été réalisé pour identifier les origines et les voies de transmission possibles des souches du Yémen. Les résultats ont été publiés en 2019, *Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. Nature. 2019, Jan;565(7738):230-233. doi: 10.1038/s41586-018-0818-3. Epub 2019 Jan 2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602788/>*

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

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

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

Projet sur deux ans en collaboration avec l'ANSES de Boulogne-sur-Mer, financement de la Direction Générale de l'Alimentation, prolongé jusqu'en octobre 2020.

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

• **Caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origines écologiques diverses :**

la reconnaissance du rôle des vibrions en pathologie humaine est surtout due à l'existence du vibron cholérique, *V. cholerae* des sérogroupes O1 ou O139. Cependant les souches d'autres sérogroupes peuvent être à l'origine de pathologies sévères et rapidement évolutives chez des patients immunodéprimés. Contrairement aux souches de vibrions cholériques (*V. cholerae* O1 et O139), les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 sont génétiquement très hétérogènes, et aucun facteur de pathogénicité n'a été à ce jour associé aux souches responsables de pathologies chez l'homme. Les infections font suite à un contact direct avec l'eau ou à la consommation de produits de la mer dans lesquels les *Vibrio* sont naturellement présents. Actuellement, en l'absence de marqueurs moléculaires spécifiquement associés à l'expression du pouvoir pathogène chez l'homme, rien ne permet aujourd'hui de différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes. Le CNR dispose d'une collection de plus de 350 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées chez l'homme (plus de 160 souches cliniques d'origines géographiques diverses et associées à différents syndromes) ou dans les aliments, qui sont séquencées dans le but de décrire la structure des populations, d'identifier les facteurs de pathogénicité, de créer des banques de données génomiques et de développer un schéma Whole genome MLST ; 258 souches ont été séquencées, caractérisées par leur séro groupe pour une partie (collaboration avec le National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japon), analysées par schéma MLST in silico.

Ce projet a bénéficié en 2019 du recrutement en CDD d'un Ingénieur de recherche – Slim EL KHIARI.

• **Développement d'une base de données génomiques et protéomiques des différentes espèces de *Vibrio*.**

Ce projet, qui a déjà été partiellement présenté dans la rubrique 2.1 *Evolution des techniques*, a bénéficié de l'accueil d'un apprenti, M. Hugo LEPY, pour l'année scolaire 2018/2019, qui a participé au développement d'une base de données génomiques et protéomiques des différentes espèces de *Vibrio*, (analyses des spectres MALDI-TOF, préparation des ADN pour le séquençage haut-débit (technique Illumina) en lien avec PIBNet, analyse des séquences génomiques).

Dans le cadre de sa mission de surveillance, le CNR doit identifier ou confirmer rapidement les différentes espèces de vibrions à l'origine de pathologies chez l'Homme, plus particulièrement l'espèce *V. cholerae* pour laquelle il est important de différencier rapidement les vibrions cholériques des vibrions non cholériques. Récemment, les laboratoires d'analyses médicales se sont équipés de la technologie d'identification des micro-organismes par spectrométrie de masse. En fonction du fournisseur, les appareils ne permettent pas toujours la détection et le typage de *V. cholerae*, les bases de données n'étant pas toujours accessibles. C'est notamment le cas du MALDI-TOF Biotyper Bruker utilisé sur le campus de l'Institut Pasteur. Dans un premier temps, la performance d'identification du

système Bruker a été évaluée pour le genre *Vibrio* avec une sélection de souches de différentes espèces de *Vibrio* disponibles à la CIP et au CNR, puis la base de données protéomiques a été enrichie avec les spectres d'environ 400 souches de *V. cholerae* d'origine géographique différentes et associées à des syndromes cliniques divers afin de permettre l'identification correcte de cette espèce par spectrométrie de masse. Il reste nécessaire d'améliorer le contenu de la base de données, surtout pour les espèces moins fréquemment rencontrées. Ce travail de référence a été réalisé en complémentarité du séquençage génomique pour enrichir les bases de données protéomiques d'identification des *Vibrio* pathogènes.

6.2 Liste des publications et communications

- Publications nationales

Leroy AG, Lerailler F, Quilici ML, Bourdon S. *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 otitis in metropolitan France. *Med Mal Infect.* 2019, 49(5):359-361. doi: 10.1016/j.medmal.2019.03.003. Epub 2019 Mar 28.

