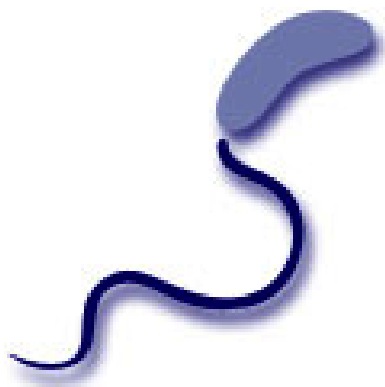


**Rapport annuel d'activité**

**2021**

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



**Année d'exercice  
2020**

## SOMMAIRE

Résumé analytique.....	4
Analytical summary.....	5
1/ Missions et organisation du CNR.....	6
1-1. Equipe et organigramme du CNR.....	6
1-2 Démarche qualité du CNRVC en 2019.....	6
2/ Activités d'expertise .....	8
2-1. Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2019 .....	8
2-2. Evaluation des techniques et réactifs .....	9
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	9
2-4 Collections de matériel biologique.....	10
2-5 Activités d'expertise de l'année 2020.....	10
2-5.1 Echantillons étudiés.....	12
2-5.2 Niveau de caractérisation réalisé .....	12
2-6 Activités de séquençage .....	13
3/ Activités de surveillance .....	13
3-1. <i>Vibrio cholérique</i> .....	13
3-1.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	13
3-1.2 Evolution et caractéristiques des infections.....	15
3-1.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux .....	16
3-1.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....	18
3-1.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	20
3-2. <i>Vibrions non cholériques</i> .....	21
3-2.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées.....	21
3-2.2 Evolution des caractéristiques des infections .....	22
3-2.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux .....	26
3-2.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....	27
3-2.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance.....	27
4/ Alerte.....	28
4-1. Procédure d'alerte .....	28
4-2. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année.....	29
5/ Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	29
5-1. Conseil et expertise aux professionnels de santé .....	29
5-1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé.....	29
5-1.2 Accueil de stagiaires.....	30
5-1.3. Guides élaborés.....	30
5-1.4. Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNR.....	31
5-1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé .....	32
5-2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires nationales et internationales .....	32
6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	33
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2020.....	33
6.2. Liste des publications et communications 2020.....	36
7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	38
8/ Programme d'activité 2021-2022 .....	39

*Annexe 1 : Missions et organisation du CNR*

- 1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR*
- 1.2 Organisation du CNR*
- 1.3 Locaux et équipements*
- 1.4 Collections de matériel biologique*
- 1.5 Démarche qualité du laboratoire*

*Annexe 2 : Capacités techniques du CNR*

- 2.1 Techniques de référence, marqueurs épidémiologiques disponibles*
- 2.2 Techniques recommandées par le CNR*

## Résumé analytique

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

• **Le choléra** reste aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique dans toutes les régions du monde, représentant une charge estimative de près de 3 millions de cas et 95 000 décès par an, selon les estimations de l'OMS. Le RSI 2005 encourage les pays confrontés à des épidémies de choléra à rapporter les cas à l'OMS, mais cette maladie reste négligée et sous-déclarée. La plupart des cas ne sont pas recensés en raison des limitations des systèmes de surveillance et des craintes de répercussions négatives sur le commerce ou le tourisme. Aujourd'hui, le choléra touche 47 pays à travers le monde. Presque tous les pays en développement sont confrontés à des flambées de choléra ou à la menace d'une épidémie. Le continent africain est le plus touché, le choléra est également très présent en Asie où il circule de manière endémique. En 2020, les pays qui ont signalé la majorité des nouveaux cas de choléra étaient le Yémen, la République démocratique du Congo, l'Éthiopie, le Mozambique et la Somalie. Cette maladie est à déclaration obligatoire en France, où des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques peuvent survenir de façon sporadique. La déclaration doit être faite dans les délais les plus brefs aux autorités de santé après confirmation d'identification par le CNR. **En 2020, comme à deux reprises au cours des 10 dernières années, aucun cas de choléra n'a été rapporté sur le territoire français.** La détection et l'investigation systématique des cas restent cependant justifiées afin d'identifier tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave, surveiller les co-exposés à une même source de contamination, et du fait des risques de propagation dans certains groupes de populations dans les territoires français d'outre-mer.

La pandémie de COVID 19 a eu des répercussions considérables sur les activités de surveillance du choléra dans le monde, puisque dans la plupart des pays concernés le personnel chargé de la surveillance tant sur le terrain qu'en laboratoire a été affecté aux efforts de riposte à la COVID 19. De plus, en raison des restrictions de circulation imposées par de nombreux pays en 2020 et des restrictions aux voyages internationaux, le CNR n'a reçu aucun échantillon en provenance de pays étrangers soumis à des épidémies de choléra.

Le CNR a poursuivi son implication au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, partenariat entre plus de 50 institutions, par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire", concourant à la réalisation de la feuille de route mondiale de l'OMS ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030. Le nombre de cas de choléra diminue dans le monde grâce aux progrès de la lutte dans les principaux pays d'endémie.

• Les vibrions non cholériques (VNC) d'intérêt médical, essentiellement les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, sont à l'origine d'infections sporadiques, gastro-entérites, infections suppuratives, septicémies, dont l'évolution peut être extrêmement sévère, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives. La consommation de produits de la mer et l'exposition de plaies au milieu marin sont les deux voies de contamination. Depuis 2016 une augmentation du nombre de cas cliniques d'infections à VNC a été observée, avec un total de 26 cas en 2017, 60 en 2018 et 69 en 2019, essentiellement représentés par les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*, alors que le nombre moyen de cas d'infections rapportés était de 10 entre 1995 et 2015. Cette augmentation a été ralentie en 2020, malgré les températures élevées mesurées durant la période estivale, avec **47 cas cliniques d'infection à VNC confirmés au CNR**, ce qui peut vraisemblablement être attribué à la pandémie de Covid 19.

Un lien avec le milieu marin, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer, est de façon constante établi dans plus de 70% des cas, l'ingestion d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits en particulier, étant la voie essentielle de contamination. La majorité des cas d'infections se manifestent par des gastroentérites. L'espèce *V. parahaemolyticus* a été majoritairement isolée en 2020, suivie par l'espèce *V. cholerae*, deux cas de gastroentérites ont été associés à *V. fluvialis*.

Le CNR a poursuivi ses échanges avec ses laboratoires correspondants sur leurs méthodes d'identification, PCR multiplex syndromique et/ou spectrométrie de masse. Cette évolution a permis d'améliorer la surveillance grâce en particulier à une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés, par des laboratoires de ville.

## Analytical summary

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

• **Cholera** remains a major public health problem in all regions of the world, with an estimated burden of about three million cases and 95,000 deaths per year, according to the WHO. International Health Regulation (IHR) 2005 encourages countries confronted with epidemics of cholera to report cases to the WHO, but it remains a neglected and underreported disease. Many cases are not recorded due to limitations in surveillance systems and fears of potential impact on trade or tourism. Today cholera affects 47 countries across the globe. Almost every developing country faces cholera outbreaks or the threat of cholera. Africa is the continent worst affected, but cholera is also present in Asia, where it circulates in an endemic manner. In 2020, the countries reporting the majority of new cholera cases were Yemen, the Democratic Republic of Congo, Ethiopia, Mozambique and Somalia. Cholera is a notifiable disease in France, where isolated cases of imported cholera in travelers returning from zones in which cholera is endemic or epidemic may occur in a sporadic manner. Cases must be declared to the health authorities as soon as possible after the diagnosis is confirmed by the national reference center (the CNRVC, in France). **In 2020, as has already happened over the past 10 years, no case of cholera has been reported on French territory.** The detection and systematic investigation of cases on French soil remains justified, to ensure the detection of all cases likely to progress to a serious form, to monitor individuals exposed to the same source of contamination, and due to the risk of propagation in certain groups of populations in French overseas territories.

The COVID 19 pandemic has had a significant impact on cholera surveillance activities worldwide, as both field and laboratory surveillance staff in most affected countries have been assigned to COVID 19 response efforts. In addition, due to movement restrictions imposed by many countries in 2020 and difficulties in exchange due to international travel restrictions, the CNRVC did not receive any samples from foreign countries affected by cholera outbreaks in 2020.

The CNR continued its work within the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) of the WHO, a partnership of more than 50 institutions, as the leader of the Laboratory Surveillance Working Group, supporting the WHO roadmap, with the objective of decreasing the number of deaths due to cholera by 90% by 2030. The number of cholera cases is decreasing worldwide thanks to progress in control in the main endemic countries.

• **Non-cholera vibrios** (NCVs) of medical interest, essentially the species *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, cause sporadic infections, gastroenteritis, suppurative infections, septicemia, which may follow an extremely severe course, and, more rarely, collective cases of food poisoning. The consumption of seafood and the exposure of wounds in marine environments are the two routes of contamination. The number of clinical cases has been steadily increasing since 2016 with a total of 26 cases in 2017, 60 in 2018 and 69 in 2019, mainly represented by *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* species, while the average number of reported infections was 10 between 1995 and 2015. This increase was slowed down in 2020, despite the high temperatures measured during the summer period, with 47 clinical cases of NCV infections confirmed at the CNR, which can possibly be attributed to the Covid 19 pandemic.

A link to the marine environment, the consumption of seafood or direct contact with seawater is consistently established in more than 70% of cases, with the ingestion of contaminated foods, raw or undercooked seafood in particular, being the major route of contamination. The majority of infections manifest as gastroenteritis. *V. parahaemolyticus* was the species most commonly isolated in 2020, then *V. cholerae* species, two cases of gastroenteritis were associated with *V. fluvialis*.

The CNR has continued its exchanges with collaborating laboratories concerning their identification methods: syndromic multiplex PCR and/or mass spectrometry. This development has made it possible to improve surveillance in particular by improving the detection of paucisymptomatic cases not requiring hospitalization by private medical testing laboratories.


## 1/ Missions et organisation du CNR

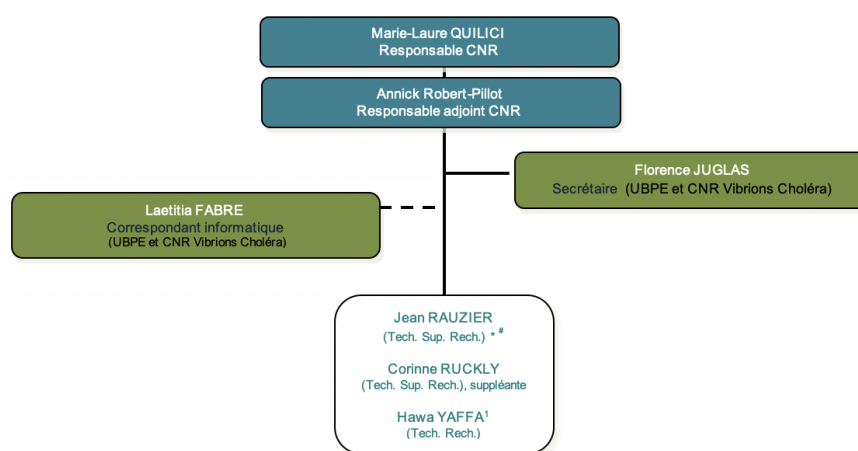
Les missions et objectifs majeurs du CNR sont présentés en *Annexe I* du présent rapport.

### 1.1 Équipe et organigramme du CNRVC

Les effectifs par catégories de fonctions sont présentés en *Annexe I* du présent rapport.

#### **Organigramme du CNR**

 Institut Pasteur CNR des Vibrions et du Choléra	Support d'enregistrement  Organigramme	Version  F
--	--	------------------



#### **Légende :**

—— Relation hiérarchique et fonctionnelle  
- - - - Relation fonctionnelle

\* Correspondant Qualité du CNR

# Correspondant Métrologie et Matériel du CNR

<sup>1</sup> Affectation temporaire pour des activités de recherche



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

PAGE 1 SUR 1

### 1.2 Démarche qualité du CNRVC en 2020

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

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

La synthèse 2020 de la démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) est présentée en *Annexe I*, point 1-5, du présent rapport.

