



# RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

***Année d'exercice 2022***

**CNR Vibrions et choléra**

	<b>Organisme / Structure d'hébergement</b>	<b>Responsable</b>
<b>Laboratoire CNR</b>	Unité des Bactéries pathogènes entériques, Institut Pasteur	Pr François-Xavier Weill

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans ces rapports, faite sans l'autorisation écrite du CNR Vibrions et Choléra, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence au rapport utilisé. Toute référence aux données de ce rapport se mentionne de la façon suivante : Centre national de Référence des Vibrions et du Choléra, Rapport annuel d'activité 2023, Année d'exercice 2022, p. xx-xx - Institut Pasteur, Paris, France. Les données issues des tableaux et figures présentées dans ces rapports ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

<b>Résumé analytique</b> .....	4
Faits marquants.....	4
<b>Executive summary</b> .....	5
Highlights.....	5
<b>1. Missions et organisation du CNR</b> .....	6
Organigramme .....	6
Mission et Organisation.....	6
Démarche Qualité .....	6
<b>2. Activités d'expertise</b> .....	8
2.1 Evolution des techniques.....	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	9
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	9
2.4 Collections de matériel biologique.....	9
2.5 Activités d'expertises .....	10
2.6 Activités de séquençage.....	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR.....	13
<b>3. Activités de surveillance</b> .....	14
3.1 Description du réseau de partenaires.....	14
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....	16
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....	19
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	21
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	22
<b>4. Alertes</b> .....	24
<b>5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil</b> .....	26
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé .....	26
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires .....	27
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ..).....	27
<b>6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR</b> .....	29

6.1	Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR .....	29
6.2	Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR .....	30
<b>7.</b>	<b>Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux.....</b>	<b>31</b>
<b>8.</b>	<b>Programme d'activité pour les années suivantes.....</b>	<b>32</b>
<b>1.</b>	<b>Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR .....</b>	<b>33</b>
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	33
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	35
1.3	Locaux et équipements .....	35
1.4	Collections de matériel biologique.....	38
1.5	Démarche qualité du laboratoire .....	39
<b>2.</b>	<b>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....</b>	<b>40</b>
2.1	Liste des techniques de référence.....	40
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR .....	41

## RESUME ANALYTIQUE

### Faits marquants

Depuis mi-2022, après des années de déclin, le nombre de cas de choléra et le nombre de décès dus à cette maladie sont à nouveau en hausse dans le monde, associés à une augmentation de 50% par rapport à 2021 du nombre de pays ayant déclaré des épidémies. L'OMS a alerté en décembre 2022 sur une explosion sans précédent du choléra dans le monde, associée au taux de létalité le plus élevé enregistré depuis plus d'une décennie. La résurgence du choléra en Haïti depuis octobre 2022 expose tout particulièrement les territoires français des Antilles. Le choléra est à déclaration obligatoire en France ; sept cas ont été rapportés sur le territoire français en 2022, six en métropole et un dans un territoire d'Outre-Mer. Quatre cas étaient des cas autochtones, dont trois épidémiologiquement reliés et associés à la consommation de produits importés d'un pays épidémique. L'origine de contamination d'un autre cas n'a pas pu être mise en évidence sur la base de l'interrogatoire du patient mais les analyses génomiques ont permis d'identifier l'origine géographique probable de la souche.

Le nombre d'infections à vibrions non cholériques a atteint en 2022 le chiffre le plus élevé rapporté pour ces infections depuis la mise en place de la surveillance en 1995, avec un total de 105 cas, majoritairement associés aux espèces *Vibrio cholerae* et *V. parahaemolyticus*. Les cas d'infections à *V. cholerae* étaient majoritairement (65%) importés de pays où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement font défaut. 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 75% des cas. La majorité des cas d'infections (85%) s'est manifestée par des gastroentérites. Des infections sévères avec bactériémies ont été rapportées, essentiellement liées à l'espèce *V. cholerae*.

## EXECUTIVE SUMMARY

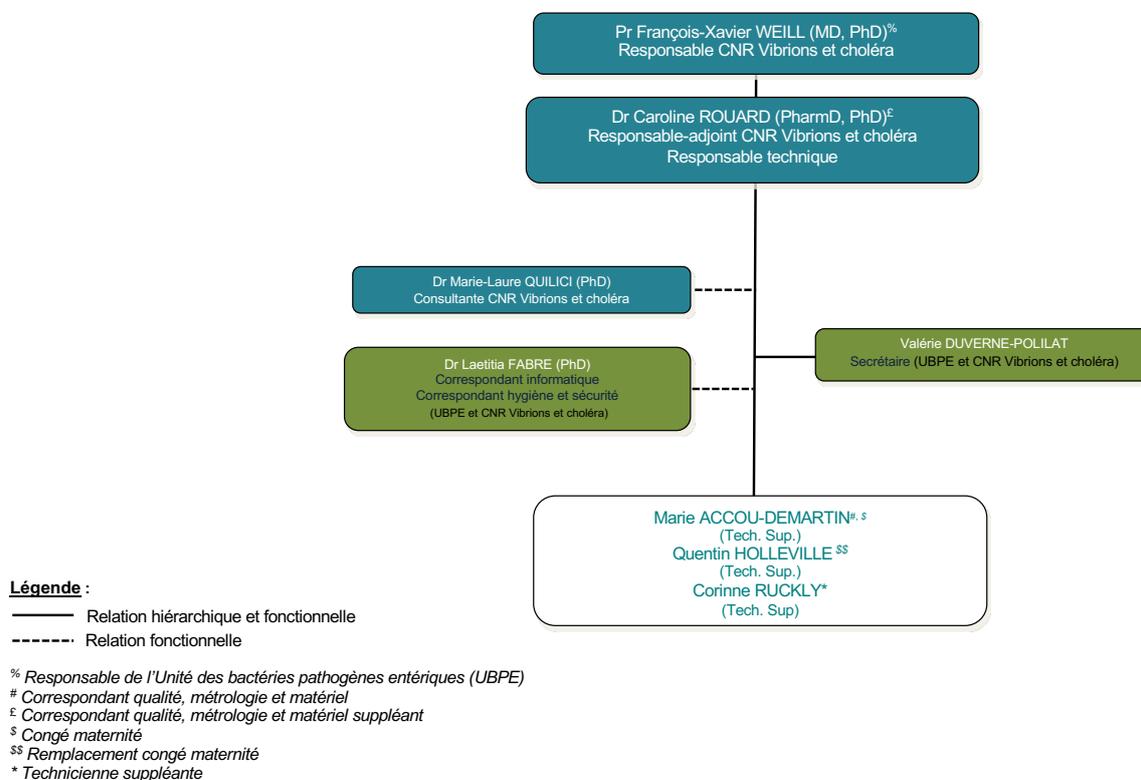
### Highlights

Since mid-2022, after years of decline, the number of cholera cases and deaths worldwide has been on the rise again, associated with a 50% increase over 2021 in the number of countries reporting outbreaks. The WHO warned in December 2022 of an unprecedented explosion of cholera worldwide, associated with the highest case-fatality rate recorded in over a decade. The resurgence of cholera in Haiti since October 2022 exposes the French West Indies territories (TFA) to a particular risk of cholera. Cholera is a notifiable disease in France; seven cases were reported on French territories in 2022, six in mainland France and one overseas. Four were autochthonous cases, three of which were epidemiologically linked and associated to the consumption of food products imported from an epidemic country. The origin of contamination of another case could not be established on the basis of the patient's questioning, but genomic analyses identified the probable geographical origin of the strain.

In 2022, the number of non-cholera *Vibrio* infections reached the highest figure reported for these infections since surveillance began in 1995, with a total of 105 cases, mostly associated with *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* species. The majority of *Vibrio cholerae* cases (65%) were imported from countries with poor hygiene and sanitation standards. A link with the marine environment, through consumption of seafood or direct contact with seawater, was established in over 75% of cases, with most infections (85%) manifesting as gastroenteritis. Severe infections with bacteremia were reported, mostly linked to the *V. cholerae* species.

# 1. Missions et organisation du CNR

## Organigramme



## Missions et Organisation

Missions : voir Annexe 1

Organisation : pas de modification par rapport au dossier de candidature présenté en mai 2022.

## Démarche Qualité

Le CNRVC fait partie des CNR placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2022. Ils 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, qui apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015) ;
- La Direction Médicale ;
- La Coordination des CNR 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. Les services supports critiques sont

régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).

L'ensemble des CNR/CIBU 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/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle pour maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

L'année qualité 2022 du CNRVC s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	Du 27 au 29 juin 2022 Le CNRVC ne faisait pas partie de l'échantillonnage
Revue qualité	3 mai 2022
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	23 juin 2022
Audits internes	Audit qualité : 8 décembre 2022 Audit technique : 20 décembre 2022
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	Identification moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i> : 15 novembre 2022 Identification moléculaire de <i>V. alginolyticus</i> : 24 novembre 2022 Identification moléculaire de <i>V. vulnificus</i> : 30 novembre 2022

Aucun écart n'a été relevé au cours des audits internes qualité et techniques du CNRVC réalisés en 2022.

Malgré le contexte sanitaire, le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en octobre 2020 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour le maintien et la continuité de leurs missions.

Perspectives 2023 :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Mars - juin 2023
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2023
Revue de direction LRE-MS	4 juillet 2023
Audit de surveillance COFRAC	Novembre - décembre 2023

## 2. Activités d'expertise

Les activités d'expertise conduites au CNRVC concernent :

- La confirmation et le typage de souches de vibrions cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. En 2022, le CNR a analysé 10 prélèvements et 19 souches isolées pour une suspicion de choléra sur le territoire français (métropole et territoires d'Outre-Mer). Le CNRVC peut aussi analyser, selon les demandes des pays et de l'OMS, des souches ou prélèvements de zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, pour confirmation de diagnostic (81 échantillons en provenance de cinq pays étrangers en 2022). Des souches sont également étudiées dans le cadre de collaborations internationales impliquant l'Unité des Bactéries pathogènes entériques. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNRVC et permet de connaître les souches de vibrions cholériques circulant dans le monde et susceptibles d'être importées en France.

- L'étude des souches de VNC isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le CNRVC a reçu 115 échantillons (87 souches isolées et 28 prélèvements de selles) pour confirmation d'identification ou recherche de VNC. Au-delà de l'isolement et l'identification des souches, le CNRVC effectue la recherche par PCR des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs des différentes espèces isolées et évalue la sensibilité des souches aux anti-infectieux, à des fins de suivi épidémiologique. Toutes les souches reçues sont également séquencées.