- Publications internationales

Weill FX, Domman D, Njamkepo E, Almesbahi AA, Naji M, Nasher SS, Rakesh A, Assiri AM, Sharma NC, Kariuki S, Pourshafie MR, Rauzier J, Abubakar A, Carter JY, Wamala JF, Seguin C, Bouchier C, Malliavin T, Bakhshi B, Abulmaali HHN, Kumar D, Njoroge SM, Malik MR, Kiiru J, Luquero FJ, Azman AS, Ramamurthy T, Thomson NR, Quilici ML. Genomic insights into the 2016-2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019 Jan;565(7738):230-233. doi: 10.1038/s41586-018-0818-3. Epub 2019 Jan 2.

Mougin J, Copin S, Bojolly D, Raguenev V, Robert-Pillot A, Quilici ML, Midelet-Bourdin G, Grard T, Bonnin-Jusserand, M. Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non-cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: Stayin' alive? *Food Control*, 2019, 102, 122-130, doi:10.1016/j.foodcont.2019.03.024

Ferreras E, Blake A, Chewe O, Mwaba J, Zulu G, Poncin M, Rakesh A, Page AL, Quilici ML, Azman A S, Cohuet S, Ciglenecki I, Malama K, Chizema-Kawesha E, Luquero F J. Alternative observational designs to estimate the effectiveness of one dose of oral cholera vaccine in Lusaka, Zambia. *Epidemiology & Infection*, 2020, 148, e78, 1–6. <https://doi.org/10.1017/S095026882000062X>.

- Publications soumises

Breurec S, Franck T, Njamkepo E, Mbecko JR, Rauzier J, Sanke-Waïgana H, Kamwiziku G, Piarroux R, Quilici ML, Weill FX. *Seventh pandemic Vibrio cholerae O1 sublineages in the Central African Republic, 1997-2016*. *Emerging Infectious Diseases*, RE: MS# EID-20-0375

Jones F K; Wamala J F; Rumunu J; Pinyi Nyimol Mawien; Kol Mathew Tut; Wohl S; Deng L; Pezzoli L; Linda Haj Omar; Lessler J; Quilici ML; Luquero FJ; Azman A S. *Successive epidemic waves of cholera in South Sudan, 2014 – 2017*. *The Lancet Planetary Health*, TLplanetaryhealth-D-20-00065

Mihaela Oprea, Dr. Elisabeth Njamkepo, Daniela Cristea, Anna Zhukova, Clifford Clark, Anatoly Kravetz, Elena Monakhova, Adriana Ciontea, Radu Cojocar, Jean Rauzier, Maria Damian, Olivier Gascuel, Marie-Laure Quilici, François-Xavier Weill, "The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics", Nature Communications, NCOMMS-20-24076-T

- *Conférences*

6th Annual Meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 3 et 4 juin 2019, Les Pensières Center for Global Health, Veyrier du Lac (France), " Update from the GTFCC Laboratory Working Group", ML Quilici.

Journées de Biologie Clinique Necker – Institut Pasteur, 22 janvier 2019, Paris, France. Infections à vibrions non cholériques : manifestations cliniques et diagnostic microbiologique. ML Quilici.

- *Communications affichées*

20es Journées Nationales d'Infectiologie, 5-7 juin 2019, Lyon, France. Non-cholera *Vibrio* Infections in France, 22 years of surveillance (1995-2017) A. Descamps, A. Robert-Pillot, J. Rauzier, A. Guénolé, P. de Crouy-Chanel, H. De Valk, J.-M. Fournier, H. Noël, M.-L. Quilici

15^e congrès national de la SFM, 30 septembre-2 octobre 2019, Paris, France. Non-cholera *Vibrio* Infections in France, 22 years of surveillance (1995-2017) A. Descamps, A. Robert-Pillot, J. Rauzier, A. Guénolé, P. de Crouy-Chanel, H. De Valk, J.-M. Fournier, H. Noël, M.-L. Quilici

15^e congrès national de la SFM, 30 septembre-2 octobre 2019, Paris, France. Comparaison de la toxicité du traitement par l'éthidium monoazide (EMA) et par le propidium monoazide (PMA) pour différencier les *Vibrio* viables par PCR en temps réel. Stéphanie Copin, Julia Mouglin, Virginie Ragueneau, Annick Robert-Pillot, Marie-Laure Quilici, Graziella Midelet-Bourdin, Thierry Gard, Maryse Bonnin-Jusserand

International Conference on the Biology of Vibrios. November 17-20, 2019 – Montréal – Canada. Stéphanie Copin, Julia Mouglin, Virginie Ragueneau, Annick Robert-Pillot, Marie-Laure Quilici, Graziella Midelet-Bourdin, Thierry Gard, Maryse Bonnin-Jusserand. Communication affichée, « Toxicity comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide treatment for the differentiation of viable *Vibrio* cells by qPCR ».