- Le CNRVC est engagé dans la démarche qualité depuis 2000. Il est inclus dans la 4ème vague d'accréditation des activités analytiques. La rédaction des procédures et modes opératoires analytiques et documents d'enregistrement pour ses activités de diagnostic a été réalisée, avec une gestion documentaire électronique des documents et leur mise en ligne sur la plateforme webcampus de l'Institut Pasteur, dans l'espace dédié au CNR. Le CNRVC participe annuellement à des contrôles externes de la qualité via des essais inter laboratoires, avec le CNR de Liège.
- L'année qualité 2020 du CNRVC s'est organisée comme suit :

LREMS /CNRVC	Périodes de réalisation
Audit de renouvellement LREMS (Le CNRVC ne faisait pas partie de l'échantillonnage)	6 au 8 octobre 2020
Revue qualité du CNRVC	11/06/2020
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	02/10/2020
Audits internes technique et qualité du CNRVC	Technique : 04/12/2020 Qualité : 08/12/2020
Finalisation du dossier de validation de méthode « sérogroupage de <i>V. cholerae</i> »	Décembre 2020

- En 2020, le CNR a participé à un contrôle de qualité externe, organisé par le Centre National de référence de Belgique pour *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (CHU de Liège), par l'analyse de 5 souches de *Vibrio*, 2 *V. cholerae* et 3 *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.
- Les perspectives 2020 pour le CNRVC se calqueront sur ce qui est présenté en *Annexe 1* pour le LREMS.
- La liste des techniques accréditées du CNRVC est disponible en *Annexe 2*.

## 2/ Activités d'expertise

Les activités d'expertise conduites au CNR concernent :

- L'étude des souches de vibrions cholériques isolées de cas importés sur le territoire français, également de cas diagnostiqués en zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, envoyées au CNR pour confirmation de diagnostic et caractérisation. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNR et permet de connaître les souches de vibrions cholériques circulant dans le monde et susceptibles d'être importées en France. En 2020, le CNR a analysé 5 prélèvements pour une suspicion de choléra sur le territoire français. Aucun échantillon, prélèvement ou souche isolée, n'a été reçu en provenance de l'étranger.

- L'étude des souches de vibrions non cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le CNR a reçu 73 échantillons, souches isolées (67) ou prélèvement de selles (6) pour confirmation d'identification ou recherche de vibrions non cholériques. 70% des souches isolées étaient identifiées au niveau de l'espèce par les laboratoires correspondants. Le nombre d'échantillons a été en légère baisse par rapport à l'année 2019 malgré des températures estivales élevées, ceci étant peut-être une répercussion de la pandémie de Covid-19.

Le CNR 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.

A noter que le CNR est de plus en plus sollicité pour la recherche des vibrions cholériques et non cholériques à partir de prélèvements.

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

### *2.1 Évolution des techniques, techniques en cours de développement en 2019-2020*

- La réalisation des antibiogrammes se fait systématiquement par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations techniques de l'EUCAST 2020 et /ou par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par ETEST® ou en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™. Les premières études ont été réalisées en utilisant une plaque commerciale EUVSEC, adaptée à la surveillance de la sensibilité des *Salmonella* et *E. coli*, une plaque à façon adaptée aux *Vibrio* a été dessinée en 2020 et est en cours de validation.

- Le CNR développe une base de données protéomiques (spectrométrie de masse type Maldi-Tof, système Bruker Daltonics) pour l'identification de l'espèce *V. cholerae* (n=408, dont 137 *V. cholerae* O1 et 271 *V. cholerae* non-O1/non-O139, 131 appartenant à 51 sérogroupes connus) qui n'est pas distinguée de l'espèce *V. albensis* par l'outil Maldi-Tof de Bruker disponible sur la plateforme P2M de l'Institut Pasteur.

- Le CNR s'est formé à l'étude du pouvoir discriminant de la spectroscopie infrarouge (convention de prêt pour une année de l'appareil IR Biotyper de Bruker) pour une potentielle identification des sérogroupes des souches cliniques de l'espèce *V. cholerae* non-O1/non-O139. Si cette technologie s'avère performante, elle pourra être étendue à l'espèce *V. parahaemolyticus* pour laquelle il est important de connaître l'appartenance des souches aux clones pandémiques (O3:K6 et dérivés).



- Le CNR poursuit le développement d'une base de données génomiques pour les différentes espèces de *Vibrio*, et a mis en place depuis 2018 le séquençage complet des génomes bactériens (WGS, whole-genome sequencing) sur les souches de vibrions cholériques et non cholériques, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires. La présence des gènes d'intérêt pour le diagnostic et la détection des facteurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, mais l'utilisation de cette technique pour un rendu de résultats aux laboratoires (confirmation de l'espèce, présence des gènes codant pour des facteurs majeurs de pathogénicité) n'est pas réalisable actuellement en raison des délais d'obtention des séquences.

La base de données de séquences pour l'espèce *V. cholerae* est constituée de 1004 génomes (dont 740 *V. cholerae* O1 et 264 *V. cholerae* non-O1/non-O139) issus de souches de la collection du CNR. Ces séquences, ainsi que d'autres séquences obtenues lors de travaux en collaboration, nous permettent une analyse phylogénétique des souches de *V. cholerae* O1 reçues au CNR en référence à une base de données de plus de 1500 génomes. Les séquences brutes sont stockées au CNR, les séquences ayant fait l'objet de publications sont rendues publiques.

## 2.2 Évaluation de techniques et réactifs

- Le CNR teste pour la société BIO-RAD les lots de sérums agglutinants polyvalents destinés au diagnostic de *V. cholerae* O1, sur un panel de 43 souches de référence de différents sérogroupes de l'espèce. Une expertise a été réalisée au CNR en 2020.
- Le CNR a poursuivi l'utilisation de la spectrométrie de masse type Maldi-Tof (système Bruker Daltonics) pour l'identification de différentes espèces de *Vibrio*. 262 souches représentatives de 27 espèces de *Vibrio* ont été testées. Les résultats d'identification se sont montrés 100% concordants pour les principales espèces pathogènes, *V. parahaemolyticus* (n=64), *V. alginolyticus* (n=20), *V. fluvialis* (n=8) et *V. vulnificus* (n=19), avec des critères d'identification de confiance élevée (scores > 2,1). A noter cependant les difficultés d'identification de l'espèce *V. cholerae* (n=92), identifiée *V. albensis* par ce système, justifiant le développement et l'utilisation de la base de données propre au CNR.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

- Le CNR a transféré en 2020 à 9 nouveaux laboratoires correspondants (8 Centres Hospitaliers et 1 Laboratoire de Biologie Médicale) un protocole de recherche bactériologique des espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* à partir de prélèvements de selles, éventuellement sans utiliser les milieux d'enrichissement et d'isolement spécifiques aux *Vibrio*, que la plupart des laboratoires n'ont pas.
- Le CNR a transféré en 2020 aux microbiologistes partenaires de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) impliqués dans des plans nationaux de lutte contre le choléra ses protocoles de recherche et caractérisation des vibrions cholériques par PCR.

- Le CNR a poursuivi son soutien technique auprès du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) de Yaoundé, Cameroun, pour la recherche du vibrion cholérique par PCR à partir d'échantillons de selles sur papiers filtres secs.

#### 2.4 Collections de matériel biologique

- Le CNR dispose d'une collection de souches issues de son activité de CNR *Vibrio*, ainsi que d'une collection de souches étudiées dans le cadre de collaborations avec l'étranger, études spécifiques et projets de recherche.
- L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont présentées en *Annexe 1*.
- Toutes les souches de *Vibrio* confirmées au CNR chaque année sont conservées selon les modalités décrites dans cette annexe.

#### 2.5 Activités d'expertise de l'année 2020

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

##### 2.5.1 Échantillons étudiés

Durant l'année 2020, **78** échantillons, en provenance de France (77) ou de l'étranger (1), ont été réceptionnés au CNR, dans le cadre d'activités d'expertise ou de contrôle qualité externe. Les prélèvements (échantillons de selles) n'ont été envoyés que par des correspondants français.

**Tableau 1 : Nombre d'échantillons reçus au CNR en 2020**

Origine	Clinique		Environnement	CQE	Total
	P	S	S	S	
France	11	54	-	-	65
Étranger/OM	-	1	7	5	13
Total	66		7	5	<b>78</b>

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

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

Origine géographique	Expéditeur	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM/Plateaux techniques	6	44	50
	CHU/CH	5	10	15
Total		<b>11</b>	<b>54</b>	<b>65</b>

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CH : centres hospitaliers

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

Origine	Nbre d'échantillons reçus au CNR		Nbre de souches de vibriens isolées/confirmées		Total souches isolées
	P	S	P	S	
France	11	66	2	60	<b>62</b>
Étranger	-	1	-	1	<b>1</b>
Total	11	67	2	61	<b>63</b>

**Tableau 4 : Provenance des échantillons étrangers d'origine clinique**

Pays	Expéditeur	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons
Liban	Université de Tripoli - Liban	1	Souche isolée

### Autres échantillons étudiés

**Tableau 5 : Échantillons étudiés pour des travaux de recherche**

Source	Type d'échantillons	Nombre
Collection du CNR/UBPE	<i>V. cholerae</i> O1 biotype classique	35
Institut Pasteur d'Alger	ADN de <i>V. cholerae</i>	30

La répartition par espèce de toutes les souches isolées et confirmées *Vibrio* en 2020, d'origine française ou étrangère, est présentée dans le tableau suivant :

**Tableau 6 : Souches de *Vibrio* étudiées au CNR en 2020. Distribution par espèce en fonction de l'origine écologique et géographique des prélèvements.**

Origine écologique Espèce identifiée	Homme			Aliments/Environnement			CQE	Total /espèce
	France		Étranger	France		Étranger		
	Métropole	France d'outre-mer		Métropole	France d'outre-mer			
<i>V. cholerae</i> O1	-	-	-					-
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	<b>11</b>	-	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	<b>17</b>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<b>32</b>	-	-		<b>4</b>		<b>2</b>	<b>38</b>
<i>V. alginolyticus</i>	<b>3</b>	-	-					<b>3</b>
<i>V. vulnificus</i>	<b>2</b>	-	-		<b>1</b>			<b>3</b>
<i>V. fluvialis</i>	<b>2</b>	-	-					<b>2</b>
Total	<b>50</b>		<b>1</b>		<b>7</b>		<b>5</b>	<b>63</b>

### Délais moyen de rendus de résultats

Le délai moyen de rendu de résultats du CNR aux laboratoires, incluant l'identification de l'espèce et la mise en évidence de gènes de pathogénicité, était de 4 jours ouvrés à partir de la date de réception d'une souche, conformes à l'objectif des 6 jours annoncés par le CNR sur son site internet. Les

résultats rendus hors délais concernaient les souches dont l'identification était liée au séquençage de produits PCR (3 *V. fluvialis* et 1 *Aeromonas*).

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

### *2.5.2 Niveau de caractérisation réalisé*

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

• Analyses réalisées sur les souches étudiées au CNR en 2020 :

Espèce (Nbre)	Id. bio	Id moléculaire	16S /rpoB et séquençage	Agglutination	PCR gènes pathogénicité	PCR clones pandémiques	Seq. gènes pathogénicité 'in silico'	ATB	Identification MALDI-TOF	WGS*
<i>V. parahaemolyticus</i> (38)	38	38	-	1	38	1	<i>tdh</i> (5) <i>trh</i> (26)	32	38	32
<i>V. cholerae</i> (17)	17	17	-	17	17	-	<i>hlyA</i> (11) <i>st</i> (2)	11	17	11
<i>V. alginolyticus</i> (3)	3	3	-	-	3	-	-	3	3	-
<i>V. fluvialis</i> (2)	2	-	2	-	-	-	-	2	2	-
<i>V. vulnificus</i> (3)	3	3	-	-	-	-	-	2	3	2

- Identification biochimique : méthodes de bactériologie classique, caractères morphologiques, biochimiques et cultureux
- Identification moléculaire : PCR spécifiques d'espèces, ou gènes *rrs* / *rpoB* et séquençage des produits amplifiés
- Agglutination : détermination du sérotype (O1 ou O139)/sérotype (Inaba, Ogawa) par agglutination pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées, recherche des clones pandémiques par détermination des antigènes somatiques et capsulaires pour *V. parahaemolyticus*.
- PCR gènes pathogénicité : recherche des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs pour les souches des espèces *V. cholerae* (gènes *ctxA* et *ctxB*, *tcpA*, *rstR*, *st*, *hlyA*) et *V. parahaemolyticus*/*V. alginolyticus* (gènes *tdh* et *trh*) par PCR.
- PCR clones pandémiques : Mise en évidence des gènes associés au potentiel pandémique des souches de *V. parahaemolyticus* *tdh+* (*orf8*, *toxRS*).
- Séquençage des produits d'amplification ou recherche des séquences in silico après séquençage complet du génome pour *tcpA*, *rstR* et *ctxB* chez *V. cholerae*, *tdh* et *trh* chez *V. parahaemolyticus* et caractérisation des allèles.
- Réalisation d'un antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé et mesure de la CMI par Sensititre.