*A noter que le CNRVC est de plus en plus souvent sollicité par les laboratoires de ville ou de centres hospitaliers français pour la recherche des vibrions cholériques et VNC à partir de prélèvements. Leur étude n'est pas systématique et ne se fait qu'après accord préalable des responsables du CNRVC.*

### 2.1 Evolution des techniques

- Le CNRVC a mis en place depuis 2018 de façon systématique le séquençage complet des génomes bactériens (WGS, whole-genome sequencing) des souches de *Vibrio* reçues, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires, afin d'enrichir une base de données génomique des vibrions cholériques et des VNC. La présence des gènes cibles pour le diagnostic et la détection des facteurs majeurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. vulnificus*, mais cette technique n'a pas été utilisée jusqu'à fin 2022 pour l'identification et le rendu de résultats en temps réel aux laboratoires en raison des délais d'obtention des séquences. Les données de séquençage ont été utilisées en particulier pour valider les tests de spécificité des dossiers de validation de méthodes des PCR d'identification de différentes espèces de *Vibrio*. Le CNRVC souhaite dans un futur proche réaliser l'identification et le typage des souches de VNC par analyse génomique, après une analyse rapide par spectrométrie de masse.

- Le CNRVC a poursuivi l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) Sirius Bruker Daltonics pour l'identification des différentes espèces de *Vibrio*. La base de données de Bruker (comprenant peu de spectres pour chaque espèce de *Vibrio* isolées en clinique) est utilisée pour l'identification ainsi que la base de données développée par le CNRVC comprenant les spectres de 137 *V. cholerae* O1, 271 *V. cholerae* non-O1/non-O139, 48 *V. parahaemolyticus*, 17 *V. alginolyticus*, 10 *V. fluvialis*, 18 *V. vulnificus*, 4 *Grimontia hollisae*, 4 *V. furnisii*.

- Le CNRVC a poursuivi l'évaluation de microplaques Sensititre™ à façon dessinées pour les *Vibrio* pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices en milieu liquide. Les résultats sont comparés aux méthodes standard de diffusion en milieu gélosé et aux données de génomique.

- Le CNRVC poursuit le développement d'une méthode de PCR en temps réel (qPCR) pour la détection et la caractérisation des souches de vibrions cholériques dans les prélèvements biologiques (cibles *rfbO1* et *ctxA* par sondes TaqMan ou par SYBR Green).

## 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Le CNRVC 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 CNRVC en 2022.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- Le CNRVC a transféré en 2022 à six laboratoires correspondants (localisés dans des Centres Hospitaliers) 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*.

- Le CNRVC a également participé au transfert de techniques (mise en culture à partir de prélèvements, identification et caractérisation des vibriens par des techniques phénotypiques et moléculaires) vers des pays étrangers (n = 4), dans le cadre de la surveillance du choléra (Afrique, Proche-Orient, Europe de l'Est), par le biais d'échanges de courriers électroniques ou de conférences en ligne.

## 2.4 Collections de matériel biologique

Le CNRVC dispose d'une collection de 696 souches d'origine clinique isolées de cas d'infections à *Vibrio* diagnostiqués sur le territoire français (métropole et Outre-Mer) depuis 1975 et 2170 souches d'origine alimentaire, environnementale et animale. Ces dernières souches ont été étudiées au CNRVC dans le cadre de l'application de la Note de service DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255 du 28 octobre 2004.

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNRVC sont présentées en *Annexe 1*. Aucune évolution de l'organisation des collections n'est à signaler depuis le début du dernier mandat.

En 2022, trois souches ont été envoyées à un laboratoire hospitalier français pour des contrôles de milieux de culture.

## 2.5 Activités d'expertises

**Tableau 1 : Nombre de souches ou prélèvements français réceptionnés au CNRVC et leur provenance**

Origine géographique de l'expéditeur	Provenance (nombre)	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM/Plateaux techniques (30)	16	81	97
	CHU/CH (24)	20	20	40
Outre-Mer	CHU/CH (2)	2	5	7
Total		38	106 <sup>#</sup>	144

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CHU : centres hospitaliers universitaires ; CH : centres hospitaliers

<sup>#</sup> Deux souches n'appartenaient pas au genre *Vibrio*

**Le délai moyen de restitution de résultats du CNRVC 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, conforme à l'objectif des 6 jours annoncés par le CNRVC sur son site internet. Les résultats rendus hors délais concernaient les souches dont l'identification était liée au séquençage de produits PCR (*V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *G. hollisae*, *V. plantisponsor*, *V. navarrensis*, *Aeromonas*).

L'analyse des prélèvements ne faisant pas partie des missions du CNRVC, il n'y a pas d'engagement sur les délais de rendu de résultats. Le délai moyen de rendu était de 7 jours ouvrés.

**Tableau 2 : Nombre de souches ou prélèvements collectés à l'étranger réceptionnés pour appui au diagnostic (demande initiée ou soutenue par l'OMS)**

Origine écologique	Prélèvements	Souches	Total échantillons
Clinique	18	32	50
Environnementale	-	31	31
Total	18	63	81

Pays expéditeurs : République Démocratique du Congo, Sud-Soudan, Bénin, Ukraine, Jordanie

**Niveau de caractérisation réalisé sur les souches isolées de cas français** : voir **Tableau 3** page suivante. Les méthodes appliquées à l'étude des souches et prélèvements sont détaillées en *Annexe 2* de ce document.

**Tableau 3. Niveau de caractérisation réalisé sur les souches isolées de cas français étudiées au CNRVC en 2022**

Espèce (nombre)	Id. bioch.	Id. mol. PCR	Id. mol. <i>rrs</i> / <i>rpoB</i>	Séro-agglutination	PCR gènes pathogénicité	PCR clones pandémiques	WGS*	Analyse séquence des gènes identification/pathogénicité/typage <i>in silico</i> sur données WGS (nombre souches positives)	ATB Diffusion & Sensititre	Id. MALDI-TOF**
<i>V. parahaemolyticus</i> (38)	38	38	-	2	76	6	38	<i>r72H</i> (38) ; <i>tdh</i> (3) ; <i>trh</i> (19) ; <i>tdh</i> + <i>trh</i> (8) ; T3SS1 (38) ; T3SS2 (3) ; <i>orf8</i> (2) ; <i>toxRS</i> (3) ; MLST	38	5
<i>V. cholerae</i> (54)	54	54	-	54	108	-	54	ISR (54) ; <i>hlyA</i> (54) ; <i>st/sm</i> (3) ; <i>chxA</i> (17) ; <i>rfbO1</i> (6) ; <i>rstR</i> El Tor (6) ; <i>tcpA</i> El Tor (6) ; <i>hlyA</i> El Tor (6) ; <i>wbeT</i> : recherche mutation Inaba pour ElTor (0) ; MLST ; sérogroupage	54	5
<i>V. alginolyticus</i> (10)	10	10	-	-	10	-	10	collagénase (10)	10	2
<i>V. fluvialis</i> (7)	7	-	7	-	-	-	7	-	7	2
<i>V. vulnificus</i> (1)	1	1	-	-	-	-	1	<i>hly</i> (1)	1	-
Autres <i>Vibrio</i> (4)	4	-	4	-	-	-	4	-	4	-
Autres genres (4)	4	-	4	-	-	-	-	-	3	-

Abréviations : Id., identification ; bioch., biochimique ; mol., moléculaire (PCR d'espèce ou amplification et séquençage *rrs* (16S) et *rpoB*) ; \* le séquençage WGS n'a pas été utilisé à des fins d'identification, mais pour la recherche de gènes cibles de PCR ou autres facteurs de pathogénicité et le typage ; \*\* en cours pour les souches isolées en 2022, le CNRVC souhaite valider la méthode MALDI-TOF pour l'identification des souches de *Vibrio* à partir de 2023, en utilisant une base de données IVD (in vitro diagnostic) et non pas la base RUO (Research Use Only) utilisée jusque-là. Les souches isolées en 2022 seront utilisées pour valider la méthode.

- Identification biochimique : méthodes de bactériologie classique, caractères morphologiques, biochimiques et cultureux.
- Identification moléculaire : PCR spécifiques d'espèces, ou amplification des gènes *rrs/rpoB*, séquençage Sanger des produits amplifiés et Blast sur des bases de données publiques (NCBI).
- Séro-agglutination : détermination du sérotype (O1 ou O139) pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées, du sérotype (Inaba, Ogawa) pour les *V. cholerae* O1, recherche des clones pandémiques par détermination des antigènes somatiques (O) et capsulaires (K) pour *V. parahaemolyticus*.
- PCR gènes pathogénicité majeurs : recherche par PCR des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs pour les souches des espèces *V. cholerae* (gènes *ctxA* et *ctxB*) et *V. parahaemolyticus/V. alginolyticus* (gènes *tdh* et *trh*).
- PCR clones pandémiques : recherche des gènes associés au potentiel pandémique des souches de *V. parahaemolyticus* *tdh+*, *trh-* (*orf8*, *toxRS*).
- Séquençage des produits d'amplification ou recherche des séquences *in silico* après séquençage complet du génome pour des gènes spécifiques de biotype et facteurs de pathogénicité chez *V. cholerae*, hémolysines et autres facteurs de pathogénicité chez *V. parahaemolyticus*.
- Réalisation d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé et par mesure de la CMI par Sensititre
- Identification MALDI-TOF : identification par spectrométrie de masse sur appareil Sirius Bruker Daltonics, utilisation de la base de données RUO (Research Use Only).

## 2.6 Activités de séquençage

Le CNRVC a réalisé du séquençage WGS et Sanger au cours de l'année 2022. Un séquençage WGS a été effectué sur la totalité des 114 souches de *Vibrio* spp. expertisées en 2022 : 104 souches reçues au CNRVC et confirmées comme appartenant au genre *Vibrio* et 10 souches isolées au CNRVC à partir des prélèvements reçus.

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Plateforme P2M de l'Institut Pasteur. Séquenceurs NextSeq 500 Illumina (utilisation du kit Nextera XT pour la préparation des librairies).

### Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Expertise interne au CNRVC et externe (plateforme P2M et hub de bioinformatique de l'Institut Pasteur). Trimming des reads et assemblage <i>de novo</i> réalisé par P2M avec le programme fq2dna (A. Criuscolo) Analyse des FASTA, recherche de gènes de résistance, recherche de gènes de virulence, Phylogénie réalisé en interne au CNRVC par outils open source (Resfinder, Blast, Snippy, Gubbins, RAxML) et outils maison (pourcentage d'identité de gènes, MLST ...)

### Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

<input type="checkbox"/> NON	
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Investigations intervenues dans le cadre de la surveillance pour les cas de choléra isolés sur le territoire français. Seule l'analyse génomique peut confirmer l'appartenance d'une souche à la lignée <i>Vibrio cholerae</i> El Tor responsable de la 7ème pandémie (lignée nommée 7PET). Les souches de <i>V. cholerae</i> O1 toxigène isolées ont été incluses dans un arbre phylogénétique de plus de 1200 souches représentatives de la lignée 7PET. Cela a permis la confirmation de leur appartenance à la lignée 7PET ainsi que de confirmer ou déterminer la provenance géographique de la souche.

### Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

-	<p>Analyse bio-informatique effectuée en complément d'analyses phénotypiques (caractères biochimiques et culturels, séro-agglutination, résistance aux antimicrobiens) et moléculaires (PCR spécifique d'espèce, gènes de toxine cholérique) pour les souches toxigènes de <i>Vibrio cholerae</i> O1 (souches responsables du choléra)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o MLST (ST69 et plus rarement ST515 pour <i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor)</li> <li>o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination O1 ou O139)</li> <li>o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination Inaba ou Ogawa avec recherche de mutation du gène <i>wbeT</i>)</li> <li>o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques) : recherche de gènes de résistance acquis et mutations conférant une résistance aux quinolones et aux nitrofuranes ainsi que pour la réversion de la résistance aux polymyxines.</li> <li>o Confirmation des facteurs de virulence et typage : recherche gène <i>ctxA</i>, typage <i>ctxB</i> par analyse de séquence</li> </ul> <p>Analyse phylogénétique : confirmation de l'appartenance à la lignée 7PET, confirmation ou détermination de la provenance géographique de la souche comme mentionné au point précédent. Importance des collaborations internationales du CNRVC afin de disposer de souches provenant de différents pays pour pouvoir construire un arbre phylogénétique robuste.</p> <p>Analyse bio-informatique effectuée en complément pour les vibrions non cholériques (VNC) comprenant notamment pour les souches de <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139, <i>V. parahaemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i>, <i>V. fluvialis</i>, <i>V. alginolyticus</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>o MLST (<i>V. cholerae</i>, <i>V. parahaemolyticus</i>)</li> <li>o Prédiction du sérotype (<i>V. cholerae</i>, base de données des séquences des différents sérotypes)</li> <li>o Prédiction du sérotype (<i>V. parahaemolyticus</i> : détermination de l'appartenance au groupe O3:K6)</li> <li>o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques)</li> <li>o Recherche de gènes de virulence accessoires ou séquence de gènes : <i>hlyA</i>, <i>ctxA</i>, <i>st/sm</i> pour <i>V. cholerae</i> ; systèmes T3SS1 et T3SS2, gènes codant les hémolysines <i>tdh</i> et <i>trh</i> pour <i>V. parahaemolyticus</i>.</li> </ul>
---	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

#### Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Aucune épidémie n'a été investiguée.

#### Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Toutes les souches de *Vibrio* spp. reçues ou isolées à partir des prélèvements reçus ont été séquencées.

#### Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Les fichiers FASTQ et FASTA sont conservés dans la base de données génomique du CNRVC qui est localisée dans Gaïa, un serveur sécurisé et sauvegardé de l'Institut Pasteur.

## 2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Une fois que des publications scientifiques décrivant ces souches sont soumises pour publication, les fichiers FASTQ sont déposés dans l'European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) et les fichiers FASTA annotés (pour les plasmides ou les génomes circularisés) dans GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) avec partage immédiat. Les métadonnées pour chaque génome sont présentes dans une table supplémentaire de l'article.

Les génomes non encore publiés peuvent être mis à disposition dans le cadre d'investigations d'épidémies internationales ou lors de collaborations scientifiques après discussion avec les responsables du CNRVC.

## 3. Activités de surveillance

- **Sept cas de choléra** ont été déclarés sur le territoire français en 2022, six en métropole et un dans un DOM. Six cas étaient associés à des souches du séro groupe O1 de la lignée 7PET, un cas a été diagnostiqué sur la base d'analyses PCR sur échantillon de selles, ainsi que sur les données cliniques et épidémiologiques. Parmi ces cas, quatre étaient des cas autochtones, sans notion de voyage. Trois d'entre eux, épidémiologiquement liés (toxi-infection alimentaire collective, TIAC), ont été associés à la consommation d'aliments importés d'une zone d'épidémie. L'origine d'un autre cas n'a pas été identifiée sur la base de l'interrogatoire du patient. Le séquençage et l'analyse phylogénétique ont cependant permis d'identifier l'origine probable de la souche. A noter que pour la première fois depuis 20 ans, les cas dont l'origine a pu être identifiée n'ont pas été importés d'Asie, mais d'Afrique centrale (cinq cas) et du Moyen-Orient (un cas).

- **105 cas cliniques d'infections à VNC** ont été confirmés, se manifestant majoritairement par des gastroentérites (85% des cas). Parmi les cas renseignés et quelle que soit la manifestation clinique, un lien avec le milieu marin a été établi dans 75% des cas, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer. Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont restées prépondérantes, avec une augmentation importante des cas d'infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139 par rapport à 2021, la majorité d'entre eux (65%) étant importés. Sept cas d'infections à *V. fluvialis* ont été diagnostiqués, confirmant l'émergence de cette espèce comme agent étiologique de gastroentérites. En mai 2022, une souche de *V. cholerae* O1 non toxigène, associée à un tableau clinique et des données épidémiologiques compatibles avec un cas de choléra, avait été signalée à Santé publique France (SpF). Cette souche alors classée comme une souche atypique de vibron cholérique a été reclassée comme VNC suite à l'ajout par SpF du caractère toxigène dans la définition de l'agent du choléra (« *Vibrio cholerae* des sérogroupes O1 et O139 toxigènes ») dans notre pays.

### 3.1 Description du réseau de partenaires

#### ○ Description des partenaires, répartition par type d'activités

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

**Tableau 4 : Échantillons français d'origine clinique, type de laboratoires expéditeurs**

Type de laboratoire	Nombre d'échantillons reçus 2022	Nombre de correspondants 2022
CH/CHU	47	26
LBM	97	30
Total	144	56

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CHU : centre hospitalier universitaire ; CH : centre hospitalier

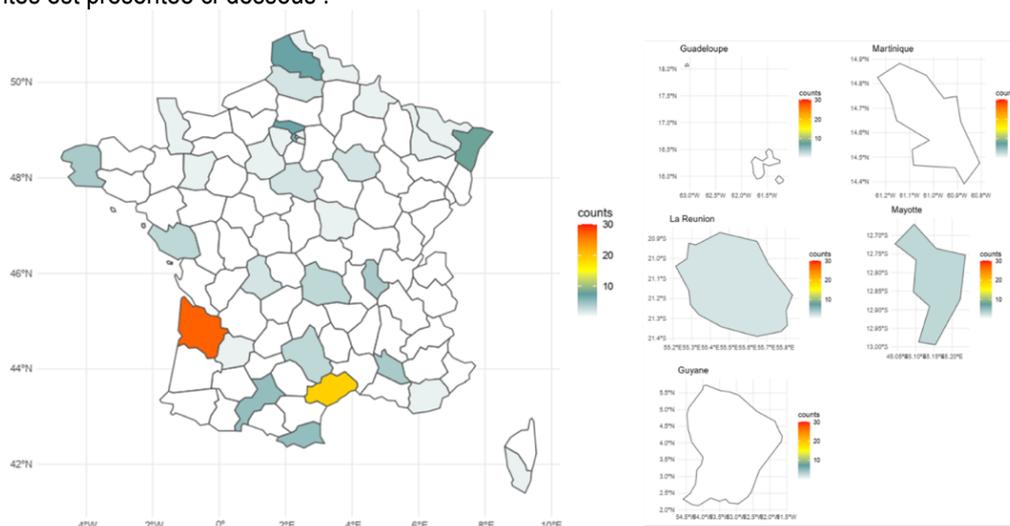
#### ○ Répartition géographique, estimation de la couverture du réseau, évolution du réseau

Le CNRVC collabore avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire, avec un nombre de correspondants nettement plus élevé dans les régions côtières, en particulier sur la façade Atlantique. Cette tendance avait été observée dès 1995. Le nombre de correspondants a évolué de façon notable suite à (i) la sensibilisation faite par le CNRVC, qui 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 sur la base du volontariat (ii) l'évolution récente des méthodes de diagnostic. Les PCR multiplex syndromiques et la spectrométrie de masse permettent de s'orienter plus facilement sur un diagnostic *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

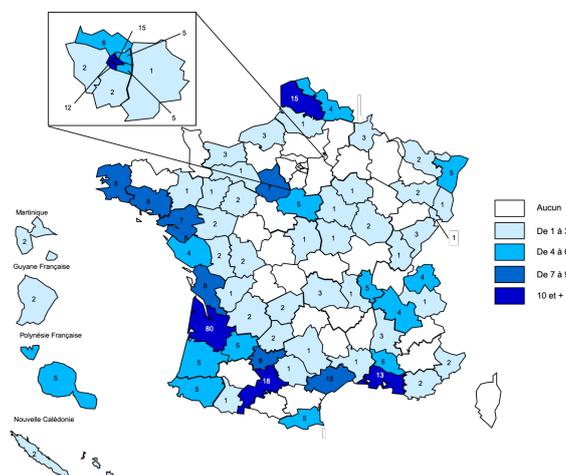
peu symptomatiques, non hospitalisés. Ces techniques présentent en effet l'avantage d'attirer l'attention des biologistes sur ces agents pathogènes, et le CNRVC est régulièrement contacté par des professionnels de santé, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR, ce qui représente une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance.

Le nombre d'échantillons, souches isolées et prélèvements envoyés au CNRVC a augmenté de façon significative entre 2017 et 2021 et le CNRVC avait eu des échanges avec 154 correspondants plus spécifiquement des laboratoires situés dans des régions côtières, départements du Pas-de-Calais, Morbihan, Hérault, Landes. En 2022, 56 correspondants ont été recensés dont 29 nouveaux. A noter que les souches isolées dans le département de la Gironde, qui rapporte au CNRVC le plus grand nombre de cas, sont envoyées quasi exclusivement par un laboratoire de biologie multi-sites.

La répartition géographique des échantillons reçus au CNRVC en 2022 et la comparaison avec les années précédentes est présentée ci-dessous :



**Nombre d'échantillons d'origine humaine reçus au CNRVC par département en 2022**



**Nombre d'échantillons d'origine humaine reçus au CNRVC par département, 2017- 2021**

### ○ Définition de l'échantillon de souches isolées

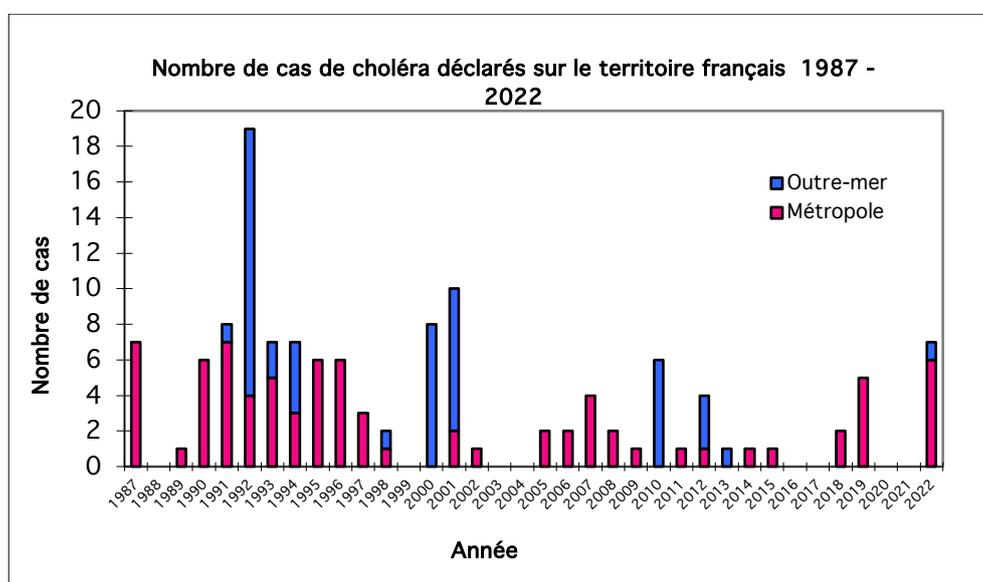
Les souches ont été isolées de sujets ayant présenté des symptômes en rapport avec la présence d'un vibron dans le prélèvement, dont la pathologie s'est déclarée sur un territoire français, et pour lesquels l'identification du germe responsable a été effectuée ou confirmée par le CNRVC. Les cas pour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

### ○ **Vibron cholérique**

Le choléra est une infection bactérienne à *V. cholerae* O1 ou O139, toxigène, appartenant, pour le sérotype O1 à la lignée 7PET responsable de la pandémie actuelle. L'infection s'acquiert après ingestion d'un inoculum important de vibrions via de l'eau ou des aliments contaminés et peut se manifester sous une forme sévère, diarrhées aqueuses aiguës, fréquentes et abondantes, vomissements, conduisant rapidement à une déshydratation entraînant la mort dans 25 à 50% des cas en l'absence de traitement ou en cas de traitement inadapté. Cependant moins de 10% des cas présentent ces symptômes typiques et les cas peu symptomatiques mimant une gastroentérite banale représentent la forme la plus fréquente de l'infection. Les cas de choléra sont généralement associés à une notion de voyage en zone d'endémie ou d'épidémie cholérique. La possibilité d'évolution rapide des cas vers une forme clinique grave justifie l'investigation systématique autour des cas.