Communications avec le public,

Le CNR communique avec la Presse selon le contexte, et a en particulier été sollicité en 2018 lors de l'alerte internationale associée à l'épidémie de choléra en Algérie. Le bilan presse de l'Institut Pasteur pour l'année 2018 mentionne 145 retombées pour le CNR, écrites et ponctuellement télévisuelle (*France 3*, édition nationale), ce qui représente d'après cette source une audience de plus de 6 millions de personnes.

Les dernières publications des travaux de l'Unité et du CNR sur le choléra ont donné lieu à des communiqués de Presse ou à la publication de dossiers :

- *L'épidémie de choléra au Yémen décryptée grâce à la génomique*, 03/01/2019, <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/epidemie-cholera-au-yemen-decryptee-grace-genomique>
- *Est-il possible de tracer les épidémies de choléra ?* 06/01/2019 <https://www.la-croix.com/Monde/Est-possible-tracer-epidemies-cholera-2019-01-06-1200993450>
- Dossier Choléra : un fléau encore à l'origine d'épidémies majeures, 11/01/2018 <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/dossiers/cholera-fleau-encore-origine-epidemies-majeures>
- Choléra : la compréhension du lien entre les grandes épidémies mondiales ouvre la voie à une meilleure stratégie de lutte, 10/11/2017 <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/cholera-comprehension-du-lien-entre-grandes-epidemies-mondiales-ouvre-voie-meilleure-strategie-lutte>

Le communiqué de presse sur l'épidémie de choléra au Yémen a été relayé auprès des Grands Donateurs, par le Service Dons et Mécénat de l'Institut Pasteur, via le Book des avancées de l'année 2019 à l'Institut Pasteur.

L'Institut Pasteur publie et fait régulièrement mettre à jour des fiches d'information détaillées sur un certain nombre de maladies dont le choléra. La Fiche « Choléra », accessible à l'adresse <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/cholera>, a été mise à jour le 16 septembre 2019.

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

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

- En 2013 et 2014, le CNR, le LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche de l'ANSES et le LNR Microbiologie des coquillages de l'IFREMER avaient été sollicités conjointement par la DGAL pour la rédaction d'une note de service concernant la « conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles officiels ».
- Les données de surveillance du CNR ont participé à la mise à jour de cette note sous forme d'une instruction technique concernant la gestion de lots de produits aquatiques contaminés publiée par le bureau des produits de la mer et d'eau douce, DGAL, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, DGAL/SDSSA/2019-486 du 02/07/2019.
- Le CNR, l'ANSES et l'IFREMER ont participé collectivement à la rédaction de la Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, vibrions entéropathogènes : *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 et *Vibrio vulnificus*, présentée au CES Biorisk de l'ANSES en 2018 et publiée en 2019.

8/ Programme d'activité pour 2020-2021

Le CNR a été reconduit, suite à l'appel à candidature lancé le 20 juin 2016 par Santé publique France en vue de la nomination des Centres Nationaux de Référence, pour la période 2017-2022. Il poursuivra donc son activité conformément au programme de travail quinquennal présenté dans le dossier de candidature de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques.

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

Seront poursuivis :

- La caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 responsables de pathologies chez l'homme, leur comparaison avec des souches alimentaires ou environnementales d'origines géographiques diverses, avec comme objectif l'identification de marqueurs permettant l'amélioration de la prévention des infections.

- L'identification des souches de *Vibrio* par spectrométrie de masse par l'utilisation d'un appareil plus performant pour le typage, basée sur la technologie de spectrométrie infrarouge, capable d'analyser directement les sucres de surface. Cette technologie pourrait s'avérer particulièrement intéressante pour la caractérisation des sérogroupes de *V. cholerae* autres que O1 et O139 pouvant être à l'origine de pathologies sévères et des sérogroupes de *V. parahaemolyticus* caractéristiques des clones pandémiques.