## 2.6 Activités de séquençage

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

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

Le CNR séquence systématiquement les souches des espèces *V. cholerae* (O1 et non-O1/non-O139) et *V. parahaemolyticus* associées aux cas cliniques en France. Le CNR a séquencé en 2020, 11 souches de *V. cholerae*, 32 souches de *V. parahaemolyticus* et 2 souches de *V. vulnificus* dans le cadre de la surveillance des cas d'infections en France.

## 3/ Activités de surveillance

- **Aucun cas de choléra** n'a été déclaré sur le territoire français en 2020.

- **47 cas cliniques d'infections à VNC** ont été confirmés, se manifestant majoritairement par des gastroentérites (88% des cas). Parmi les cas renseignés et quelle que soit la manifestation clinique, un lien avec le milieu marin a été établi dans 73% des cas, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer. Comme en 2019, les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont restées prépondérantes, la grande majorité des cas d'infections étaient liée à l'espèce *V. parahaemolyticus*. Les cas d'évolution les plus défavorables ont été liés à l'espèce *V. cholerae*, associée à **deux décès** ; l'un faisant suite à une gastroentérite évoluant vers une septicémie et choc septique, le second à une septicémie primaire. Les deux patients présentaient des facteurs de risque, les expositions potentielles étaient soit non renseignée soit non compatible. Deux cas de gastroentérites à *V. fluvialis* ont été diagnostiqués.

### 3.1. *Vibrien cholérique*

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

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

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

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

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

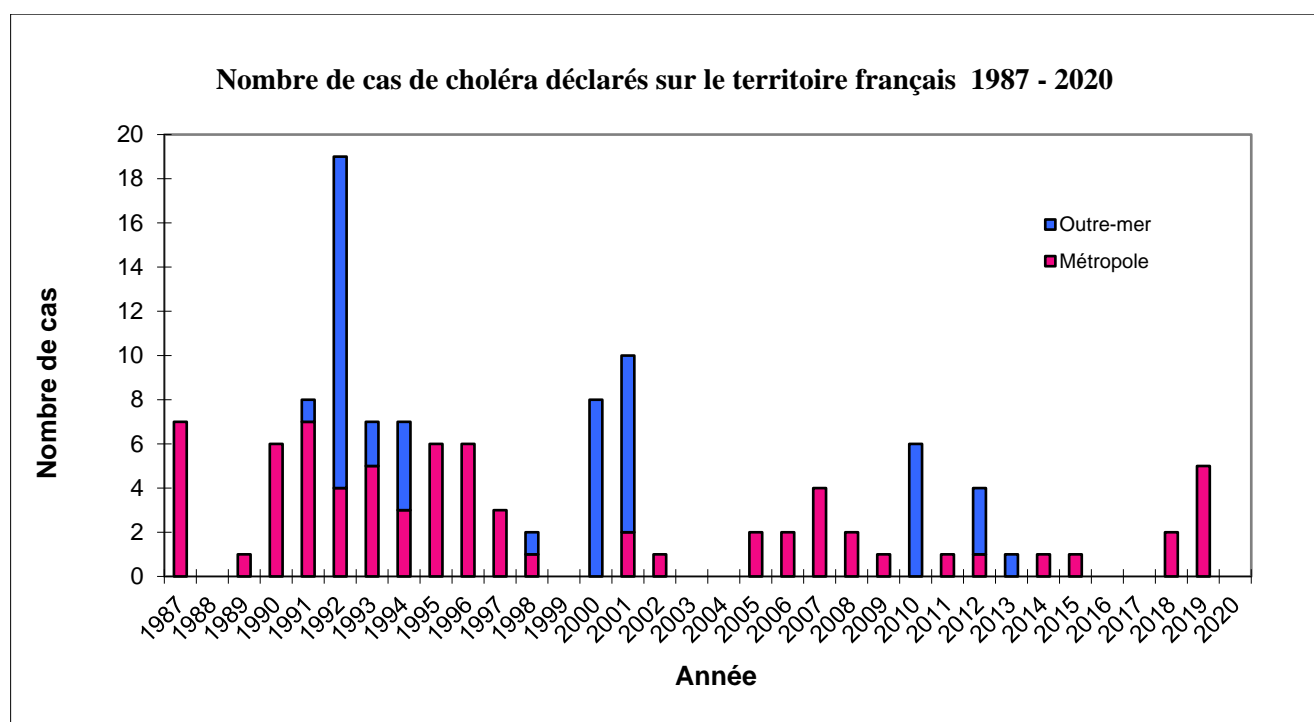
- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

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

### 3.1.2 Évolution et caractéristiques des infections

En France métropolitaine, le choléra est une pathologie importée, dont le nombre reste faible. Comme en 2016 et 2017, aucun cas de choléra n'a été rapporté en 2020 sur le territoire français.

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



- *Origines géographiques des lieux de contamination* : les cas importés en France de 2005 à 2019 proviennent essentiellement **d'Asie, à l'exception de la période 2010-2013, où la région des Amériques (Caraïbes)**, qui avait émergé comme origine géographique de contamination depuis la flambée épidémique majeure débutée en Haïti et en République Dominicaine fin octobre 2010, a été majoritairement à l'origine des cas (Tableau 7). Aucun cas n'a été importé d'Afrique durant cette période.

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

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

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

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

#### - Évolution des agents pathogènes

La surveillance de l'évolution des vibrions cholériques repose essentiellement sur les données de séquençage (WGS), analyse phylogénétique et analyse comparative de données génotypiques. L'identification de mutations de gènes cibles (voir *Annexe 2*, capacités techniques du CNR), tels que *ctxB*, codant pour la sous unité B de la toxine cholérique, *tcpA*, codant pour le récepteur du phage CTX et facteur de colonisation des cellules intestinales, et *rstR*, répresseur du phage CTX, permet la détermination des biotypes. Toutes les souches importées depuis 2006 étaient des variants du biotype ElTor, associées à des séquences différant par 2 (*ctxB1*) ou 3 (*ctxB7*) mutations de la séquence initiale de la sous-unité B de la toxine cholérique (*ctxB3*) (*Tableau 8*). Des vagues et des lignées de transmission ont été définies à l'échelle mondiale et à l'échelle des pays, les variants importés depuis 2006 correspondent à la vague de transmission 3 actuelle, l'allèle *ctxB7* est apparu à Kolkata, en Inde, en 2006 et s'est propagé dans le monde entier, en Haïti en 2010, et au Yémen en 2016-2017. Depuis 2015, les souches importées d'Inde appartiennent à la sous-lignée T13, décrite lors de l'étude du choléra au Yémen en 2016-2017 et correspondant à la dernière introduction sur le continent africain. Des données phénotypiques telles que les profils de résistance aux anti-infectieux permettent également de suivre l'évolution des agents pathogènes, et peuvent être des marqueurs de suivi épidémiologique, mais sur des périodes limitées.

#### - Résistance aux anti-infectieux.

La surveillance de la résistance aux anti-infectieux est devenue essentielle pour les vibrions cholériques, à la fois pour le traitement et pour le suivi épidémiologique des souches. Même si l'administration rapide de sels de réhydratation orale pour remplacer les pertes liquidiennes permet presque toujours de guérir la maladie (des millions de vies sont sauvées chaque année grâce à la solution de sels de réhydratation orale, dont le Lancet a dit un jour que c'était sans doute la principale avancée médicale du XXe siècle), l'antibiothérapie est largement utilisée aujourd'hui pour le traitement du choléra. Une antibiothérapie efficace permet de raccourcir la durée de l'infection, les besoins en solutés de réhydratation, la quantité de selles émises et la durée des symptômes. Elle raccourcit aussi la durée du



portage et de l'excrétion du vibron, évitant ainsi sa dissémination et réduisant probablement le risque de cas secondaires. Elle réduit également de ce fait la durée nécessaire d'hospitalisation, et donc les coûts pour les patients n'ayant pas les moyens d'être hospitalisés dans des pays n'offrant pas de possibilité de prise en charge. Pour toutes ces raisons, de nombreux pays ont recours à l'antibiothérapie pour le traitement du choléra, qui est par ailleurs utilisée pour le traitement des cas importés. Ce suivi est important pour adapter les politiques en matière de lutte anticholérique aux niveaux national et mondial. Il constitue par ailleurs un bon marqueur épidémiologique dans un temps donné.

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

L'OMS recommande le recours à la doxycycline chez l'adulte et à l'érythromycine chez l'enfant pour le traitement du choléra ([https://www.who.int/cholera/task\\_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1](https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1)). Un point particulier à mentionner est l'interprétation des tests de sensibilité à ces deux antibiotiques par la méthode de diffusion en gélose, dont les résultats *in vitro* ne sont pas toujours corrélés à l'activité *in vivo*. La lecture interprétative de la sensibilité à la tétracycline permet de prédire la sensibilité possible des souches à la doxycycline.

L'azithromycine a été recommandée depuis l'arrivée du choléra en Haïti en 2010, à la fois du fait de son efficacité et de sa simplicité d'utilisation par rapport à l'érythromycine (administration en une seule prise) ; elle a également été recommandée de façon systématique à titre prophylactique par un groupe d'experts indépendants pour le personnel des Nations Unies et les personnels intervenant en situation d'urgence afin d'éviter l'introduction du choléra dans des zones non-endémiques.

↪ Une multi résistance des souches de vibrions cholériques aux antibiotiques est rapportée dans toutes les régions du monde, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra ont été observées ces dernières années. Toutes les souches importées en France depuis 2006 étaient multi-résistantes aux antibiotiques, présentant une résistance à l'acide nalidixique (CMI >256 mg/L) et une sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (CMI 0,25 à 0,5 pour la ciprofloxacine), qui peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques. Des souches circulant en Afrique présentant un phénotype de résistance aux macrolides ont été détectées en 2018 et 2019, également au Yémen en 2019, en association à une résistance aux tétracyclines.

↪ La résistance aux polymyxines était jusqu'en 2017 un marqueur phénotypique d'appartenance des souches de vibrions cholérique au biotype ElTor, agent de la septième pandémie, alors que les souches du biotype classique, associées aux pandémies antérieures, y étaient sensibles. Depuis 2017, des souches du biotype ElTor sensibles aux polymyxines ont été décrites, ayant émergé en Inde. Les souches importées du sous-continent indien en France depuis 2015 ont présenté cette caractéristique phénotypique, des études de séquençage et des analyses phylogénétiques ont confirmé l'origine indienne de ces souches et leur appartenance à une même lignée, confirmant dans ce cas l'intérêt de l'utilisation des profils de résistance comme marqueur épidémiologique. Les souches isolées depuis le début de l'épidémie au Yémen en 2016 présentaient initialement cette caractéristique.

Les profils phénotypiques d'antibiorésistance des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes d'origine étrangère isolées depuis 2006 sont présentées dans le *Tableau 8*.

**Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxigènes isolées sur le territoire français depuis 2006.**

Année isolement / N°	Pays d'origine	Résistances associées	CMI (mg/L)		mutations dans gènes cibles				Génotype <i>ctxB</i>	mutations dans <i>ctxB</i>		
			Nal	CIP	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>		H20A	T39H	Ile68T
2006/01	Inde	C Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2006/02	Inde	C Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2007/01	Inde	AM C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2007/02	Inde	Am C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2007/03	Inde	Am Cs Ft Nal O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2007/04	Inde	C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2008/01	Inde	Am Cs Ft Nal Su Sxt Te O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB1</i>	-	+	+
2009/01	Pakistan	C Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB1</i>	-	+	+
2010/01	Haïti	Cs Ft Nal Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2011/01	Bangladesh	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB1</i>	-	+	+
2012/01	Rep Dom	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2012/02	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2012/03	St Martin	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2012/04	Rep Dom	Cs Ft Nal PB O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2013/01	Haïti	Cs Ft Nal PB Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2014/01	Inde	C Cs Ft Nal PB Sm Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2015/01	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.5	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2018/02	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2019/01	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2019/02	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2019/03	Inde	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2019/04	Inde	Ft Nal O129	>256	0.25	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+
2019/05	Bangladesh	Ft Nal Sm Su Sxt O129	>256	0.38	S83Ile	-	S85L	-	<i>ctxB7</i>	+	+	+

**Abréviations utilisées :**

*Am*, ampicilline ; *C*, chloramphénicol ; *Cip*, ciprofloxacine ; *Cs* Colistine ; *E*, Erythromycine ; *Ft*, nitrofuranes ; *Nal*, acide nalidixique ; *PB*, polymyxine B ; *Sm*, streptomycine ; *Su*, sulfamides ; *Sxt*, Sulfaméthoxazole + triméthoprimine ; *Te*, tétracyclines ; *O129* : agent vibriostatique, dont la résistance est un marqueur de la résistance au triméthoprimine.

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

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

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

### 3.1.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

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

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

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

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

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

- Le CNR a participé au réseau Africhol, dans le cadre d'un projet de surveillance du choléra en Afrique sub-saharienne, avec un consortium comportant des organisations internationales, WHO, US CDC et CDC Foundation, EPIVAC Network, West African Health Organization (WAHO), l'Organisation de Coopération pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC).

- L'Institut Pasteur (IP), via le CNR et le Réseau international des Instituts Pasteur, a renforcé depuis 2014 ses interactions avec l'OMS sur la thématique cholera en devenant membre à titre institutionnel de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC). En octobre 2017, 35 partenaires de la GTFCC, dont l'Institut Pasteur, ont signé un engagement sans précédent dans la lutte contre le choléra passant par la mise en œuvre d'une feuille de route mondiale ayant pour objectif une réduction de 90 pour cent des décès dus au choléra d'ici 2030.

Les priorités d'action définies par la GTFCC concernent la surveillance (laboratoire et épidémiologique), la vaccination, l'assainissement et l'administration des soins de santé, cinq groupes de travail thématiques ont été mis en place, dont un groupe dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Le CNR est présent au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, dans laquelle sa responsable s'implique en particulier par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire" (Lab Working Group) qui réunit différents acteurs internationaux de la lutte contre le choléra, provenant de diverses institutions. En 2020, quatre sous-groupes surveillance ont été créés, selon différents contextes épidémiologiques, « Hotspot surveillance », « Outbreak detection and response », « Cholera surveillance & Global monitoring », « Regional approaches to surveillance ». Le groupe surveillance laboratoire est impliqué dans chacun de ces sous-groupes, pour la définition d'indicateurs laboratoire et d'une « stratégie diagnostique » à établir pour améliorer la surveillance ; 8 réunions de sous-groupes ont eu lieu en 2020, également 2 « Surveillance Working Group Webinar » en sessions plénières. La responsable du CNR a également participé à un meeting virtuel: «Finalising the Prioritisation Methodology for the Cholera Roadmap Research Agenda», le 18 juin 2020.

Plusieurs notes et directives techniques ont été publiées depuis 2016 par le groupe de travail surveillance ou en collaboration avec d'autres groupes de travail sur le site de la GTFCC :

- The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests, Novembre 2016, [https://www.who.int/cholera/task\\_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1](https://www.who.int/cholera/task_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1)
- Interim Guidance Document on Cholera Surveillance, Juin 2017 [http://www.who.int/cholera/task\\_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf?ua=1](http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf?ua=1)
- Introduction of DNA based identification and typing methods to public health practitioners for epidemiological investigation of cholera outbreaks, Juin 2017, [https://www.who.int/cholera/task\\_force/GTFCC-Laboratory-support-public-health-surveillance.pdf?ua=1](https://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Laboratory-support-public-health-surveillance.pdf?ua=1)
- Use of antibiotics for the treatment and control of cholera, Mai 2018, [https://www.who.int/cholera/task\\_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1](https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1)
- GTFCC job-aid on strain conditioning for International Transportation of *V. cholerae* O1/O139, 2020, <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2020/05/gtfcc-job-aid-strain-conditioning-for-international-transportation-of-vibrio-cholerae-1.pdf>
- GTFCC job-aid on Specimen Packaging and Domestic Transportation for Laboratory Confirmation of *V. cholerae* O1/O139, 2020, <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2020/05/gtfcc-job-aid-specimen-packaging-and-domestic-transportation-for-laboratory-confirmation-of-vibrio-cholerae.pdf>
- GTFCC job-aid on antimicrobial susceptibility testing for treatment and control of cholera, <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2021/04/gtfcc-job-aid-antimicrobial-susceptibility-testing-for-treatment-and-control-of-cholera.pdf>

Tous ces documents sont depuis 2020 également disponibles en version française, et consultables sur l'application choléra de la GTFCC développée pour les téléphones mobiles et destinée à soutenir les professionnels de la santé publique lors d'une épidémie de choléra,

<https://www.choleraalliance.org/fr/ressources/actualites/lapplication-cholera-gtfcc>

### 3.1.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Le CNR a été sollicité pour le diagnostic microbiologique du choléra en première intention, à partir de prélèvements de selles, par 3 laboratoires correspondants en 2020.

- Deux échantillons positifs en PCR syndromique multiplex se sont révélés négatifs pour *Vibrio* après étude par les techniques classiques d'enrichissements/isolements et par PCR en point final directes sur les échantillons biologiques et les enrichissements. Les données épidémiologiques, en particulier les pays d'exposition (retour du Cambodge) et les symptômes cliniques pour l'un des deux cas n'étaient pas en faveur d'un diagnostic de choléra (diarrhées chroniques).
- Un échantillon de selles sans étude préalable s'est également révélé négatif. Les contextes clinique et d'exposition étaient compatibles avec un cas de choléra.

- Le CNR a été informé par Santé publique France de deux signalements de suspicion de choléra par l'ARS Nouvelle Aquitaine en juillet 2020. Les contextes cliniques et épidémiologiques n'étaient pas en faveur d'un cas de choléra, l'analyse des prélèvements a conduit à l'identification d'une souche de *V. parahaemolyticus* dans un cas et à une recherche de *Vibrio* négative dans l'autre cas.

- L'ARS Pays de Loire et le CNR ont été contactés pour une suspicion de choléra, également en juillet 2020. Les contextes cliniques et épidémiologiques n'étaient pas en faveur d'un cas de choléra. Une

souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 a été isolée d'une hémoculture par le laboratoire, l'étude d'un prélèvement de selles au CNR a également permis l'isolement de *V. cholerae* non-O1/non-O139.

- Le CNR a également été contacté par l'ARS de Normandie en septembre 2020 pour une suspicion de choléra. Le tableau clinique ne correspondait pas à un cas de choléra, de plus une investigation menée par l'ARS ne retrouvait pas de notion de voyage ni de consommations de fruits de mer. Une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 a été isolée d'une hémoculture.

### 3.2 Vibrions non cholériques

#### 3.2.1 Réseau des partenaires

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

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

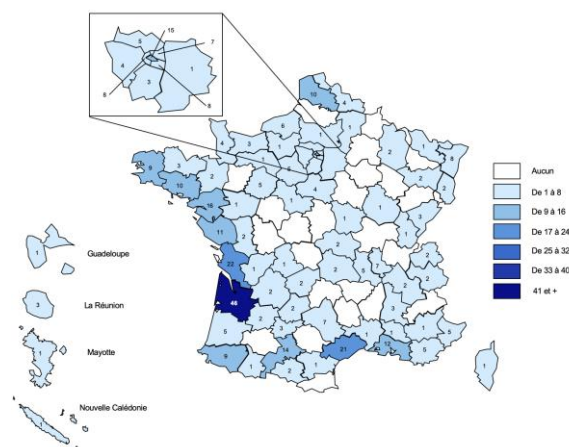
Le CNR avait activement sollicité les biologistes en 2011 en réalisant une campagne d'information et sensibilisation par le biais d'un contrôle qualité réalisé sur l'ensemble de la France auprès de 3281 laboratoires participants, et avait à cette occasion incité les laboratoires à envoyer leurs souches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

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

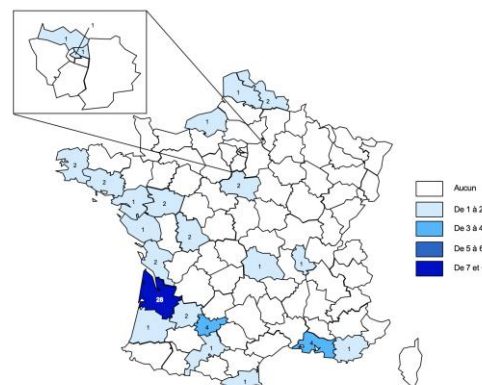
- *Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau*

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

En 2020, la distribution géographique des cas par département est représentée ci-dessous :



Distribution géographique des cas de 1995 à 2019



Distribution géographique des cas en 2020

Le CNR collabore de façon durable avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire. En 2018, le réseau de partenaires du CNR était composé de 87 correspondants avec lesquels le CNR correspondait activement depuis plusieurs années. En 2019, 22 nouveaux correspondants avaient été identifiés. En 2020, le CNR a échangé avec 13 CH et 17 LBM, répartis dans 25 départements dont 12 départements côtiers, et 9 nouveaux correspondants ont été identifiés, essentiellement des CH.

Comme observé depuis 1995, le nombre de cas est resté nettement plus élevé sur les côtes Atlantiques. A noter que les souches isolées dans le département de la Gironde, qui rapporte au CNR le plus grand nombre de cas, sont envoyées quasi exclusivement par un laboratoire de biologie multi-sites correspondant.

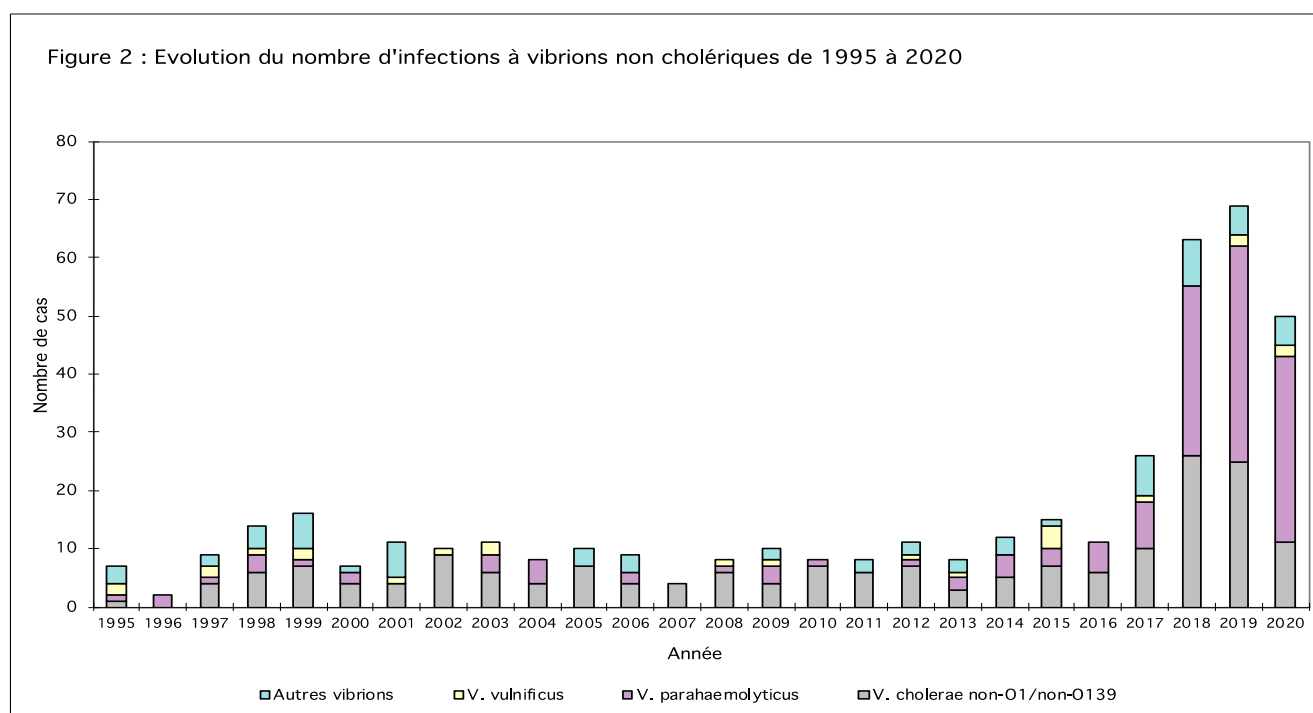
L'évolution des techniques de diagnostic mises à disposition aujourd'hui, en particulier les PCR multiplex syndromique et la spectrométrie de masse, permettent d'identifier plus facilement les *Vibrio* que les méthodes de bactériologie traditionnelles et d'améliorer ainsi l'exhaustivité du recueil de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

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

Les souches ont été isolées de sujets ayant présenté des symptômes en rapport avec la présence d'un vibriion dans le prélèvement, dont la pathologie s'est déclarée sur un territoire français, et pour lesquels l'identification du germe responsable a été effectuée ou confirmée par le CNR. Les cas pour lesquels l'exposition a été documentée sur le territoire français sont considérés comme des cas autochtones, ceux pour lesquels l'exposition a été documentée à l'étranger comme des cas importés.