*Evolution du nombre de cas d'infections* : aucun cas de choléra n'avait été rapporté en 2020 et 2021, sept cas ont été rapportés en 2022 dont six en métropole, ce qui n'avait pas été observé depuis 1996. Cela peut être le reflet de la dégradation de la situation mondiale du choléra, en recrudescence depuis 2022, également d'une source commune d'infection pour trois cas.



*Origines géographiques des lieux de contamination* : pour la première fois depuis 20 ans, les cas dont l'origine a pu être identifiée n'ont pas été importés d'Asie, mais d'Afrique centrale (cinq cas) et du Moyen-Orient (un cas). L'origine d'un cas autochtone n'a pas été identifiée par l'interrogatoire du patient mais les analyses génomiques ont orienté sur une origine géographique probable de la souche. Le dernier cas autochtone en France avait été décrit en 1996 (Infuso *et al.* Presse Med. 1998).

*Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections* : six des sept cas rapportés avaient un tableau clinique caractéristique avec syndromes digestifs de type cholérique et vomissements. Seul un cas un cas était peu symptomatique, pouvant évoquer une gastroentérite banale. Cinq cas ont été hospitalisés dont deux avec admission en réanimation ; un cas non hospitalisé a fait un passage aux urgences. L'évolution a été favorable pour tous les cas.

Les cas rapportés concernaient des personnes sans antécédents, plutôt jeunes (six femmes et un homme, patients âgés de 36 à 57 ans, âge médian 41 ans). Il n'y a pas eu d'autre cas documentés parmi les co-exposés, certains d'entre eux ayant cependant signalé des symptômes compatibles mais non confirmés par des investigations supplémentaires. Il n'a pas été rapporté de cas de transmission secondaire dans l'entourage des cas.

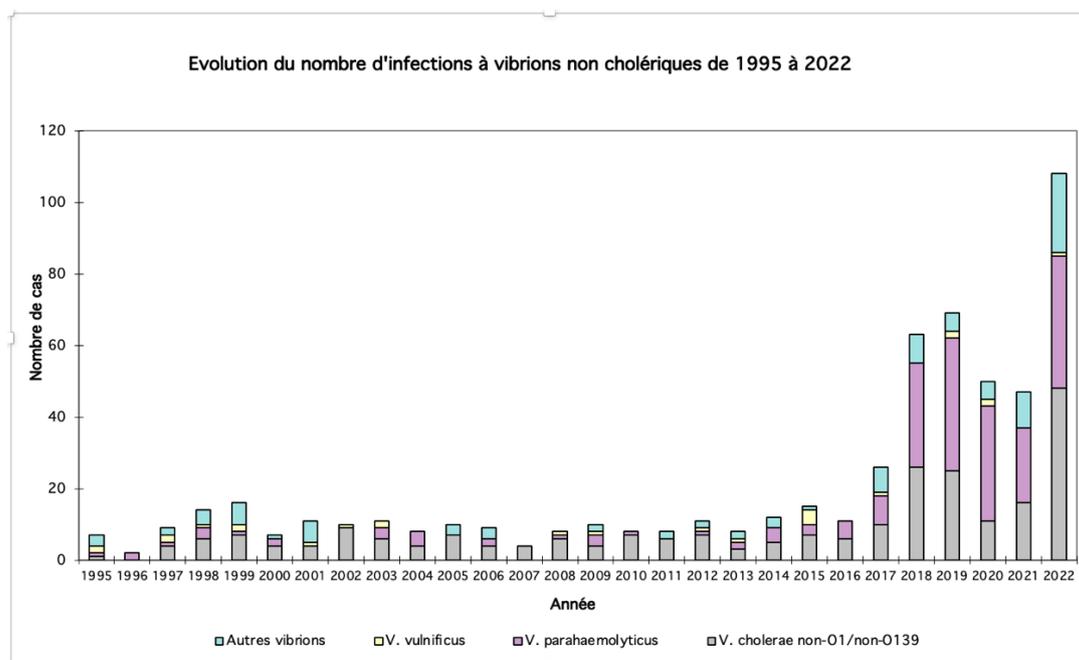
Les vibrions cholériques étaient des souches de *V. cholerae* sérotype O1, sérotype Ogawa pour les six souches

isolées, porteuses des gènes de la toxine cholérique et appartenant à la lignées 7PET. Un cas pour lequel la souche n'a pas été isolée a été confirmé sur la base d'analyses PCR sur échantillon de selles (*V. cholerae* O1 toxinogène), et sur la base d'un tableau clinique sévère très évocateur et d'informations épidémiologiques compatibles (notion de voyage dans un pays épidémique). Les données de séquençage (WGS) et l'analyse phylogénétique ont montré que les souches provenant d'Afrique centrale appartenaient à la sous-lignée AFR12 (anciennement T12) circulant dans cette région depuis 2009.

### ○ Vibrions non cholériques

Les vibrions non cholériques (VNC) d'intérêt médical sont à l'origine d'infections sporadiques, gastro-entérites, infections suppuratives, bactériémies, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). La consommation de produits de la mer et le contact direct avec le milieu marin sont les deux voies majeures de contamination. Les voyages dans les pays où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement peuvent faire défaut ont été identifiés comme un risque supplémentaire d'exposition pour les infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139, cette espèce bactérienne pouvant transiter par les eaux usées d'origine domestique, utilisées parfois pour l'irrigation.

*Evolution du nombre de cas d'infections* : 105 cas d'infections à vibrions non cholériques ont été confirmés ou diagnostiqués au CNRVC en 2022, confirmant l'augmentation du nombre de cas observée depuis 2017. Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.



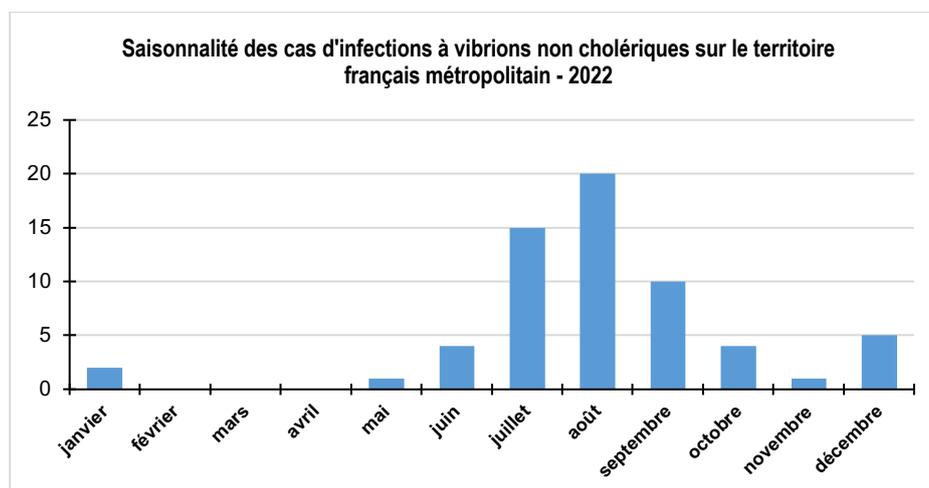
*Origines géographiques des lieux de contamination* : 61% des cas d'infections ont été contractés sur le territoire français, 39% à l'étranger. Parmi les cas d'infections contractés à l'étranger, 75% étaient dus à l'espèce *V. cholerae*, représentant 65% de l'ensemble des cas d'infections dus à cette espèce.

*Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections* :

L'âge médian des cas d'infection était de 57 ans, avec des extrêmes de 4 mois et 98 ans. Les cas étaient majoritairement des femmes (57%).

- Parmi les terrains prédisposants ont été considérés : âges extrêmes, antécédents de pathologies digestives, immunosuppression, traitement anti-acide, diabète, plaies préexistantes, otites chroniques.
- L'espèce *V. cholerae* a été associée aux manifestations les plus sévères, avec bactériémies secondaires à une gastroentérite ou bactériémies primaires. La voie de contamination a été associée à la consommation de produits de la mer, 80% des patients ayant présenté une telle évolution avaient un terrain favorisant.

- Les espèces *V. alginolyticus* et *V. vulnificus* ont également été à l'origine de bactériémies faisant suite à des surinfections de plaies après contact avec le milieu marin. Tous les patients présentaient des terrains favorisants.
- 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 CTXφ (*tcpA*). Trois souches possédaient le gène *stn*, codant une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*, 17 le gène *chxA*, codant la cholix-toxine, les deux étant considérées comme des facteurs de pathogénicité de l'espèce. Il n'a pas été observé cependant de corrélation entre la présence de ces gènes de toxines et le type (intestinal ou extra-intestinal) ou la gravité des infections. Toutes les souches possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la quasi-totalité des souches d'origine clinique et environnementale.
- La majorité (83,8%) des souches de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines TDH et/ou TRH, classiquement associées au pouvoir pathogène de l'espèce. A noter cependant que plus de 10% des souches à l'origine de diarrhées aiguës ne possédaient pas les gènes des hémolysines TDH et TRH. Trois souches importées appartenaient aux clones pandémiques de l'espèce.
- L'espèce *V. fluvialis* a été isolée, exclusivement associée à des gastroentérites.
- Les espèces peu courantes (*V. navarrensis*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *G. hollisae* (anciennement *Vibrio*) sont des souches d'origine marine qui ont déjà été associées à des pathologies chez l'homme. Le contexte de l'isolement de la souche appartenant à l'espèce *V. plantisponsor/diazotrophicus* n'était pas en faveur d'un rôle étiologique de cette bactérie dans la pathologie du patient.
- La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année (juin à octobre, avec un pic très marqué en juillet et août).