- L'étude des souches de *V. vulnificus* incluant toute la collection de souches d'origine humaine du CNR (environ 30) et un panel de souches alimentaires provenant du LNR *Vibrio*, Laboratoire de sécurité des aliments, de l'ANSES de Boulogne-sur-Mer. Ces souches ont été sélectionnées en fonction de leur origine géographique, de leur année d'isolement et de la matrice alimentaire dont elles sont issues. Les travaux menés visent à analyser et comparer les phénotypes /génotypes de résistance des

souches, identifier des marqueurs de virulence prédictifs de la pathogénicité et repérer dans les isolats environnementaux les souches à potentiel infectieux.

- La validation de la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide par la technique Sensititre pour les *Vibrio*, avec comme objectif à terme l'utilisation de ce système et le dessin de plaques spécifiques. Les molécules testées et les concentrations d'antibiotiques proposées sur la plaque commerciale EUVSEC utilisée actuellement ne sont pas toutes adaptées aux *Vibrio* et la comparaison entre cette méthode et la méthode de diffusion n'a pu être réalisée que sur une partie des antibiotiques testés (ampicilline, azithromycine, chloramphénicol, ciprofloxacine, colistine, acide nalidixique, sulfamides, tétracycline et composé O129). Dans 70% des cas, les résultats étaient parfaitement corrélés (100%), mais des discordances ont essentiellement été observées avec les sulfamides, la colistine et à un degré moindre avec l'ampicilline.