### 3.2.2 Évolution et caractéristiques des infections

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



- *Caractéristiques des cas confirmés en 2020*

47 cas d'infections à vibrions non cholériques ont été confirmés ou diagnostiqués au CNR en 2020. Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.

*A noter un nombre croissant d'informations non renseignées à la fois sur les antécédents et l'exposition possible des patients, du fait du nombre croissant d'examens réalisés en LBM, n'ayant pas la notion d'infection à Vibrio à priori et la possibilité d'interroger le patient à postériori.*

- L'âge médian des cas d'infection était de 67 ans, avec des extrêmes de 10 et 99 ans. Les cas étaient majoritairement des hommes (57%).
- **5 espèces de Vibrio**, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* et *V. fluvialis* ont été à l'origine des 47 cas cliniques diagnostiqués en 2020. Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont restées les espèces prépondérantes, avec une confirmation de la progression du nombre de cas d'infections rapportées à *V. parahaemolyticus*. L'émergence de l'espèce *V. fluvialis* comme agent responsable de gastroentérites se confirme, probablement liée à sa bonne identification par les laboratoires, associée à l'évolution des techniques de diagnostic (spectrométrie de masse).
- **Les manifestations cliniques étaient majoritairement des gastroentérites**, représentant 88% des cas ; 74% d'entre eux étant associés à l'espèce *V. parahaemolyticus*, 16% à l'espèce *V. cholerae*, 5% aux espèces *V. fluvialis* (2 cas) et *V. alginolyticus* (2 cas). Les infections à *V. alginolyticus* sont généralement associées à des surinfections de plaies ou à des otites, et leur implication comme cause de gastroentérites, si elle a déjà été rapportée, reste rare. Aucune exposition n'a pu être documentée pour ces deux cas.
- **Sept cas ont présenté des formes septiques**, 5 à *V. cholerae* et 2 à *V. vulnificus*, bactériémies faisant suite à une primo-infection (gastroentérite ou surinfections de plaies) ou septicémies primaires. Six patients présentaient des terrains prédisposants. Deux cas de septicémies à *V. cholerae* ont entraîné un décès chez des patients présentant des terrains prédisposants, un cas faisant suite à une gastroentérite et un cas de septicémie primaire. Deux cas de suppurations diverses, 1 à *V. cholerae* et 1 à *V. alginolyticus* ont également été rapportés, faisant suite à un contact direct avec le milieu marin.
- 33% des cas pour lesquels l'information était disponible (13/39) ont été hospitalisés, 83% présentaient un terrain prédisposant, âge, diabète, immunosuppression, antécédents de pathologies digestives, affections cutanées, néphropathie. Des terrains prédisposants ont été mis en évidence chez des personnes non hospitalisées (9 cas sur 22 documentés), traitement anti-acide, immunodépression, diabète, alcoolisme, antécédents de pathologies digestives.
- Toutes les infections à *V. parahaemolyticus* (n=32) étaient des gastroentérites, la consommation de produits de la mer a été établie pour tous les cas renseignés (n=28). La diminution du nombre de cas hospitalisés observée dans les années précédentes a été confirmée en 2020, seul un cas a été hospitalisé sur les 25 cas pour lesquels l'information était disponible.
- Les cas d'évolution les plus défavorables ont été liés à l'espèce *V. cholerae*, qui a été associée à deux décès. L'un des deux a fait suite à une gastroentérite, septicémie évoluant en choc septique, le second à une septicémie primaire. Les deux patients présentaient des facteurs de risque. Aucune exposition n'a été retrouvée dans ces deux cas.

- Distribution géographique des cas :
  - Parmi les cas d'infection pour lesquels l'information était disponible, trois ont été contractés à l'étranger, entre février et mars 2020, un cas d'infection à *V. parahaemolyticus* et deux cas d'infections à *V. cholerae*, soit 6,6% des cas (n=45). Ce nombre est nettement inférieur à ce qui a été observés les années précédentes, puisque 30% des cas étaient importés en 2019. Cette diminution est probablement due au contexte sanitaire ayant interdit tout voyage à l'étranger sur la majeure partie de l'année.
  - Les cas importés se sont manifestés par des gastroentérites faisant suite à la consommation de produits de la mer. Les deux cas d'infection à *V. cholerae* ont été hospitalisés, l'un d'entre eux a été à l'origine d'une alerte pour suspicion de choléra. Le cas d'infection à *V. parahaemolyticus* était lié à une souche appartenant à un clone pandémique de l'espèce.
  - Les cas autochtones se sont distribués sur une large partie du territoire, avec une plus grande fréquence sur la côte atlantique, ce qui est observé de façon récurrente depuis 1995.
- La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année (juin à septembre).

La distribution des espèces isolées en fonction des syndromes est présentée dans le *Tableau 9*.



**Tableau 9 - Distribution des espèces de *Vibrio non cholériques* isolées chez l'homme sur le territoire français en 2020 rapportées au CNR - Syndromes associés et contexte clinique et épidémiologique des infections**

Espèce	Nombre de souches reçues au CNR	Formes cliniques (nbre de cas)	Hospitalisation (nbre de cas)	Terrain prédisposant (nbre de cas)	Décès (nbre)	Contexte ou source de contamination
<i>V. cholerae</i> (non-O1/non-O139)	<b>11*</b>	Gastroentérite (4)	oui (4)	oui (2)	0	Voyage Étranger (2), conso. produits de la mer (3), ND (1)
		Gastroentérite + septicémie (3)	oui (3)	oui (3)	1	Conso. produits de la mer (1), consommation eau d'un puit (1), NR (1)
		Infection cutanée (1)	oui (1)	non	0	NR (1)
		Plaie + septicémie (1)	oui (1)	non	0	Utilisation d'eau stagnante (1)
		Septicémie primaire (1)	oui (1)	oui (1)	1	ND (1)
<i>V. parahaemolyticus</i>	<b>32</b>	Gastroentérite (32)	oui (1)	oui (11)	0	Conso. produits de la mer (24), NR (4), ND (4)
<i>V. fluvialis</i>	<b>2**</b>	Gastroentérite (2)	non	non	0 0	NR (1), ND (1)
<i>V. alginolyticus</i>	<b>3</b>	Gastroentérite (2)	non	non	0	ND (2)
		Infection cutanée (1)	non	oui (1)	0	Contact avec l'eau de mer (1)
<i>V. vulnificus</i>	<b>2</b>	Infection cutanée, septicémie (2)	oui (2)	oui (2)	0	Contact avec le milieu marin (2)
<b>Total de souches</b>	<b>50</b>					
<b>Total de cas</b>	<b>47</b>				<b>2</b>	

\* correspondant à 10 cas cliniques, 2 souches étant isolées d'un même patient de deux sites anatomiques

\*\* souches isolées en association avec *V. parahaemolyticus*

NR : Non Renseigné (pas d'information transmise)

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

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

#### Caractérisation des souches analysées en 2020

- ➔ Aucune des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origine clinique ne possédait les gènes de la toxine cholérique, ni les gènes du récepteur du phage CTX $\phi$  (*tcpA*). Deux souches possédaient le gène *stn*, codant pour une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*. Toutes possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la grande majorité des souches cliniques, quels que soient les syndromes associés, et chez les souches environnementales.
- ➔ 27 des 32 souches (84%) de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines TDH et/ou TRH, classiquement associées au pouvoir pathogène de l'espèce dont les manifestations cliniques sont habituellement des gastroentérites. A noter cependant que 5 souches à l'origine de diarrhées aiguës ne possédaient pas les gènes des hémolysines TDH et TRH.
- ➔ Une souche importée des Philippines appartenait au clone pandémique O3:K6, caractérisé par la présence des gènes codant l'hémolysine TDH et les gènes *orf8* et *toxRS*.

#### Sensibilité aux anti infectieux

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

**Tableau 10 : Résistance aux antibactériens des souches de VNC isolées en France - 2020**

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	CXT	S	O129
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139 (n=11)	10	1	-	-	1	-	1	-	11	11	1	-	-	-	1	1
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=32)	30	-	-	22	1	-	-	-	27	29	-	-	-	-	19	1
<i>V. fluvialis</i> (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>V. alginolyticus</i> (n=3)	1	-	-	3	-	(2)	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i> (n=2)	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-

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

( ) : intermédiaire

- ➔ Les souches de VNC isolées en France restent globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés.
- ➔ Les souches de *V. cholerae* et de *V. parahaemolyticus* sont essentiellement résistantes aux sulfamides et aux polymyxines.
- ➔ La résistance des souches de *V. parahaemolyticus* à l'ampicilline classiquement décrite pour cette espèce a été observée pour 69% des souches par la méthode de diffusion en gélose.
- ➔ La souche de *V. parahaemolyticus* appartenant au clone pandémique O3:K6, originaire des Philippines n'est pas apparue plus résistante aux antibiotiques testés que les souches associées aux cas autochtones.

- ➔ Une souche de *V. cholerae* importée du Kenya s'est montrée résistante aux sulfamides, au triméthoprime et à la streptomycine.

Le CNR poursuit la détermination phénotypique de la résistance aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé et en parallèle par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide par la technique semi-automatisée sur microplaques Sensititre. Dans 92% des cas, les résultats ont été parfaitement corrélés, des discordances majeures ont cependant été observées pour l'ampicilline et les sulfamides, la lecture des diamètres de diffusion révélant un plus grand nombre de souches résistantes que la mesure des CMI. L'interprétation de la résistance telle que présentée dans le tableau 10 est donc à considérer avec prudence pour ces deux antibiotiques, en l'absence de résultats complémentaires.

#### *3.2.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux*

Depuis 1995, le CNRVC a mis en place un système de surveillance des infections françaises à vibrions non cholériques. Il est demandé à tout biologiste envoyant un échantillon au CNR de remplir une fiche détaillée de recueil de renseignements cliniques et épidémiologiques sur l'exposition du patient, concernant notamment l'existence d'un terrain prédisposant et la notion ou non de contact avec la mer ou l'ingestion de produits de la mer. Cette fiche d'accompagnement de souches, remaniée en 2019, est accessible en ligne sur le site internet du CNR, <https://www.pasteur.fr/fr/file/3052/download>

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

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

#### *3.2.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance*

- Le CNR avait participé en 2018 à une enquête de surveillance microbiologique, envoyée par le CNR des *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, visant à évaluer le processus national de surveillance microbiologique avec l'arrivée récente des kits PCR multiplex pour les pathogènes entériques. Sur les 172 laboratoires ayant répondu, 29 utilisaient un panel PCR multiplex entérique incluant *Vibrio*, 6 en milieu hospitalier et 23 en LBM. Les laboratoires ayant répondu à l'enquête n'étant pas représentatifs des correspondants du CNRVC (seuls 15 d'entre eux avaient participé à l'enquête), le CNR avait mené en parallèle en 2018 une enquête sur les méthodes de diagnostic des *Vibrio* auprès de ses propres laboratoires correspondants depuis 2016. Sur les 87 laboratoires identifiés, répartis en 40 CH et 47 LBM, seuls 7 n'utilisaient ni la spectrométrie de masse ni la PCR multiplex syndromique, les autres laboratoires utilisant au moins l'un des deux systèmes. Parmi les 22 nouveaux correspondants identifiés en 2019, 17 étaient équipés de systèmes de PCR multiplex syndromiques et/ou de spectrométrie de masse. La totalité des correspondants du CNR en 2020 (à l'exception d'un correspondant ayant envoyé

un échantillon de selles sans analyse préalable) avaient fait une première orientation *Vibrio* par PCR multiplex syndromique.