### 3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

- **Vibrio cholerae O1 toxigènes**

Les souches isolées en France en 2022 appartiennent à la lignée 7PET et à la sous-lignée AFR12 et présentent les résistances habituellement observées chez cette lignée (cf. tableau 6). Il faut cependant rappeler que les souches de certaines sous-lignées présentent de nombreuses résistances aux antibiotiques (tétracyclines, fluoroquinolones, cotrimoxazole, azithromycine) et que d'autres lignées (souche circulante au Yémen entre 2016 et 2018) sont multisensibles. Un antibiogramme est donc absolument nécessaire pour déterminer la sensibilité des souches.

**Tableau 5 - Résistance aux antibiotiques des six souches cliniques de *V. cholerae* O1 toxigènes isolées en France en 2022**

Antibiotique	Souches de <i>V. cholerae</i> O1 résistantes aux antibiotiques	
	Nombre (%)	Résistome
Ampicilline**	0	
Céfotaxime*	0	
Péfloxacin*	6 (100)	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)
Ciprofloxacine (CMI)*	6 (100)	<i>gyrA</i> (S83I), <i>parC</i> (S85L)
Erythromycine*	0	
Azithromycine*	0	
Triméthoprim**	6 (100)	<i>dfrA1</i>
Triméthoprim-sulfaméthoxazole*	0	
Tétracycline*	0	
Nitrofuranes*	6 (100)	<i>VC0175</i> (R169C), <i>VCA0637</i> (Q5stop)
Colistine (CMI)**	6 (100)	Résistance naturelle

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu gélosé (la corrélation avec la méthode sensittre (CMI) a été réalisée pour tous les antibiogrammes). Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine et à la colistine est effectué sur la détermination de la CMI.

\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022

\*\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022 pour les entérobactérales.

○ **Vibrions non cholériques**

Les souches de VNC étant des souches environnementales, elles restent globalement très sensibles aux antibiotiques. Les résistances observées phénotypiquement sont toutes corrélées avec le résistome pour les souches de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*. La résistance aux antibiotiques des principales espèces de VNC isolées en 2022 est présentée dans le tableau 7.

**Tableau 6 - Résistance aux antibiotiques des principales espèces de souches cliniques de VNC isolées en France en 2022**

Antibiotique	Nombre de souches résistantes				
	<i>V. cholerae</i> <sup>#</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>
	48 souches	37 souches	10 souches	7 souches	Une souche
Ampicilline**	5	25 (12) <sup>£</sup>	10	5 (2) <sup>£</sup>	0
Céfalotine	0	0	0	7***	0
Céfotaxime*	0	0	0	4 <sup>§</sup>	0
Péfloxaciné*	10	0	0	0	0
Ciprofloxacine (CMI)*	9	0	0	0	0
Erythromycine*	0	0	0	0	0
Azithromycine*	0	0	0	0	0
Triméthoprime-sulfaméthoxazole*	10	0	0	0	0
Tétracycline*	3	0	0	0	0

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu gélosé (la corrélation avec la méthode Sensititre (CMI) a été réalisée pour certains antibiogrammes). Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine et à la colistine est effectué sur la détermination de la CMI.

\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022

\*\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022 pour les entérobactériales

\*\*\* pas de diamètre/CMI défini dans le CASFM-EUCAST 2022 mais absence de zone d'inhibition autour du disque

§ résistance si CMI > 0,25 mg/L (les CMI critiques du CASFM EUCAST 2022 ne s'appliquent pas pour *V. fluvialis*)

£ le nombre de souches présentant un diamètre proche du diamètre critique est indiqué entre parenthèses

# incluant 47 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 et une souche de *V. cholerae* O1 non toxigène

### ***V. parahaemolyticus***

Les 37 souches présentent une résistance modérée à l'ampicilline en lien avec la présence d'un gène de bêta-lactamase de type *bla<sub>CARB</sub>*. Toutes les souches restent sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole (triméthoprime-sulfaméthoxazole) ainsi qu'aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G). Ce phénotype de résistance reste identique aux années précédentes.

### ***V. cholerae* (47 souches sérogroupes non-O1/non-O139, une souche de *V. cholerae* O1 non toxigène)**

Sur les 14 souches d'origine française, uniquement trois souches présentent une résistance isolée au cotrimoxazole. Les 33 souches provenant de l'étranger présentent quant à elles plus de résistances. Parmi celles-ci, neuf souches sont résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 0,5 et 4 mg/L) via des mutations dans *gyrA* et *parC*. Dix souches sont résistantes au cotrimoxazole en lien avec une combinaison de gènes *dfrA* et *sul* (dont cinq également résistantes aux fluoroquinolones), trois sont résistantes aux tétracyclines en lien avec des gènes *tet* (dont deux résistantes aux fluoroquinolones) et cinq souches sont résistantes à l'ampicilline (gènes de type *bla<sub>CARB</sub>*). Au total, 4 souches sont multi-résistantes (résistance à plus de trois familles d'antibiotique). Cependant la totalité des souches restent sensibles à l'azithromycine. A noter que 20 souches au total portent des gènes *qnrVc* entraînant un diamètre proche du diamètre critique pour la péfloxaciné mais pas de résistance à la ciprofloxacine. Il n'a pas été observé d'évolution de la résistance aux antibiotiques d'intérêt ces dernières années malgré l'augmentation importante de souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en 2022 (cf. Tableau 8).

**Tableau 7 - Evolution de la résistance aux antibiotiques d'intérêt clinique des souches cliniques de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en France entre 2018 et 2022**

Antibiotique	Nombre (pourcentage) de souches résistantes				
	2018 26 souches	2019 24 souches	2020 11 souches	2021 16 souches	2022 48 souches
Ampicilline**	0	2 (8)	0	2 (13)	5 (10)
Céfotaxime*	0	0	0	0	0
Acide nalidixique***	8 (31)	5 (21)	1 (9)	4 (25)	10 (21)
Ciprofloxacine*	3 (12)	2 (8)	0	4 (25)	9 (19)
Azithromycine*	0	0	0	0	0
Triméthoprime-Sulfaméthoxazole*	4 (15)	4 (17)	1 (9)	4 (25)	6 (13)
Tétracycline*	4 (15)	3 (13)	1 (9)	3 (19)	3 (6)

Le rendu des résultats est basé sur la méthode de diffusion en milieu gélosé (la corrélation avec la méthode Sensititre (CMI) a été réalisée pour certains antibiogrammes). Le rendu de la sensibilité à la ciprofloxacine est effectué sur la détermination de la CMI.

\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022

\*\* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2022 pour les enterobactérales

\*\*\* le dépistage de la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones était effectué avant 2022 à l'aide du disque d'acide nalidixique, ce sont donc ces résultats qui sont présentés pour la comparaison de l'évolution de la résistance

### ***V. fluvialis***

Les sept souches isolées sont résistantes aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (C1G) (absence de zone d'inhibition autour du disque). Pour les C3G, nous observons des CMI comprises entre <0.006 et 1 mg/L (à noter qu'aucun diamètre/CMI critique n'est défini pour les C3G dans le CASFM EUCAST 2022 pour *V. fluvialis*). Toutes les souches restent sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole. Ce phénotype de résistance reste identique aux années précédentes.

### ***V. alginolyticus***

Les 10 souches isolées sont résistantes à l'ampicilline en lien avec un gène de bêta-lactamase de type *bla*<sub>CARB</sub>. Toutes les souches restent sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole ainsi qu'aux C3G. Ce phénotype de résistance reste identique aux années précédentes.

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNRVC communique avec Santé publique France (SpF), Direction des maladies infectieuses, au cas par cas :

- Dès la suspicion ou la confirmation d'un cas de choléra ; des contacts sont alors immédiatement établis entre le CNR et SpF,
- En cas d'évènement inhabituel, augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques, isolement d'un nouvel agent ou modification des voies de contamination, pour les infections à VNC. Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à VNC par le biais d'une fiche de recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques permettant de suivre l'évolution du nombre et des formes cliniques des infections, l'exposition du patient, l'existence d'un terrain prédisposant. Cette fiche d'accompagnement est accessible en ligne sur le site internet du CNR, <https://www.pasteur.fr/fr/file/3052/download>.

Les données du CNRVC concernant les infections à VNC sont communiquées à SpF annuellement, par le biais du rapport d'activité, ou sur demande à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

Le CNRVC peut être amené à communiquer également avec l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) site de Boulogne-sur-Mer qui est LNR *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche, et l'IFREMER, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles.

De même, le CNRVC contribue aux réseaux de surveillance internationaux européens ECDC et EFSA, s'il est sollicité pour le faire, généralement pour l'envoi de données de surveillance.

Le CNRVC est un interlocuteur privilégié de l'OMS sur la thématique choléra, l'Institut Pasteur est membre de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS et le CNRVC est régulièrement sollicité pour une aide au diagnostic et la confirmation d'épidémies sur le plan international.

### 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Surveillance des cas d'infections à VNC de 1995 à 2022 : le CNRVC et SpF ont mené conjointement une 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, a été prolongée sur 2017 puis jusqu'à fin 2022, afin de refléter l'évolution majeure de la courbe épidémiologique. Les données de température (données du REPHY) concernant les périodes étudiées ont été analysées par SpF et confirment les températures élevées enregistrées sur la période 2017-2020.
- Investigation d'un cas de choléra acquis localement diagnostiqué en France en 2022. SpF (Direction des maladies infectieuses), CNRVC, ARS Bretagne.

Les informations épidémiologiques relatives à ce cas, sans voyage récent ni mise en évidence d'un contact international, ne permettaient pas de suspecter un choléra, rare en France métropolitaine et généralement diagnostiqué uniquement chez des patients revenant d'une zone d'endémie. Les analyses de microbiologie et génomique menées au CNRVC ont permis de démontrer que la souche impliquée était un *V. cholerae* O1 appartenant à la lignée responsable de l'actuelle septième pandémie de choléra (7PET), et d'écarter l'hypothèse d'une souche locale d'origine environnementale. Elles ont également montré que la souche était associée à des épidémies récemment documentées indiquant une introduction récente en France. La source de contamination n'a cependant pas pu être identifiée, faisant de ce cas le premier cas autochtone de choléra en France métropolitaine depuis 1996.

- Investigations autour d'une TIAC à vibron cholérique, *V. cholerae* O1 7PET. SpF (Direction des maladies infectieuses), SpF Auvergne Rhône Alpes, ARS-ARA, CNRVC, ANSES.  
Investigations autour de 3 cas co-exposés, sans notion de voyage, avec mise en évidence après interrogatoire des patients d'une source alimentaire probable importée d'Afrique centrale, où sévit une épidémie. Le CNRVC a confirmé l'identification des souches, les analyses phylogénétiques ont confirmé l'origine de la souche. Des coprocultures réalisées au CNRVC pour quatre cas contacts se sont révélées négatives. L'ANSES a été sollicitée pour l'analyse d'aliments suspectés être à l'origine de la contamination.
  