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

ANNEXES

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

1.2 Organisation du CNR

1.3 Locaux et équipements

1.4 Collections de matériel biologique

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Techniques de référence

2.2 Techniques recommandées par le CNR

Annexe supplémentaire : Déclaration d'intérêt

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

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

Cahiers des charges spécifiques du CNR

Vibrions et choléra

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

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

Pour le Vibron cholérique

1. Apporter une expertise microbiologique :

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

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

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

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

Pour les vibrions non cholériques

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

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

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

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

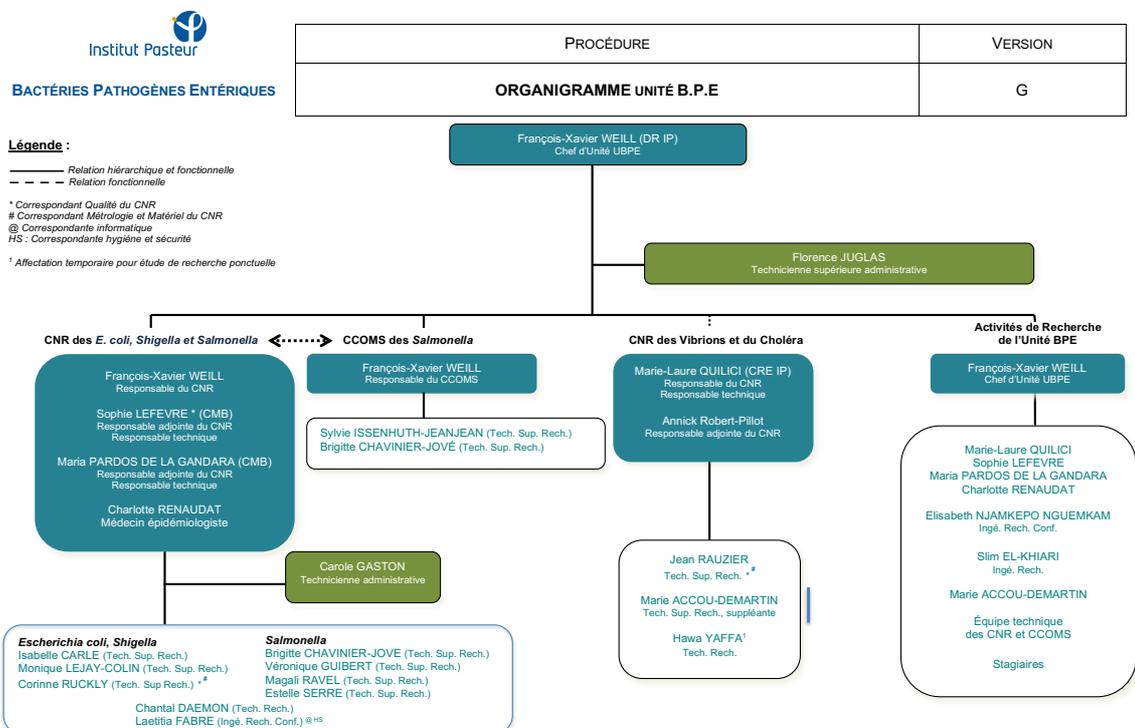
1.2 Organisation du CNR

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

Effectif pour le CNR par catégories de fonctions

Nom - prénom	Qualifications*	ETP
QUILICI Marie-Laure	Scientifique (Responsable du CNR)	0,40
ROBERT-PILLOT Annick	Scientifique (Responsable-adjointe)	0,20
RAUZIER Jean	Technicien supérieur de recherche	0,65
ACCOU-DEMARTIN Marie	Technicienne supérieure de recherche	0,10
JUGLAS Florence	Assistante	0,25
TOTAL 2019		1,6

Organigramme de l'Unité BPE



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

1.3 Locaux et équipements

1.3-1 Locaux

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

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

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

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

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

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

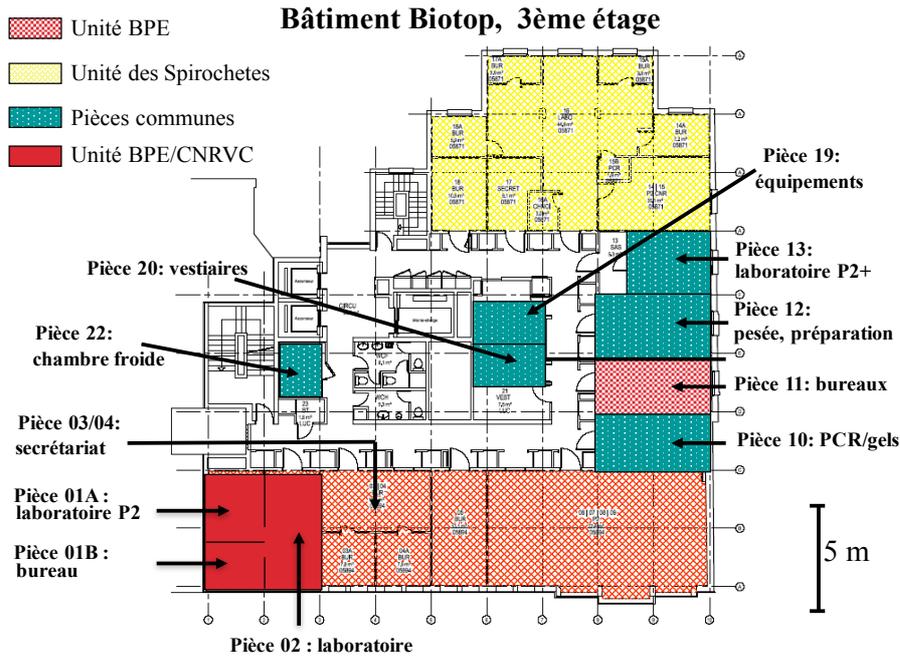
Laboratoire de 22,5 m² (03/04) pour faire les PCR hors accréditation et le PFGE

Le CNR-VC comprend également :

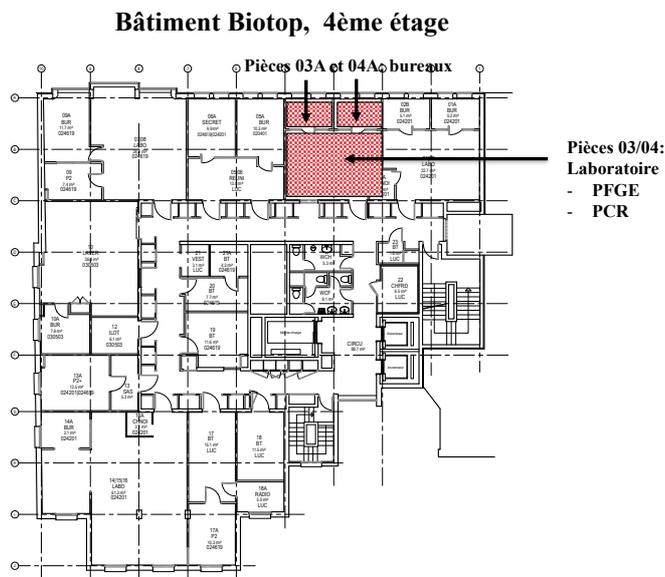
- Un local technique au sous-sol du Biotop partagé avec d'autres entités, abritant des congélateurs à -80°C, dont deux contenant une partie de la collection actuelle du CNR.
- Un local côté 25 rue du Dr Roux, partagé avec d'autres entités, abritant des containers d'azote liquide, dont deux contenant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