- Le CNR et Santé Publique France ont poursuivi l'analyse des données de surveillance cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des cas d'infections à VNC confirmés depuis 1995 en France à partir des données collectées par le CNRVC. Cette étude, initialement menée sur la période 1995-2016, avait été prolongée sur 2017, puis jusqu'à fin 2019, afin de refléter l'évolution majeure de la courbe épidémiologique. Le contexte de la pandémie de Covid 19 a obligé à reporter de quelques mois la finalisation de la rédaction des résultats de cette étude.
- Le CNR apporte un soutien aux laboratoires utilisant la PCR syndromique, par l'étude, dans certains contextes spécifiques et après accord avec le laboratoire correspondant, d'échantillons de selles pour lesquels est observé un signal PCR positif. Sur 71 échantillons testés de 2017 à 2020, seuls 30% ont été positifs en culture.

#### 4/ Alerte :

##### *4.1. Procédure d'alerte*

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

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

[https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa\\_12197.do](https://www.formulaires.modernisation.gouv.fr/gf/cerfa_12197.do)

- La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNR.

Les médecins ou les biologistes déclarants notifient le cas au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS du lieu d'exercice au moyen de la fiche de DO choléra.

De son côté, le CNR déclare l'identification d'une souche de vibrion cholérique sur le territoire français (France Métropolitaine, DOM et Mayotte) à la DGS, Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires et sociales (CORRUS) et à Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail et par courrier.

Le ministère de la Santé et des Solidarités peut être amené à assurer la déclaration internationale des cas confirmés à l'OMS, si le cas entre dans les critères de déclaration du Règlement Sanitaire International en vigueur.

• Dans le cas des infections à vibrions non cholériques, le CNR informe systématiquement Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail ou par téléphone, en cas de phénomène

anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (formes cliniques inhabituelles, souches atypiques, infections à *V. vulnificus*,...).

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

Quatre signalements pour suspicion de cas de choléra ont été faits en 2020 par des biologistes aux ARS, qui ont elles-mêmes alerté Santé publique France et le CNR.

- Le CNR a été informé par Santé publique France de deux signalements de suspicion de choléra par l'ARS Nouvelle Aquitaine en juillet 2020.

- L'ARS Pays de Loire et le CNR ont été contactés pour une suspicion de choléra, également en juillet 2020.

- Le CNR a été contacté par l'ARS de Normandie en septembre 2020 pour une suspicion de choléra.

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

La suspicion se fait sur la base de la clinique (diarrhées) et d'un contexte épidémiologique compatible (retour d'une zone d'endémie ou d'épidémie cholérique).

Aucune des alertes n'a été confirmée.

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

#### *5.1. Conseils et expertise aux professionnels de santé*

##### *5.1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé*

Les cours donnés par les membres du CNR s'adressent à des 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, 04/02/2020 (M-L Quilici, 2 h).
- Cours Master 2, Université Paris 6, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. "Épidémiologie du Choléra", Faculté de Médecine Saint-Antoine, 22/09/2020 (M-L Quilici, 2 h).

### 5.1.2 Accueil de stagiaires

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

Stagiaires accueillis en 2020 :

Dans le cadre des mesures sanitaires, la présence des personnes sur le campus a été fortement réduite et le CNR n'a pu accueillir qu'une stagiaire en 2020 :

- Noémie Chauvin, 2e année de BTS Bioanalyses et contrôles, stage du 26 octobre au 18 décembre 2020 sur l'étude de la résistance aux antibiotiques de souches environnementales de *V. cholerae*. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un rapport, « Comparaison des profils de résistance aux antibiotiques de souches *V. cholerae* et définition de critères d'interprétation pour le genre *Vibrio* ».

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

### 5.1.3 Guides élaborés

- Quilici M.-L, Robert-Pillot A. Chapitre *Vibrio*. In : Précis de bactériologie clinique, 3e Edition, Ed. ESKA 2018, Chap 67, 28 p.
- Un article à destination des biologistes a été publié dans la revue Spectra Biologie, portant sur la recherche de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les selles en absence de milieux spécifiques, Quilici ML, Robert-Pillot A. *Vibrio* et gastroentérites : vigilance et bonnes pratiques. Spectra Biologie n° 215, Mai 2015, 67-70.
- Une revue sur « Les Infections à Vibrions non cholériques » a été rédigée pour le traité Maladies Infectieuses de l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale; elle traite de parties techniques concernant l'identification des souches, en particulier les méthodes de fabrication des milieux utiles au diagnostic Quilici ML, Robert-Pillot A. Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 2011, 8- 026-F-15, 2011, 12 p.
- Un article sur le diagnostic bactériologique du choléra a été rédigé pour la « Revue francophone des laboratoires », dans le cadre d'un numéro spécial consacré à la Pathologie Tropicale, Quilici ML, Le diagnostic bactériologique du choléra, (Elsevier Masson SAS), 2011, 431, 51-65.
- Un « Protocole provisoire de détection de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer », rédigé en collaboration avec le Laboratoire d'Études et de Recherche en Environnement et Santé, École Nationale de la Santé Publique, Rennes, et le Laboratoire d'Études et de Recherches sur les Produits de la Pêche, AFSSA-Site de Boulogne-sur-Mer, a été diffusé auprès des laboratoires vétérinaires départementaux dès 2003. Il a été et remis à jour en 2010, et est disponible sur le site internet du CNR, <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-reference-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-des-vibrions-et-du-cholera>.

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

(i)auprès des partenaires :

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

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

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

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

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

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

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

### 5.1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé

Le CNR est régulièrement sollicité par des biologistes pour des demandes de méthodes ou de réactifs de référence. Les informations demandées sont généralement transmises par mail. Un alias [vibrions@pasteur.fr](mailto:vibrions@pasteur.fr) a été mis en place pour la réception des demandes, par ailleurs la responsable du CNR est joignable sur son téléphone portable qui est communiqué aux correspondants par retour de mails ou par la messagerie téléphonique du CNR. Le volume d'activités est extrêmement variable et fonction de l'actualité.

### 5.2. Conseils et expertises aux autorités sanitaires nationales et internationales

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

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

- Le CNR a participé à une réunion d'échange sur les vibrions non cholériques organisée par la DGAL, le 22 juin 2020, avec des partenaires de l'ANSES/LSA Boulogne (LNR *Vibrio*), de la DGS, de l'Ifremer/ LSEM (LNR coquillages), de la DGAL/BPMED. Une présentation a été faite par le CNR sur l'état des connaissances générales sur les espèces de *Vibrio* pathogènes pour l'Homme et les méthodes de diagnostic. L'objectif était de discuter de perspectives concernant une éventuelle réglementation européenne pour la gestion des lots contaminés et de discuter de plans exploratoires en France.

- Le CNR a échangé et transmis des informations aux ARS qui l'ont sollicité en 2020 suite aux alertes choléra :

- ARS des Pays de Loire
- ARS Nouvelle-Aquitaine
- ARS Auvergne Rhône Alpes
- ARS de Normandie

- La responsable du CNR est leader du "Surveillance Lab Working group" de la GTFCC qui travaille spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Les objectifs de ce groupe sont i) de faire un point et donner des recommandations aux pays par le biais de « briefing notes » sur - les tests de diagnostic rapide du choléra, - les méthodes de typage moléculaire permettant la surveillance des souches, ii) définir les lacunes et les besoins des pays d'endémie cholérique en termes de capacités de laboratoire, iii) définir les étapes nécessaires à la mise en place d'un réseau de laboratoires au niveau global. Elle a participé en 2020 à plus de 10 réunions du groupe de travail international « Surveillance » de la GTFCC.



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

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

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

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

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

### *6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2020*

#### **• La septième pandémie de choléra en Europe revisitée par la génomique microbienne, collaboration UBPE/CNRVC/Institut Cantacuzène, Roumanie,**

En 1970, la septième pandémie de choléra (7 P) a atteint l'Afrique et l'Europe. Entre 1970 et 2011, plusieurs pays européens ont signalé des épidémies de choléra allant de quelques cas à plus de 2 000 cas. Une analyse WGS de 1 324 isolats de *V. cholerae* El Tor (7 PET) 7 P, dont 172 provenant de cas autochtones sporadiques ou de flambées de choléra survenues entre 1970 et 2011 en Europe, a permis de mieux comprendre la propagation spatiale et temporelle de cet agent pathogène au cours de la septième pandémie et souligné le rôle de l'homme dans sa dissémination mondiale. Cette étude a été publiée en 2020 (Nat Commun. 2020 Oct 22;11(1):5347. doi: 10.1038/s41467-020-19185-y. PMID: 33093464; PMCID: PMC7582136).

#### **• Analyse génomique des souches de la 7ème pandémie cholérique en RCA :**

*collaboration UBPE/CNRVC/Institut Pasteur de Bangui*

Quatre épidémies de choléra ont été signalées en République centrafricaine entre 1997 et 2016 ; 30 isolats de *V. cholerae* O1 avaient été reçus au CNR. Le WGS a permis de comprendre les voies de propagation des souches responsables de ces épidémies, originaires d'Afrique de l'Ouest ou de la région des Grands Lacs africains. Les parties sud et sud-est de la RCA sont des zones à plus haut risque pour les épidémies de choléra, en particulier lorsque des cas sont signalés dans la partie occidentale de la RDC. Ces résultats soulignent la nécessité d'un système de surveillance efficace, et d'actions de communication coordonnées sur le choléra qui ciblent les professionnels de santé et les populations vivant le long de la rivière Oubangui, pour prévenir et contrôler les épidémies de choléra en RCA. Cette étude a été acceptée pour publication en 2020 (doi: 10.3201/eid2701.200375. PMID: 33350910; PMCID: PMC7774542.)

#### **• Analyse des vagues épidémiques successives de choléra au Sud Soudan de 2014 à 2017 :** *collaboration Ministry of Health South Sudan, WHO, Epicentre, Johns Hopkins University, Médecins Sans Frontières, Institut Pasteur.*

Le Sud-Soudan a été frappé par de grandes épidémies de choléra entre 2014 et 2017. Les données microbiologiques (MLVA, WGS) et épidémiologiques (climat, comportement humain, campagnes de

vaccination) ont été conjointement analysées pour essayer de mieux comprendre comment et pourquoi le choléra se propage dans cette région et améliorer les outils d'évaluation des risques en se basant sur des données factuelles. Le contrôle des épidémies dans des endroits comme le Sud-Soudan est l'un des domaines prioritaires de la feuille de route sur le choléra du groupe de travail mondial de la GTFCC dirigée par l'OMS (*Lancet Planet Health*, 2020, doi: 10.1016/S2542-5196(20)30255-2).

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

*CNRVC/Unité BPE*

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

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

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

Cette étude visait à apporter des données participant à la standardisation et à la définition de critères d'interprétation pour la réalisation des antibiogrammes pour *V. parahaemolyticus*, et des informations sur l'impact éventuel de souches alimentaires résistantes en santé publique après comparaison des profils de résistance aux antibiotiques des souches de *V. parahaemolyticus* isolées d'aliments et de zones géographiques diverse, et de cas humains. La résistance aux antibiotiques de 152 souches de *V. parahaemolyticus*, 76 d'origine clinique et 76 d'origine alimentaire ou environnementale, a été caractérisée par la méthode de l'antibiogramme par diffusion et la mesure de la CMI. Les profils ont été comparés pour déterminer éventuellement des zones « à risque » d'où seraient isolées davantage de souches résistantes du fait d'activités d'aquaculture, et identifier une potentielle corrélation entre la résistance aux antibiotiques et la sévérité des infections chez l'homme. Les profils de résistance aux antibiotiques ont été comparables entre les souches d'origine humaine, alimentaire ou environnementale. Peu de souches d'origine clinique se sont révélées résistantes aux antibiotiques et il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'expression du pouvoir pathogène et le niveau de résistance aux antibiotiques. Les mêmes observations ont été faites pour les souches d'origine alimentaire ou environnementale pour lesquelles on n'a pas mis pas en évidence de corrélation entre les origines géographique et écologique, le niveau de résistance aux antibiotiques et la présence des facteurs de pathogénicité. Cette étude est poursuivie par une approche génomique permettant la recherche des gènes de résistance.