- L'OMS a appuyé les demandes d'expertise microbiologique de trois pays dans un contexte de suspicion de choléra (Sud-Soudan, Ukraine, Jordanie). Le CNRVC a également répondu à la demande de contribution au diagnostic de la République Démocratique du Congo, dans le cadre de son Programme national d'élimination du choléra et des maladies diarrhéiques (PNECHOL-MD) soutenu par l'OMS. L'OMS a également soutenu une demande de séquençage de souches de vibrons cholériques ayant circulé au Bénin en 2021, pour surveiller une éventuelle évolution ou nouvelle introduction dans cette partie de l'Afrique. Le séquençage a montré que les souches appartenaient bien à la sous-lignée AFR12 qui circule en Afrique de l'Ouest et Afrique centrale depuis 2009.  
En 2022, 81 échantillons ont été étudiés au CNRVC en réponse à ces différentes demandes, participant ainsi activement à la surveillance internationale du choléra.
  
- Le CNRVC a répondu en juillet 2022 à une enquête de l'Agence néozélandaise sur la surveillance de *V. parahaemolyticus* isolé de cas humains, coquillages, environnement, suite à une épidémie due à la consommation d'huitres crues. Cette demande a été relayée via l'ANSES et SpF, la direction générale de l'Alimentation (DGAL) et l'IFREMER en étaient également destinataires. Les questions pour le CNRVC concernaient la surveillance des cas, les méthodes d'identification, la mise à disposition des données de séquençage le cas échéant et un avis ou des données permettant d'établir une éventuelle corrélation avec le changement climatique.

## 4. Alertes

---

### Procédures d'alertes de Santé publique France et de la Direction générale de la santé

• **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), SpF et le CNRVC.

- 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 CNRVC ainsi que sur le site de SpF, [https://www.formulaires.service-public.fr/gf/cerfa\\_12197\\_02.do](https://www.formulaires.service-public.fr/gf/cerfa_12197_02.do). La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNRVC.

- L'isolement possible d'une souche de vibron cholérique peut être signalé au CNRVC soit directement par le microbiologiste ayant fait un diagnostic présomptif, soit par SpF (Direction des maladies infectieuses), agence elle-même alertée par l'intermédiaire des Agences Régionales de Santé (ARS). Dans tous les cas, dès la suspicion d'un cas de choléra, des contacts sont immédiatement établis entre le CNR et SpF. Les ARS sont responsables de l'enquête et du traçage des cas, en collaboration avec les équipes de cliniciens, éventuellement du CNRVC, et l'appui de SpF et des Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire) si nécessaire. La confirmation microbiologique d'un cas de choléra sur le territoire français est faite par le CNRVC, elle fait l'objet d'une déclaration par le CNRVC à SpF (Direction des maladies infectieuses) et à la Direction générale de la santé (DGS), Centre Opérationnel de Régulation et de Réponse aux Urgences Sanitaires et Sociales (CORRUSS), par fax 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 VNC**, le CNRVC informe systématiquement SpF, 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, cas d'infections à *V. vulnificus*, ...).

### Évènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année 2022.

• **Vingt-et-un signalements** pour suspicion de cas de choléra ont été faits en 2022 par des biologistes aux ARS, qui ont elles-mêmes alerté SpF et le CNRVC. Les ARS concernées étaient :

- ARS Auvergne Rhône Alpes
- ARS Bretagne
- ARS Grand Est
- ARS Hauts de France
- ARS Ile de France
- ARS Mayotte
- ARS Nouvelle Aquitaine
- ARS Occitanie
- ARS Pays de Loire
- ARS la Réunion.

- **Sept cas de choléra ont été confirmés et ont fait l'objet d'un signalement** du CNRVC vers la DGS et SpF.

- Trois cas importés de pays d'épidémies (Afrique Centre-Ouest et Moyen-Orient)
- Quatre cas autochtones sans notion de voyage :
  - Un cas isolé, sans mise en évidence de l'origine de contamination
  - Trois cas liés (TIAC à *Vibrio cholerae* O1 7PET) associés à la consommation d'aliments importés d'un

pays épidémique.

- Les autres signalements n'ont pas été confirmés comme cas de choléra sur la base des analyses microbiologiques des souches ou prélèvements de selles reçus au CNRVC.

• **L'isolement d'une souche atypique de vibron cholérique**, *V. cholerae* sérotype O1 non toxigène et n'appartenant pas à la lignée 7PET, a fait l'objet d'un signalement du CNRVC vers SpF et la DGS. Le cas était associé à une suspicion de choléra sur la base de la clinique (diarrhées) et d'un contexte épidémiologique compatible (retour d'une zone d'endémie ou d'épidémie cholérique). Il a été signalé comme cas d'infection à *V. cholerae* O1 atypique, précisant qu'il ne s'agissait pas d'un cas de choléra et qu'il n'y avait pas de potentiel épidémique connu.

Si l'on s'en tient à la définition d'un vibron cholérique en France, *V. cholerae* O1 ou O139, ce cas, associé à une clinique et des données épidémiologiques compatibles (retour d'une zone d'épidémie ou d'endémie cholérique) devrait être déclaré comme un cas de choléra. Or l'existence de telles souches a déjà été rapportée sur le territoire français et est signalée depuis de nombreuses années dans plusieurs régions du monde. Déclarer comme cas de choléra des gastroentérites associées à des souches n'appartenant pas à la lignée 7PET et n'ayant pas de potentiel épidémique génère des alertes et des investigations inutiles. L'évolution des connaissances des agents du choléra en particulier grâce à la génomique montre clairement qu'il est nécessaire de revoir les critères de notification des cas de choléra et de valider avec les autorités de santé et au niveau international une définition plus précise de l'agent du choléra qui ne peut plus se limiter à la seule appartenance aux sérotypes O1 et O139, mais doit inclure à minima la présence des gènes de la toxine cholérique, et idéalement l'appartenance à la lignée 7PET.

Une **révision des critères de notification par le CNRVC des cas de choléra**, incluant la présence des gènes de toxine dans la définition d'un vibron cholérique, a été faite en mai 2022 sur le site de SpF qui mentionne désormais « Toxi-infection digestive, le choléra est une maladie à déclaration obligatoire due à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par les bacilles *Vibrio cholerae* des sérotypes O1 et O139 toxigènes ».

Le CNRVC a été sollicité par SpF pour la rédaction d'une **alerte choléra dans les Antilles**, suite à la résurgence du choléra en Haïti en octobre 2022, exposant tout particulièrement les territoires français des Antilles (TFA) au risque de choléra, tant du fait de leur proximité géographique, de leurs échanges de population avec Haïti que par le risque de propagation localement. Une communication a été envoyée à destination des laboratoires par SpF, les ARS Guadeloupe, Saint-Martin, Saint-Barthélemy, et le CNRVC.

## 5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

---

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

#### Formations

Des enseignements sur le choléra et infections à VNC sont dispensés à l'attention de professionnels de santé, médecins, pharmaciens, vétérinaires, scientifiques et ingénieurs souhaitant se spécialiser dans les relations entre les agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement.

- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, « Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque », "Le Choléra, épidémiologie et prévention », Institut Pasteur (**M-L Quilici**, 2 h), 1<sup>er</sup> février 2022.

- Cours Master 2, Université Paris, Sorbonne Université, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. « Epidémiologie du Choléra », Faculté de Médecine, Saint-Antoine et Sorbonne Université (**M-L Quilici**, 2h), 22 novembre 2022.

- Cours RESER (Réseau d'Étude et de Surveillance des Pathogènes Émergents), à destination de cadres bactériologistes du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), dans l'objectif de renforcer les capacités de référence de six instituts en Afrique, Madagascar, Cameroun, Côte d'Ivoire, Sénégal, Maroc et Tunisie pour une meilleure détection des maladies bactériennes et de leur émergence.

RESER 4 : Module *Vibrio* et choléra, Institut Pasteur du Maroc, 12 mai 2022 :

8H30-10H. Clinique, épidémiologie et mesures de contrôle du choléra. **M-L Quilici**

10H-11H. Choléra : apport du WGS à la compréhension de la circulation, l'évolution et la résistance aux antibiotiques. **F-X. Weill** (par TEAMS)

11H30-13H. Vibrions non-cholériques dans l'eau et les aliments.

14H30-17H30. TD1 : réalisation des antibiogrammes des *Vibrio*

TD2 : Présentation de la GTFCC, surveillance du choléra, détection, surveillance épidémiologique, mesures de contrôle, nouveau Guide « Ending Cholera 2030 »

- MOOC Waterborne Infectious Diseases - Institut Pasteur, Diplôme Numérique des Maladies Infectieuses de l'Institut Pasteur (DNM2IP), « Le choléra » par **M-L Quilici**, diffusion à partir du 22/03/2022.

Le CNRVC forme des étudiants aux techniques de laboratoire, un stagiaire BTS Bioanalyses et contrôles a été reçu en 2022 pour « Identification de souches de vibrions non cholériques et étude de leur résistance aux antibiotiques », cinq semaines en juin et 8 semaines entre octobre et décembre.

#### Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNRVC

##### *Auprès des partenaires*

• SpF, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec SpF ont été décrits au point 3-4 de ce rapport. Les données de surveillance sont communiquées à SpF sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles, et annuellement par le rapport d'activité du CNRVC.

• Auprès d'autorités partenaires telles que l'ANSES, l'IFREMER : le CNRVC 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 DGAL).

*Après des professionnels de santé et des laboratoires correspondants*

Des échanges sont établis avec les microbiologistes et les cliniciens ayant envoyé une souche de vibron au CNRVC, soit à réception des échantillons soit à l'occasion de l'envoi des résultats. Le CNRVC réceptionne également des appels de correspondants pour des demandes de méthodes ou de réactifs de référence. Les informations demandées sont généralement transmises par mail. Un alias [vibrions@pasteur.fr](mailto:vibrions@pasteur.fr) a été mis en place pour la réception des demandes. Le volume d'activité est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

La diffusion d'informations est effectuée par l'envoi de documents de référence (articles généraux publiés dans l'EMC, la Presse Médicale, Spectra Biologie, 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 VNC.

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 CNRVC 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.

## 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

SpF a été sollicité en juin 2022 par le CORRUS sur la conduite à tenir suite à un cas de choléra devenu symptomatique lors de son transit en France et ayant fréquenté des lieux publics (diagnostic confirmé a posteriori lors de l'arrivée du cas à son domicile). Le CNRVC a été informé et consulté par SpF.

Une conférence téléphonique a été organisée en juillet 2022 entre SpF, le CORRUS, l'ARS Bretagne, la DGAL, le CNR, dans le cadre de l'investigation d'un cas autochtone de gastro-entérite à *V. cholerae* O1 Ogawa toxigène, avec en particulier des sollicitations sur la conduite à tenir par rapport à l'entourage du cas. Un relevé de décisions a été approuvé par tous les participants conduisant à la clôture de l'investigation.

Le CNRVC a été sollicité par le CORRUS en août 2022 via l'astreinte épidémiologique de SpF et l'ARS Ile de France pour une question relative à l'hygiène des surfaces, suite à un diagnostic de cas de choléra chez une personne ayant fréquenté des lieux fréquentés par des collectivités.