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

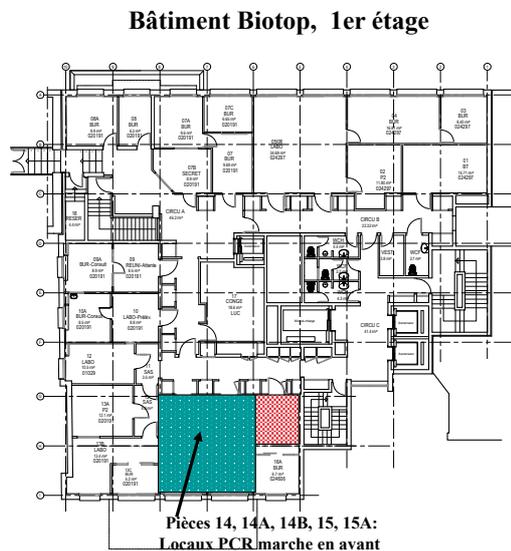
Plan 1



Plan 2



Plan 3



1.3-2 Équipements

Dans la structure

Spécifiques au CNR :

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

Commun à l'Unité BPE :

- Un appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad)
- Un système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan
- Un système de lecture et d'interprétation des CMI en microdilution sur plaques Sensititre

Partagé avec d'autres entités :

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

1.3-3 Moyens extérieurs à la structure et services supports

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

- La Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M),

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

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

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

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

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

Viennent également en support aux CNR :

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

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

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

1.4 Collection de matériel biologique

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

- Production d'immuns sérums de référence :

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

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

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

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

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

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

Synthèse 2019 :

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

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

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

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

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

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

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur, dont le CNR des Vibrions et du Choléra, et la CIBU du LREMS, sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

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

Le CNR-VC est engagé dans la démarche qualité depuis 2000. Il est inclus dans la 4ème vague d'accréditation des activités analytiques. La rédaction des procédures et modes opératoires analytiques et documents d'enregistrement pour ses activités de diagnostic a été réalisée, avec une gestion documentaire électronique des documents et leur mise en ligne sur la plateforme webcampus de l'Institut Pasteur, dans l'espace dédié au CNR. Le CNRVC participe annuellement à des contrôles externes de la qualité via des essais inter laboratoires, avec le CNR de Liège.

La démarche qualité spécifique au CNRVC en 2019 a été présentée au point 1-3 de ce rapport. A terme, la portée d'accréditation du CNRVC concernera le diagnostic des infections à vibrions cholériques et

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

non cholériques par l'identification moléculaire des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, le sérogroupage O1 et O139 de l'espèce *V. cholerae*, la recherche des gènes de toxine cholérique.

Perspectives 2020 pour le LREMS et le CNRVC :

Étapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE (CNRVC)	Juin 2020
Audit COFRAC LREMS S7 (Le CNRVC ne fait pas partie de l'échantillonnage)	1 ^{ère} semaine Octobre 2020
Audits internes qualité et technique	Dernier trimestre 2020
Revue de direction LRE-MS	Sept-Octobre 2020
Portée d'accréditation complète liste des techniques et prévisions en Annexe 2	Courant 2021

Les techniques accréditées ou en voie d'accréditation au CNR sont les suivantes :

Lieu de réalisation des opérations techniques	Domaine	Sous-Famille	Examen / analyse	Nature de l'échantillon biologique	Principe de la méthode	Référence de la méthode	Remarque
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de <i>V. cholerae</i>	Portée A flexible	Accrédité
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Recherche des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i>	Portée A flexible	Accréditée
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	Portée A	2020
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de <i>V. vulnificus</i>	Portée A	2020
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de <i>V. alginolyticus</i>	Portée A	2020
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	Agglutination sur lame	Souche bactérienne	Sérotypage de <i>V. cholerae</i>	Portée A flexible Utilisation de sérum commercialisés	Extension, juin 2020

2.1 Techniques de référence

2.1-1 Techniques disponibles

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

2.1-2 Enrichissement/isolément 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/isolément 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'isolément 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