- **Caractérisation génomique des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origines écologiques diverses :** la reconnaissance du rôle des vibriens en pathologie humaine est surtout due à l'existence du vibriion cholérique, *V. cholerae* des sérogroupes O1 ou O139. Cependant les souches d'autres sérogroupes peuvent être à l'origine de pathologies sévères et rapidement évolutives chez des patients immunodéprimés. Contrairement aux souches de vibriions cholériques (*V. cholerae* O1 et O139), les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 sont génétiquement très hétérogènes, et aucun facteur de pathogénicité n'a été à ce jour associé aux souches responsables de pathologies chez l'homme. Les infections font suite à un contact direct avec l'eau ou à la consommation de produits de

la mer dans lesquels les *Vibrio* sont naturellement présents. Actuellement, en l'absence de marqueurs moléculaires spécifiquement associés à l'expression du pouvoir pathogène chez l'homme, rien ne permet aujourd'hui de différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes. Le CNR dispose d'une collection de plus de 350 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées chez l'homme (plus de 160 souches cliniques d'origines géographiques diverses et associées à différents syndromes) ou dans les aliments, qui sont séquencées dans le but de décrire la structure des populations, d'identifier les facteurs de pathogénicité, de créer des banques de données génomiques et de développer un schéma Whole genome MLST ; 258 souches ont été séquencées, caractérisées par leur séro groupe pour une partie (collaboration avec le National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japon), analysées par schéma MLST in silico.

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

• **Développement d'une base de données génomiques et protéomiques des différentes espèces de *Vibrio*, confirmation de leur identification par spectrométrie de masse**

Dans le cadre de sa mission de surveillance, le CNR doit identifier ou confirmer les différentes espèces de vibrions à l'origine de pathologies chez l'Homme, plus particulièrement l'espèce *V. cholerae* pour laquelle il est important de différencier rapidement les vibrions cholériques des vibrions non cholériques. A l'instar des Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) qui utilisent depuis quelques années la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation -Time Of Flight) basée sur l'analyse protéomique pour l'identification des bactéries en routine, l'Institut Pasteur est équipé de l'appareil Bruker qui ne possède pas dans sa base les données nécessaires à l'identification de l'espèce *V. cholerae*.

Grâce au travail réalisé en 2019 par un étudiant en Licence Professionnelle lors de son stage d'apprentissage au CNRVC, le contenu de la base de données existante pour les autres espèces de *Vibrio* a été enrichie avec environ 400 spectres de souches de *V. cholerae* d'origine géographique différentes et associées à des syndromes cliniques divers.

L'identification de toutes les souches reçues au CNRVC en 2020 et étudiées par les techniques de bactériologie classique et moléculaire a été confirmée par spectrométrie de masse, notamment l'espèce *V. cholerae*. En termes de réduction de délai de réponse, cette technique est particulièrement utile au CNR comme alternative à l'étude moléculaire des *Vibrio* pathogènes peu fréquemment rencontrés dont l'identification nécessite le séquençage des gènes codant pour l'ARN 16S et du gène *rpoB*.

Il reste encore nécessaire d'améliorer le contenu de la base de données. Ce travail de référence est réalisé en complémentarité du séquençage génomique pour enrichir les bases de données protéomiques d'identification des *Vibrio* pathogènes peu fréquents.

• **Une étude des souches de *V. vulnificus***, incluant toute la collection de souches d'origine humaine du CNR (30) et un panel de souches alimentaires, a été initiée en 2020. Les souches ont été sélectionnées en fonction de leur origine géographique, de leur année d'isolement et de la matrice alimentaire dont elles sont issues. Les travaux menés visent à analyser et comparer les phénotypes /génotypes de résistance des souches, identifier des marqueurs de virulence prédictifs de la pathogénicité et repérer dans les isolats environnementaux les souches à potentiel infectieux.

## • Histoire de l'évolution du biotype classique de *V. cholerae* O1.

Caroline Rouard, UBPE, CNRVC

Le biotype classique de *V. cholerae* O1 a été responsable des six premières pandémies de choléra, mais il est relativement peu connu, avec seulement 20 séquences génomiques (dont 50% proviennent de la même zone géographique) disponibles dans les bases de données publiques. Le biotype classique, remplacé par le biotype ElTor depuis le début de la septième pandémie, a été peu isolé au cours des dernières décennies.

Une analyse génomique comparative et phylogéographique à grande échelle de ce pathogène est en cours, afin d'améliorer la compréhension de l'évolution de son génome, de sa propagation et de son extinction. 177 génomes de biotypes classiques issus de souches de la collection du CNR (isolés entre 1926 et 1987) et d'isolats d'autres collections internationales sont analysés, avec un focus particulier sur la coévolution du système CRISPR et des gènes de résistance aux antibiotiques. L'étude génomique est complétée par une analyse phénotypique à haut débit avec le système Omnilog.

### 6.2 Liste des publications et communications

#### - Publications nationales

Chalmin S, Lièvre N, Mérillon C, Gallienne E, Leroux V, Léonard PY, Quilici ML, Pérez B. Intérêt de l'approche syndromique dans le diagnostic d'un cas importé de choléra [Value of the syndromic approach for the diagnosis of an imported case of cholera]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2020 Apr 1;78(2):181-186. French. doi: 10.1684/abc.2020.1539. PMID: 32319946.

#### - Publications internationales

Breurec S, Franck T, Njamkepo E, Mbecko JR, Rauzier J, Sanke-Waïgana H, Kamwiziku G, Piarroux R, Quilici ML, Weill FX. Seventh Pandemic *Vibrio cholerae* O1 Sublineages, Central African Republic. *Emerg Infect Dis*. 2021 Jan;27(1):262-266. doi: 10.3201/eid2701.200375. PMID: 33350910; PMCID: PMC7774542.

Jones FK, Wamala JF, Rumunu J, Mawien PN, Kol MT, Wohl S, Deng L, Pezzoli L, Omar LH, Lessler J, Quilici ML, Luquero FJ, Azman AS. Successive epidemic waves of cholera in South Sudan between 2014 and 2017: a descriptive epidemiological study. *Lancet Planet Health*. 2020 Dec;4(12):e577-e587. doi: 10.1016/S2542-5196(20)30255-2. PMID: 33278375; PMCID: PMC7750463.

Oprea M, Njamkepo E, Cristea D, Zhukova A, Clark CG, Kravetz AN, Monakhova E, Ciontea AS, Cojocaru R, Rauzier J, Damian M, Gascuel O, Quilici ML, Weill FX. The seventh pandemic of cholera in Europe revisited by microbial genomics. *Nat Commun*. 2020 Oct 22;11(1):5347. doi: 10.1038/s41467-020-19185-y. PMID: 33093464; PMCID: PMC7582136.

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

Copin S, Mouglin J, Ragueneau V, Robert-Pillot A, Midelet G, Grard T, Bonnin-Jusserand M. Ethidium and propidium monoazide: comparison of potential toxicity on *Vibrio* sp. Viability. Lett Appl Microbiol. Epub 2020 Nov 15. PMID: 33058219 doi.org/10.1111/lam.13412.

- *Conférences*

7th Annual Meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 20 et 21 octobre 2020, virtual meeting, " Update from the GTFCC Laboratory Working Group", ML Quilici.

Virtual meeting, Quart d'heure Pasteur Médecine : Peste et choléra, mardi 17 novembre 2020

- *Communications à destination du public,*

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

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

- Des chercheurs traquent l'origine des épidémies en Europe depuis 1970, 23/10/2020, <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/cholera-chercheurs-traquent-origine-epidemies-europe-1970>
- *L'épidémie de choléra au Yémen décryptée grâce à la génomique*, 03/01/2019, <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/epidemie-cholera-au-yemen-decryptee-grace-genomique>
- *Est-il possible de tracer les épidémies de choléra ?* 06/01/2019 <https://www.la-croix.com/Monde/Est-possible-tracer-epidemies-cholera-2019-01-06-1200993450>
- Dossier Choléra : un fléau encore à l'origine d'épidémies majeures, 11/01/2018 <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/dossiers/cholera-fleau-encore-origine-epidemies-majeures>
- Choléra : la compréhension du lien entre les grandes épidémies mondiales ouvre la voie à une meilleure stratégie de lutte, 10/11/2017 <https://www.pasteur.fr/fr/espace-presse/documents-presse/cholera-comprehension-du-lien-entre-grandes-epidemies-mondiales-ouvre-voie-meilleure-strategie-lutte>

Ces actualités sont relayées sur les réseaux sociaux, et dans les newsletters institutionnelles externes.

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

Un dossier *Choléra : symptômes, traitements, vaccin contre cette maladie diarrhéique* <https://www.medisite.fr/cholera-symptomes-traitements-vaccin-contre-cette-maladie-diarrheique.5557864.html> a été publié par Jasmine Saunier, journaliste santé, le 17/03/2020.

Le « Quart d'heure Pasteur Médecine : Peste et choléra » a été publié sur YouTube, <https://www.youtube.com/watch?v=tejNZXYmRzU>

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

- Dans le domaine de la santé alimentaire, le CNR collabore principalement, et depuis de nombreuses années, avec le Laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-Sur-Mer, désigné en 2011 LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche.
  - Le CNR avait été désigné comme laboratoire référent, par une note de service de la DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255 du 28 octobre 2004 (*Annexe 2*), pour la « Gestion des lots de produits de la pêche importés trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles en poste d'inspection frontalier », conjointement à ce laboratoire.
  - Le CNR et le laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-sur-Mer ont participé à l'élaboration d'un protocole expérimental pour la recherche de *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* dans les produits de la mer, en collaboration avec le laboratoire d'Étude et de Recherche en Environnement et Santé de l'École Nationale de la Santé Publique à Rennes, diffusé aux Laboratoires Départementaux Vétérinaires impliqués dans la recherche des vibrions dans les produits de la pêche, dans l'attente d'une norme ISO.
  - L'ANSES et le CNR communiquent régulièrement et échangent des souches pour expertise.
  - Par ailleurs l'ANSES et le CNR sont partenaires depuis 2006 dans le cadre de plusieurs projets de recherche financés concernant les Risques sanitaires émergents dans les produits de la mer.
- Dans le domaine de l'environnement, le CNR peut collaborer avec l'IFREMER, LNR Microbiologie des coquillages, pour des confirmations d'identification et caractérisation de souches de *Vibrio*, dans le cadre d'enquêtes ponctuelles.
- En 2013 et 2014, le CNR, le LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche de l'ANSES et le LNR Microbiologie des coquillages de l'IFREMER avaient été sollicités conjointement par la DGAL pour la rédaction d'une note de service concernant la « conformité des lots de produits de la pêche et de coquillages trouvés contaminés par des *Vibrio* suite à des contrôles officiels ». Les données de surveillance du CNR ont participé à la mise à jour de cette note sous forme d'une instruction technique concernant la gestion de lots de produits aquatiques contaminés publiée par le bureau des produits de la mer et d'eau douce, DGAL, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, DGAL/SDSSA/2019-486 du 02/07/2019.
- Le CNR, l'ANSES et l'IFREMER ont participé collectivement à la rédaction de la Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, vibrions entéropathogènes : *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 et *Vibrio vulnificus*, présentée au CES Biorisk de l'ANSES en 2018 et publiée en 2019.
- En 2020, le CNR a été sollicité par un laboratoire d'hygiène et environnement au sein du CHT de Nouvelle-Calédonie, qui travaille également avec des sociétés extérieures, pour la confirmation d'identification d'échantillons alimentaires et environnementaux. Des échanges ont également été effectués avec la DDAS locale quant à l'interprétation de la présence de *V. cholerae* dans l'environnement.

## 8/ Programme d'activité pour 2021-2022

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

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

Les activités de recherche en cours présentées au point 6/ de ce rapport seront poursuivies, en particulier :

- La caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 responsables de pathologies chez l'homme, leur comparaison avec des souches alimentaires ou environnementales d'origines géographiques diverses, avec comme objectif l'identification de marqueurs permettant l'amélioration de la prévention des infections.
- Le typage des souches de *Vibrio* par l'utilisation de la spectroscopie infrarouge (appareil IR Biotyper de Bruker) capable d'analyser directement les sucres de surface.
- La validation de la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide par la technique Sensititre pour les *Vibrio*, avec pour objectif à terme de participer à la détermination de critères d'interprétation spécifiques aux *Vibrio*.