La responsable du CNRVC (jusqu'en 2022) 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 2022 à plus de 10 réunions du groupe de travail international « Surveillance » de la GTFCC et du groupe de travail « Laboratoire » et à la rédaction de plusieurs notes et directives techniques publiées en anglais et français en 2022 sur le site web de la GTFCC de l'OMS, <https://www.gtfcc.org/fr/>

- Environmental Surveillance for Cholera Control October 2022,

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2022/10/gtfcc-technical-note-environmental-surveillance-for-cholera-control-october-2022.pdf>

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/06/gtfcc-technical-note-environmental-surveillance-for-cholera-control-october-2022-fr.pdf>

- Public health surveillance for cholera, Interim guidance February 2023,

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/02/gtfcc-public-health-surveillance-for-cholera-interim-guidance.pdf>

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/04/gtfcc-surveillance-de-cholera-lignes-directrices-provisoires.pdf>

- Isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* O1/O139 from fecal specimens, Job-aid.

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2022/10/gtfcc-job-aid-isolation-and-identification-of-vibrio-cholerae-from-fecal-specimens.pdf>

<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/06/gtfcc-outil-de-travail-isolement-et-identification-de-vibrio-cholerae-a-partir-d-echantillons-de->

[selles.pdf](#)

- Isolation and presumptive identification of *Vibrio cholerae* O1/O139 from fecal specimens, Fact sheet.  
<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2022/10/gtfcc-fact-sheet-isolation-and-identification-of-vibrio-cholerae-from-fecal-specimens.pdf>  
<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/06/gtfcc-fiche-technique-isolement-et-identification-de-vibrio-cholerae-a-partir-d-echantillons-de-selles.pdf>

### 5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

16 septembre 2022. Choléra : traitement, signes, comment se transmet la maladie, interview de **M-L Quilici** dans Le Journal des Femmes (<https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2800317-cholera-traitement-symptome-france-transmission/#definition-quest-ce-que-le-cholera>).

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

---

### 6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités 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 vibriens 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 CNRVC dans le cadre de projets en collaboration au niveau national, avec les acteurs de la sécurité alimentaire ou environnementale, et au niveau international.

Les activités de recherche menées en 2022 ont essentiellement concerné l'analyse phylogénomique des souches récentes de vibriens cholériques de la septième pandémie pour mieux comprendre la circulation mondiale et l'évolution génétique de cet agent pathogène. Les études finalisées ayant donné lieu à publication sont présentées ci-dessous :

- Genomic microevolution of *Vibrio cholerae* O1 in the Lake Tanganyika basin: CNRVC, Unité BPE en collaboration avec la London School of Hygiene and Tropical Medicine, l'Université de Copenhague, l'Université de Kinshasa et le ministère de la Santé de la République Démocratique du Congo (RDC).

Etude de suivi des populations de *V. cholerae* O1 de la septième pandémie cholérique (7PET) qui circulent actuellement dans le bassin du lac Tanganyika, hotspot régional du choléra, en étudiant des isolats récents collectés en RDC par bactériologie conventionnelle et génomique et en plaçant ces génomes dans un contexte phylogénétique plus large pour élucider leur histoire évolutive. Cette analyse a montré la persistance d'une sous-lignée unique (AFR10) en RDC et les pays environnants au cours des 20 dernières années, ayant cependant subi des micro-évolutions génétiques. Un sous-groupe a particulièrement été mis en évidence dans le bassin du Lac Tanganyika, restreint à cette zone géographique et présentant une multi-résistance aux antibiotiques, en particulier une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine.

- Genomic epidemiology of the cholera outbreak in Yemen reveals a succession of epidemic clones driven by the gain of a multi-drug resistance plasmid: CNRVC, Unité BPE en collaboration avec le Wellcome Sanger Institute et le National Centre of Public Health Laboratories and Faculty of Science, Sana'a, Yémen.

Le Yémen subit depuis 2016 l'épidémie de choléra la plus importante jamais rapportée, avec plus de 2,5 millions de cas à ce jour. Les souches à l'origine de cette épidémie (*V. cholerae* séro-groupe O1 7PET, sous-lignée AFR13) étaient initialement peu résistantes aux antibiotiques mais depuis 2018 des souches multi-résistantes ont été isolées. Un éventuel changement dans les génotypes en circulation a été recherché par l'analyse de 260 génomes d'isolats échantillonnés au Yémen entre 2018 et 2019. L'analyse phylogénomique a révélé une succession de clones AFR13, l'année 2019 étant dominée par un clone porteur d'un plasmide de multirésistance aux antibiotiques de type IncC. Des copies identiques de ces éléments mobiles ont été trouvées indépendamment dans plusieurs lignées de *V. cholerae* non apparentées, suggérant un échange et une recombinaison entre les souches endémiques et épidémiques.

## 6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

**Nombre de publications internationales : 3**

**Nombre de publications mentionnant les financements de Santé publique France : 1**

### Publications internationales

Rouard C, Njamkepo E, Quilici ML, Weill FX (2022). Contribution of microbial genomics to cholera epidemiology. *CR Biol.* 345(1): 37-56. DOI: [10.5802/crbior.77](https://doi.org/10.5802/crbior.77)

Benamrouche N, Belkader C, Njamkepo E, Zemam SS, Sadat S, Saighi K, Torkia Boutabba D, Mechouet F, Benhadj-Slimani R, Zmit FZ, Rauzier J, Kias F, Zouagui S, Ruckly C, Yousfi M, Zertal A, Chouikrat R, Quilici ML, Weill FX (2022). Outbreak of imported seventh pandemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Algeria, 2018. *Emerg Infect Dis.* 28(6):1241-1245. DOI: [10.3201/eid2806.212451](https://doi.org/10.3201/eid2806.212451)

Lassalle F, Al-Shalali S, Al-Hakimi M, Njamkepo E, Bashir IM, Dorman MJ, Rauzier J, Blackwell GA, Taylor-Brown A, Beale MA, Al-Somainy AA, Al-Mahbashi A, Almoayed K, Aldawla M, Al-Harazi A, Quilici ML<sup>#</sup>, Weill FX<sup>#</sup>, Dhabaan G<sup>#</sup>, Thomson NR<sup>#</sup>. Genomic epidemiology of the cholera outbreak in Yemen reveals the spread of a multi-drug resistance plasmid between diverse lineages of *Vibrio cholerae*. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.24.504966v1>. (<sup>#</sup>auteurs seniors).

### Communications internationales

Quilici ML, Looking Across the GTFCC Working Groups, Surveillance and Laboratory, 9th Annual Meeting of the Global Task Force for Cholera Control (GTFCC), 27-29 June, 2022, hybrid event (participation virtuelle).

## 7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

---

- Dans le domaine de la santé alimentaire, le CNRVC 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 CNRVC a échangé avec l'ANSES de Boulogne-sur-Mer en 2022 pour des investigations dans le cadre de la TIAC choléra, l'ANSES a réalisé les analyses des produits alimentaires susceptibles d'être à l'origine des cas d'infections. Les résultats étaient négatifs pour les échantillons envoyés.

- Le CNRVC a participé à une réunion d'échange sur les vibrions non cholériques organisée par la DGAL (Bureau des Produits de la Mer et d'Eau Douce) le 10 novembre 2022, avec des partenaires de l'ANSES Boulogne-sur-Mer (LNR *Vibrio*), de la DGS, de l'IFREMER / LSEM (LNR coquillages). Une présentation a été faite par le CNRVC sur les manifestations cliniques et le diagnostic microbiologique des infections à VNC. L'objectif était de discuter de perspectives concernant une éventuelle réglementation européenne pour la gestion des lots contaminés.

- **FX Weill** a participé à plusieurs jurys de recrutement (12 janvier, 9 juin et 21 novembre) de chercheurs bactériologistes pour le LSEM (LNR coquillages) de l'IFREMER Nantes.

## 8. Programme d'activité pour les années suivantes

---

- Développement d'outils bioinformatiques pour assurer la transition entre bactériologie classique et génomique haut-débit pour l'identification et le typage des VNC. Le premier outil permettra le sérotypage *in silico* des *V. cholerae*.
- Validation de l'utilisation systématique de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des souches de *Vibrio* et préparer la validation de la méthode pour l'accréditation.
- Poursuite du développement de méthodes de qPCR pour remplacer les PCR conventionnelles utilisées en routine au CNRVC pour le diagnostic.
- Poursuite des analyses phylogénomiques des souches récentes de vibrions cholériques de la septième pandémie pour mieux comprendre la circulation mondiale et l'évolution génétique de cet agent pathogène.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection historique de 250 souches du vibron cholérique de biotype classique pour mieux comprendre la structure des populations et l'évolution de ce pathogène historique qui a disparu au profit du biotype El Tor au cours des années 1970 et 1980.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection de 250 souches représentatives de *V. cholerae* non-O1/non-O139 pour mieux décrire les populations pathogènes de ce groupe bactérien peu connu quant à sa diversité génétique et sa pathogénèse.

# 1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

---

## 1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

### ***Vibrions et choléra***

---

Le CNR Vibrions et choléra s'engage à assurer les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté de mars 2022 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

#### ***Pour le *Vibrio cholerae****

##### **1. Expertise**

- en confirmant l'identification et en typant les souches de vibron cholérique ;
- en caractérisant la toxine CT des *V. cholerae* ;
- en étudiant et en suivant la résistance aux antibiotiques ;
- en collaborant, notamment par l'échange de souches, avec le CNR Résistance aux antibiotiques à l'étude des nouveaux mécanismes de résistance.

##### **2. Conseil**

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

##### **3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique**

- 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.

##### **4. Contribution à l'alerte**

- en signalant à l'agence nationale de santé publique 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. Expertise

- en apportant 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) ;
- en diffusant les informations et techniques visant à identifier les vibrions halophiles dans un contexte de toxi-infection alimentaire d'origine halieutique ou marine.

### 2. Conseil

- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

### 3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- 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, Anses, DGCCRF, etc.) et avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou microbiologie environnementale.

### 4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique 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.

## 1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Nom - Prénom	Fonction / Statut / Qualification	Organisme payeur	ETP
François-Xavier WEILL	Responsable CNRVC / Professeur Institut Pasteur / Biologiste médical	Institut Pasteur	0,2
Caroline ROUARD	Responsable adjoint CNRVC / Cadre médicale Biologie Biologiste médical	Institut Pasteur	0,4
Marie ACCOU-DEMARTIN	Technicienne supérieure de recherche	Institut Pasteur	0,65
Quentin HOLLEVILLE	Technicien supérieur de recherche (remplacement congé maternité de Marie Accou-Demartin)	Institut Pasteur	0,65
Corinne RUCKLY	Technicienne supérieure de recherche	Institut Pasteur	0,1
Valérie DUVERNE-POLILAT	Technicienne supérieure administrative	Institut Pasteur	0,25
<b>TOTAL</b>			<b>1,6</b>

## 1.3 Locaux et équipements

### Surface des locaux et plan

Le CNRVC se situe 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.