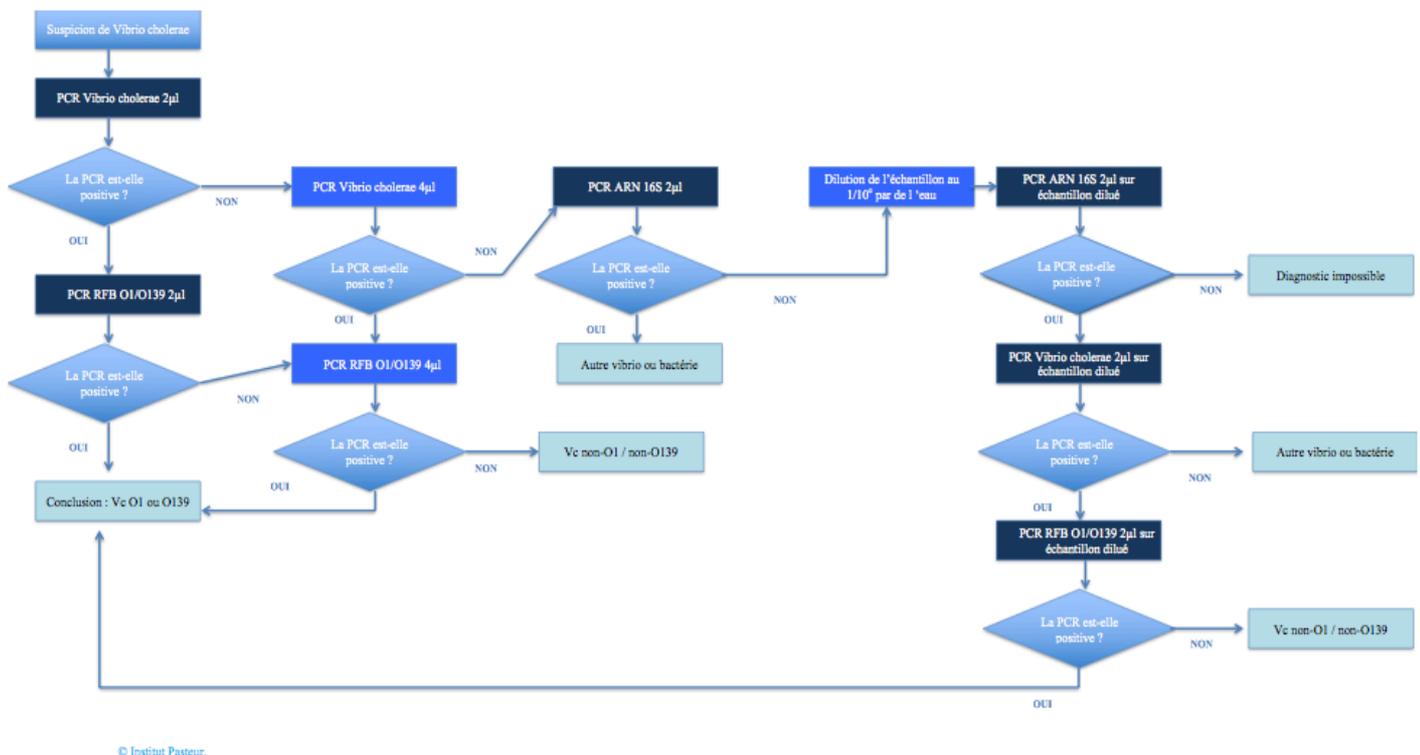
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

- 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 peuvent être 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, mais uniquement à titre d'orientation. L'isolement de l'agent pathogène reste 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 Maxwell. Les PCR sont réalisées sur l'ADN extrait et une dilution au 1/10, une PCR d'amplification des ARN 16S est réalisée si nécessaire pour vérifier la présence d'inhibiteurs.

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



2.1-4 Identification bactérienne

Tests phénotypiques :

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

Tests génotypiques :

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

- Amplification de gènes spécifiques d'espèces :

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

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

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

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

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

2.1-6 Typage moléculaire

- Une standardisation de la méthode PFGE pour les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* avait été publiée par le réseau PulseNet USA afin de pouvoir effectuer des comparaisons de profils inter-laboratoires. Cette méthode est toujours disponible au CNR mais n'est plus appliquée à la surveillance épidémiologique des souches circulant dans le monde (diversification des populations, introduction éventuelle d'une nouvelle souche, origine des cas importés, ...), car peu discriminante.
- Une surveillance de l'apparition ou de la circulation de variants des vibrions cholériques du biotype ElTor peut être faite en première intention par amplification et séquençage de marqueurs génotypiques spécifiques des biotypes, puis comparaison des séquences avec des séquences de référence : 1) gène *ctxB* codant pour la sous unité B de la toxine cholérique, 2) gène *tcpA* codant pour la protéine TCP (Toxin-corregulated-pilus), récepteur du phage CTX Φ , 3) gène *rstR* codant pour un répresseur du phage CTX ϕ .
- Méthode MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) réalisée en PCR multiplex pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1, basée sur l'analyse de 6 loci présentant des séquences répétées.
- MLST *in silico* pour les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139, basé sur le schéma d'Octavia.