Les locaux se trouvent principalement au 3<sup>e</sup> étage de ce bâtiment :

- les pièces 01A et 02, représentant deux laboratoires pour une surface totale de 26 m<sup>2</sup>, sont plus spécifiquement dédiées aux activités de bactériologie (pièce 01A : laboratoire P2) et de biologie moléculaire du CNRVC (pièce 02) ; un de ces deux laboratoires (pièce 01A), dont l'accès est limité au personnel du CNRVC, est également la pièce d'archivage des dossiers,
- le secrétariat (pièces 03/04) est commun à l'UBPE, 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 CNRVC,
- des locaux techniques sont partagés entre l'Unité des Bactéries pathogènes entériques et l'Unité des Spirochètes :

\* une pièce climatisée de 16,1 m<sup>2</sup> (n°10) pour les migrations par électrophorèse en agarose, les thermocycleurs, l'appareil d'acquisition d'image de gels et pour réaliser les extractions semi-automatiques d'ADN,

\* une pièce de 11,6 m<sup>2</sup> (n°19) contenant les agitateurs Infors, les 2 congélateurs à -80°C et l'ultracentrifugeuse,



## **Principaux équipements**

### **Dans la structure**

Spécifiques au CNRVC :

- équipement courant d'un laboratoire de bactériologie : deux enceintes climatiques (30°C, 37°C), un poste de sécurité microbiologique de classe II, un microscope, deux bains-marie,
- deux congélateurs à -80°C, trois containers à azote liquide, deux armoires de souches lyophilisées,
- équipement de biologie moléculaire : trois appareils à PCR, un appareil pour électrophorèse en champ pulsé (BioRad CHEF DR III, placé dans une pièce climatisée), deux fours à hybridation, un système de transfert sous vide, une centrifugeuse de paillasse réfrigérée, un évaporateur concentrateur SpeedVac ADN, des générateurs et des cuves à électrophorèse, deux Biophotomètres Eppendorf,
- une hotte chimique,
- une hotte pour PCR,
- sept ordinateurs et deux imprimantes en réseau, un scanner,
- un accès au logiciel d'analyse BioNumerics Applied Maths (deux 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,
- un séquenceur MiniON Mk1C (Oxford Nanopore Technologies) pour effectuer du séquençage « long-read ».

Partagé avec d'autres entités :

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

### **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 sont décrits dans l'Annexe C, « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur », et concernent en particulier :

- la Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) qui effectue les 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 Cellule d'intervention biologique d'urgence (CIBU)

Viennent également en support aux CNRVC :

- 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 OMICS qui permettra le séquençage des génomes bactériens pour les activités de recherche (séquenceurs à haut débit MiSeq et HiSeq2500 d'Illumina),
- le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) qui est équipé d'un appareil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF),
- le Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie intégrative (C3BI) qui sera 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'OMS placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur.

Les CNR de l'UBPE 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 Collections de matériel biologique

Au début du mandat 2023, le CNRVC disposait d'une collection de 696 souches d'origine clinique isolées de cas d'infections à *Vibrio* diagnostiqués sur le territoire français (métropole et Outre-Mer) depuis 1975 et 2170 souches d'origine alimentaire, environnementale et animale (cf paragraphe 2.4 du rapport). La collection s'organise comme suit :

- Toutes les souches appartenant au genre *Vibrio* collectées dans le cadre des activités du CNRVC 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 CNRVC 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 CNRVC depuis 1998.
- Le CNRVC 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 des responsables du CNRVC. Il est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques en fonction de l'utilisation finale du matériel et de la nature industrielle ou académique du partenaire. Par exemple, un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement ou MTA) et un accord de collaboration peuvent être nécessaires selon la nature des interactions entre les deux parties. Ces accords pourront éventuellement donner lieu à une contrepartie financière 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 CNRVC 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 CNRVC.

## 1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRVC fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2022. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

La démarche qualité du CNRVC est présentée dans le point 1. Missions et Organisation du CNR. En terme d'activité des techniques accréditées, le nombre d'analyses effectuées est présenté ci-dessous :

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyses 2022	Accrédité (A) / non accrédité (NA)
Vibrions et choléra	Microbiologie	Bactériologie	Identification moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	150	NA
			Identification moléculaire de <i>V. alginolyticus</i>	16	NA
			Identification moléculaire de <i>V. vulnificus</i>	89	NA
			Agglutination sur lame <i>V. cholerae</i>	54	A
			Détection des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant la toxine cholérique	146	A
			Identification moléculaire de <i>V. cholerae</i>	203	A

En 2022, le CNRVC 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 cinq souches de *Vibrio* (deux *V. cholerae* et trois *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.

## 2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

### 2.1 Liste des techniques de référence

Liste des techniques de référence du CNRVC		Technique accréditée
Recherche des vibrions à partir de prélèvements par des techniques d'enrichissement en eau peptonée alcaline et isolement sur milieu sélectif (TCBS et GNA)		
Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI TOF (Sirius Bruker) avec utilisation de la base de données Bruker ainsi que d'une base de données spécifique développée au CNRVC pour l'identification des espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme		
Identification bactérienne par autres techniques de bactériologie classiques des différentes espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme (Oxydase, Galerie API 20E, Cultures en concentrations croissantes de NaCl)		
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérogroupes O1 et O139		Oui
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérotypes Inaba et Ogawa		
Identification de <i>V. parahaemolyticus</i> (recherche du gène <i>r72H</i> ) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. cholerae</i> (recherche de l'espace intergénique 16-23S) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. vulnificus</i> (recherche du gène <i>hly</i> ) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. alginolyticus</i> (recherche du gène de la collagénase) par PCR en point final		Oui
Recherche des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant pour la toxine cholérique par PCR en point final		Oui
Identification bactérienne par séquençage Sanger de l'ARNr16S et du gène <i>rpoB</i>		
Séquençage complet des génomes (WGS) : short reads (Illumina), long reads (Minion)		
Caractérisation moléculaire de <i>V. cholerae</i>	Recherche et typage des gènes <i>hlyA</i> (hémolysine), <i>tcpA</i> (Toxin-corregulated pilus), <i>rstR</i> (Répresseur du phage CTX)	
	Recherche du gène <i>chxA</i> (codant pour la cholix-toxine)	
	Recherche du gène <i>stn</i> codant pour une entérotoxine thermo-stable	
	Recherche des gènes <i>rfbO1</i> et <i>rfbO139</i> (codant les sérogroupes O1 et O139)	
	Recherche des gènes <i>ToxR</i> et <i>OmpW</i> (identification espèce <i>V. cholerae</i> )	
	MLST <i>in silico</i>	
Caractérisation moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	Recherche des gènes codant pour les hémolysines <i>tdh</i> et <i>trh</i>	
	Recherche des gènes correspondant aux clones pandémiques ( <i>orf8</i> , <i>toxRS</i> )	
	Recherche du gène <i>toxR</i> (identification espèce <i>V. parahaemolyticus</i> )	
	MLST <i>in silico</i>	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS1 ( <i>vcrD1</i> , <i>VP1680</i> , <i>vopD</i> )	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS2 ( <i>vcrD2</i> , <i>vopD2</i> , <i>vopB2</i> , <i>vopP</i> , <i>vopC</i> , <i>vopT</i> )	
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.		
<b>Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé</li> <li>- Détermination de la CMI en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™</li> <li>- Détermination de la CMI en bandelettes Etest®</li> <li>- Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2022 <i>Vibrio spp</i>, CASFM-EUCAST 2022 Entérobactérales ou CLSI M45 (2015) en fonction des molécules</li> </ul>		

- Recherche de gènes de résistance acquis sur génome (Resfinder) et recherche de mutations chromosomiques (résistance aux fluoroquinolones : <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> ; résistance aux nitrofuranes : VC0175, VCA0637 ; réversion de la sensibilité à la colistine)	
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

## 2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Liste des techniques recommandées par le CNRVC	
<b>Recommandations pour la recherche des bactéries du genre <i>Vibrio sp</i> à partir des selles :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enrichissement des selles à l'aide d'eau peptonée alcaline</li> <li>- Culture sur milieux spécifiques et sélectifs : TCBS et GNA</li> </ul>	
Cependant de nombreux laboratoire ne disposent pas de ces différents milieux :	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sur la base des retours d'expérience fait par les biologistes au CNRVC, la détection des espèces de <i>Vibrio spp</i> peut se faire sur des milieux habituellement utilisés pour la mise en œuvre d'une coproculture standard, éventuellement sans étape d'enrichissement préalable. <i>V. cholerae</i> en particulier est une bactérie peu exigeante pour sa culture, qui peut être isolée à partir d'une coproculture standard si elle est présente en grande quantité dans les selles. Le facteur limitant en l'absence d'une étape d'enrichissement cependant pourrait être la charge de l'inoculum initial, en particulier dans des cas peu symptomatiques. Les <i>Vibrio spp</i> poussent également très bien sur géloses au sang.</li> <li>- Quilici ML, Robert-Pillot A. Spectra Biologie n°215, mai 2015</li> </ul>	
<b>Références pour le diagnostic du choléra :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quilici M.-L. (2011). Le diagnostic bactériologique du choléra. Revue Francophone des Laboratoires (Elsevier Masson SAS), Dossier Les Maladies Tropicales, 431, 51-65.</li> <li>- 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 : <a href="http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm">http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm</a>.</li> <li>- 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 <a href="http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_FR/en/index.html">http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_FR/en/index.html</a></li> </ul>	
<b>Référence pour le diagnostic des vibrions non cholériques (VNC) :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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.</li> </ul>	
<b>Utilisation des PCR multiplex / syndromiques pour la recherche des <i>Vibrio</i> dans les selles :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le CNRVC recommande d'être attentif aux gènes cibles de la PCR et à l'interprétation d'un signal positif. Ainsi une PCR ciblant les gènes de la toxine cholérique ne peut prétendre détecter l'ensemble des souches de l'espèce <i>V. cholerae</i>.</li> <li>- Le CNRVC 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.</li> </ul>	
<b>Identification des bactéries du genre <i>Vibrio sp</i> :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spectrométrie de masse MALDI-TOF <ul style="list-style-type: none"> <li>o <b>ATTENTION à la base de données utilisée avec le système Bruker : l'identification de l'espèce <i>Vibrio cholerae</i> n'est possible que si l'extension (MNT IVD Library extension) a été ajoutée.</b> Dans le cas contraire, une souche de <i>V. cholerae</i> sera identifiée <i>Vibrio albensis</i> ou <i>Vibrio mimicus</i> (avec un score entre 1.8 et 2).</li> </ul> </li> <li>- Identification moléculaire : cible spécifique pour les différentes espèces ou séquençage de l'ARNr16S et gène <i>rhoB</i></li> </ul>	
<b>Typage :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'analyse phylogénétique basée sur le WGS et l'analyse comparative des génomes sont utilisées pour étudier la structure de la population et l'évolution des <i>V. cholerae</i> O1 El Tor de la 7<sup>ème</sup> pandémie</li> </ul>	
<b>Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé</li> <li>- Détermination des CMI</li> <li>- Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2022 <i>Vibrio spp</i></li> </ul>	