2.1-7 Caractérisations supplémentaires

Les PCR suivantes sont également effectuées en routine au CNR :

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

Suivies d'un Blast contre des banques de données de référence.

2.1-8 Détermination phénotypique et génotypique de la sensibilité aux agents antimicrobiens

- Un antibiogramme standard est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé et détermination des CMI par bandelettes ou en milieu liquide selon les dernières recommandations en vigueur de l'EUCAST. Sont testés,
 - Ampicilline,
 - Acide Nalidixique, Ciprofloxacine,
 - Tétracyclines
 - Sulfamides et Sulfamides, Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.
 - Chloramphénicol
 - Nitrofuranes
 - Erythromycine, Azithromycine
 - Polymyxine B, Colistine.
 - Céphalosporines de 1^{ère} génération : Céfalotine
 - Céphalosporines de 3^{ème} génération : Céfotaxime

L'interprétation en catégories S (Sensible), I (Intermédiaire) et R (Résistant) est faite en accord avec l'édition 2020 de l'EUCAST, basés sur le diamètre des zones d'inhibition des Entérobactéries, en l'absence de critères spécifiques aux vibrions définis par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

- La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par bandelettes Etest[®] (AB bioMérieux) est systématiquement effectuée pour détecter les souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (test de l'acide Nalidixique et de la ciprofloxacine), apparaissant comme sensibles par la technique de diffusion en gélose, et depuis 2018 pour l'Azithromycine. De même les valeurs de CMI sont mesurées pour les antibiotiques pour lesquels les souches présentent une résistance intermédiaire par la méthode de diffusion. L'interprétation est faite à partir des valeurs de concentrations critiques définies pour les Entérobactéries.
- 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. L'accumulation de mutations augmente le niveau de résistance de ces souches.

2.1-9 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. Une amélioration de la technique a été publiée par le CNR en 2003 (J Microbiol Methods. 2003, 55(3):745-53). Une technique automatisée a été mise en place au CNR depuis 2014 pour une analyse de la réponse à la vaccination choléra par détermination du taux d'anticorps vibriocides dans les sérums de personnes vaccinées.

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

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

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

2.2-2 Pour les vibrions non cholériques

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

2.3 Techniques recommandées par le CNR

- Bactériologie classique :

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

Diagnostic des infections à vibrions non cholériques

- 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.

Le CNR recommande l'utilisation des méthodes moléculaires (PCR) pour l'identification des vibrions non cholériques, ou l'utilisation de la spectrométrie de masse. Le CNR recommande cependant aux utilisateurs de la spectrométrie de masse d'être attentifs à la base de données associée, en particulier concernant l'identification de l'espèce *V. cholerae*. Il recommande également aux laboratoires utilisant des systèmes de PCR multiplex d'être attentifs aux gènes cibles de la PCR et à l'interprétation d'un signal positif. C'est ainsi qu'une PCR ciblant les gènes de la toxine cholérique ne peut prétendre détecter l'ensemble des souches de l'espèce *V. cholerae*.

Le CNR rappelle la nécessité de confirmer par culture des résultats positifs par PCR multiplex syndromiques. Il recommande également de vérifier la cohérence d'un signal positif avec les données

cliniques et épidémiologiques du cas.

- 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.* Cette méthode peut être utilisée pour un diagnostic rétrospectif du choléra et pour le suivi de la protection vaccinale.

- 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*. Toutefois cette méthode n'est pas recommandée par le CNR pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1 car non discriminante.

- Le CNR recommande de réaliser un antibiogramme pour le traitement des cas de choléra importés du fait des multirésistances des souches, et renvoie aux recommandations de l'OMS pour le choix des antibiotiques. Il recommande d'utiliser le référentiel d'interprétation appliqué aux Entérobactéries (EUCAST).

https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1

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.