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

## **ANNEXES**

### *Annexe 1 : Missions et organisation du CNR*

- 1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR*
- 1.2 Organisation du CNR*
- 1.3 Locaux et équipements*
- 1.4 Collections de matériel biologique*
- 1.5 Démarche qualité du laboratoire*

### *Annexe 2 : Capacités techniques du CNR*

- 2.1 Techniques de référence*
- 2.2 Techniques recommandées par le CNR*



*1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR*

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

## Cahiers des charges spécifiques du CNR

### *Vibrions et choléra*

---

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

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

#### **Pour le Vibron cholérique**

---

1. Apporter une expertise microbiologique :

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

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

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

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

## **Pour les vibrions non cholériques**

---

1. Apporter une expertise microbiologique :
  - apporter une expertise aux laboratoires de biologie médicale pour l'identification et le typage des souches de Vibrions (espèces peu courantes, rarement isolées par ces laboratoires),
  - diffuser les informations et techniques visant à identifier les vibrions halophiles (*V. parahaemolyticus*) dans un contexte de toxi-infection alimentaire d'origine halieutique ou marine.
  
2. Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Institut de veille sanitaire :
  - en développant un réseau de laboratoires et en recensant les cas diagnostiqués en France et leurs principales caractéristiques,
  - en contribuant aux réseaux de surveillance internationaux,
  - en participant à l'investigation d'épisodes de cas groupés (typage de souches, comparaison de souches isolées chez les malades et dans d'autres sources) ou d'autres événements inhabituels,
  - en collaborant avec les acteurs de la sécurité alimentaire (Ministère de l'Agriculture et de la pêche, l'Anses, la DGCCRF, etc.) et avec les laboratoires spécialisés en hygiène alimentaire ou microbiologie environnementale.
  
3. Contribuer à l'alerte en signalant à l'Institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas ; apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

## Annexe 1: Missions et organisation du CNR

### 1.2 Organisation du CNR

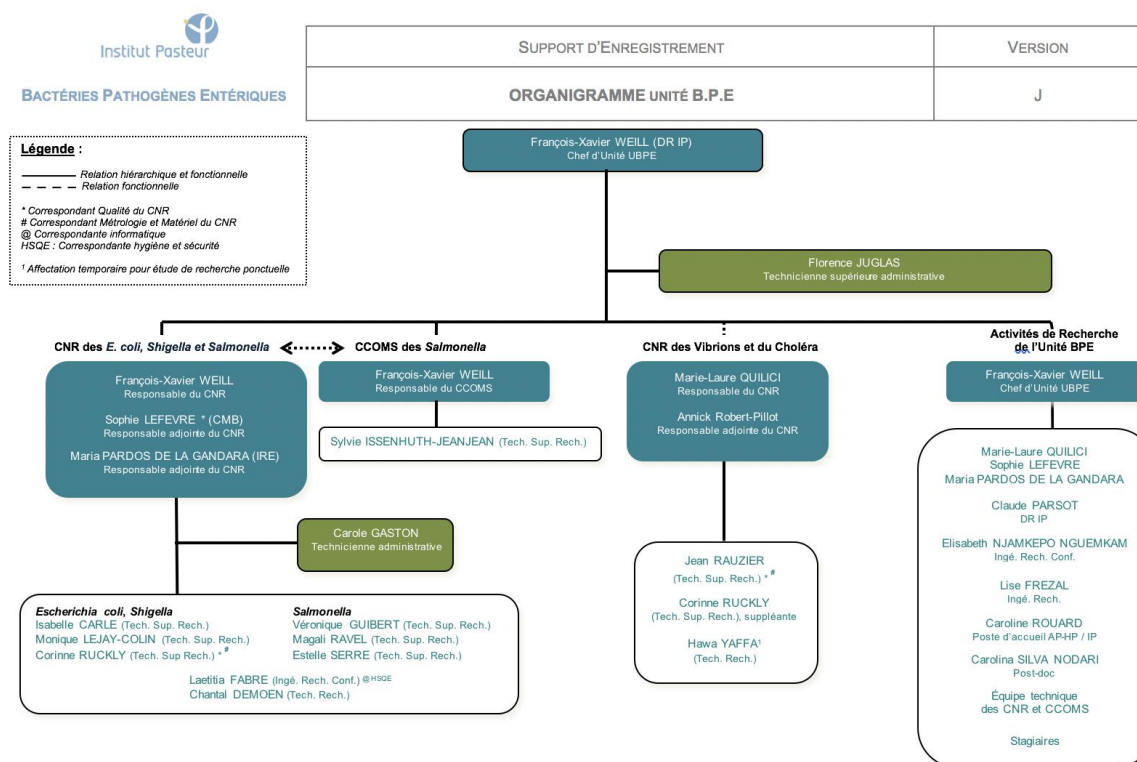
Le CNR fait partie de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques (BPE), regroupant deux Centres Nationaux de Référence, le CNR *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Shigella*, et le CNR *Vibrio* et Choléra, et un centre collaborateur OMS *Salmonella*.

#### Effectif pour le CNR par catégories de fonctions

Nom - prénom	Qualifications*	ETP
QUILICI Marie-Laure	Scientifique (Responsable du CNR)	0,40
ROBERT-PILLOT Annick	Scientifique (Responsable-adjointe)	0,20
RAUZIER Jean*	Technicien supérieur de recherche	0,65
ACCOU-DEMARTIN Marie	Technicienne supérieure de recherche	0,10
*RUCKLY Corinne	Technicienne supérieure de recherche	
JUGLAS Florence	Assistante	0,25
<b>TOTAL 2020</b>		<b>1,6</b>

\*A noter que la présence sur site du technicien du CNR a été réduite du fait des confinements successifs.

#### Organigramme de l'Unité BPE



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

### *1.3 Locaux et équipements*

#### *1.3-1 Locaux*

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

#### Plan 1, 3<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biotop

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

#### Plan 2, 1<sup>er</sup> étage du bâtiment Biotop

Au 1<sup>er</sup> étage, des locaux (14, 14A, 14B, 15 et 15A, partagés avec l'Unité des Spirochètes) de 33,1 m<sup>2</sup> permettent de réaliser la PCR « marche en avant » dans le cadre de l'accréditation.

#### Plan 3, 4<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biotop

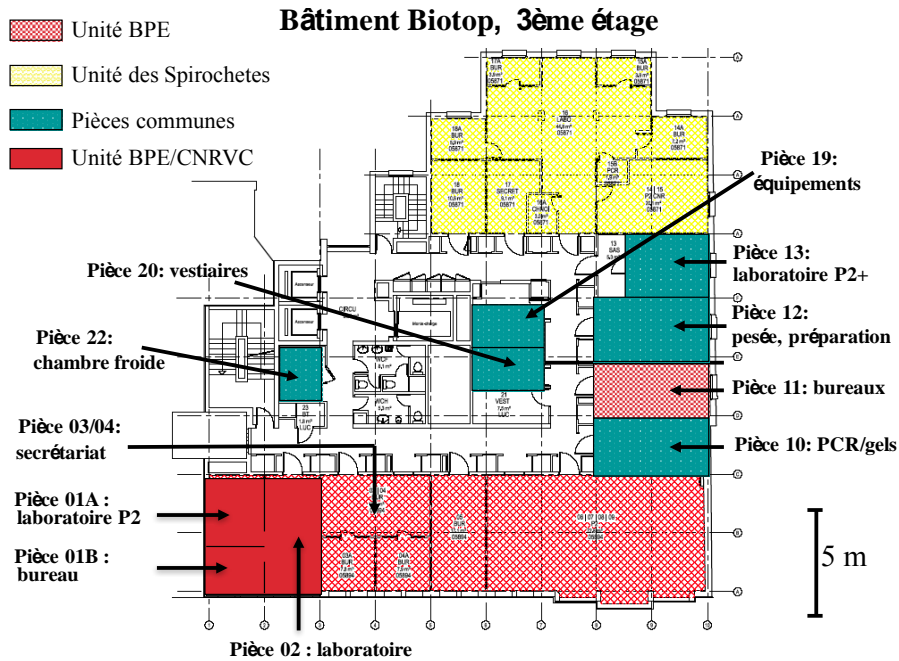
Laboratoire de 22,5 m<sup>2</sup> (03/04) pour faire les PCR hors accréditation et le PFGE

Le CNR-VC comprend également :

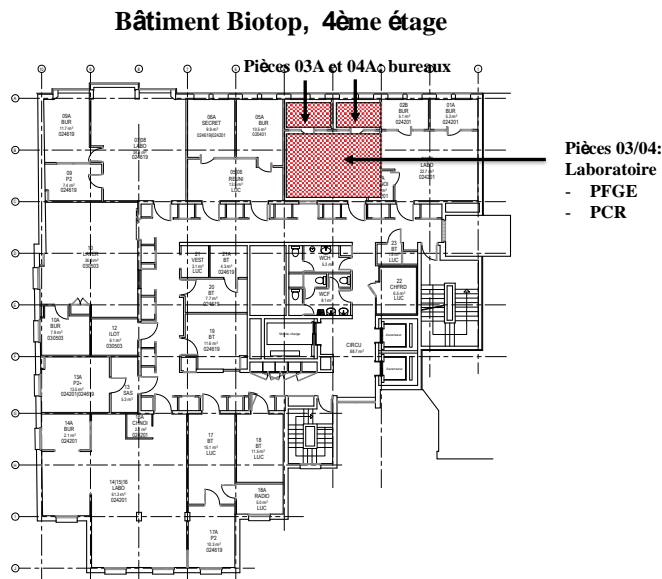
- Un local technique au sous-sol du Biotop partagé avec d'autres entités, abritant des congélateurs à -80°C, dont deux contenant une partie de la collection actuelle du CNR.
- Un local côté 25 rue du Dr Roux, partagé avec d'autres entités, abritant des containers d'azote liquide, dont deux contenant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

Annexe 1: Missions et organisation du CNR

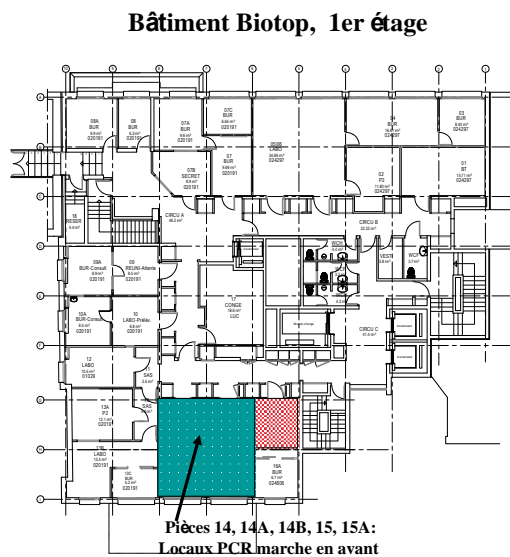
**Plan 1**



**Plan 2**



**Plan 3**



### 1.3-2 Équipements

#### **Dans la structure**

##### Spécifiques au CNR :

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

##### Commun à l'Unité BPE :

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

##### Partagé avec d'autres entités :

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

### 1.3-3 Moyens extérieurs à la structure et services supports

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

#### **- La Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M),**

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

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

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

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

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

Viennent également en support aux CNR :

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

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

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



#### 1.4 Collection de matériel biologique

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

- Production d'immuns sérums de référence :

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

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

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

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

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

## Annexe 1: Missions et organisation du CNR

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

#### Synthèse 2020 :

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

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 apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- La Direction de la recherche médicale ;
- La Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Ils se font régulièrement auditer dans le cadre de leurs activités en interne et par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité COFRAC 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 (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

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 permettre au mieux la continuité de leurs missions.

La démarche qualité spécifique au CNRVC en 2020 a été présentée au point 1-3 de ce rapport.

#### Perspectives 2021 pour le LREMS et le CNRVC :

Étapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-juin 2021
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2021
Revue de direction LRE-MS	Juin 2021
Demande d'ouverture nouvelles lignes de portées	Avant le 1 <sup>er</sup> novembre 2021
Audit de surveillance COFRAC	Mars 2022

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

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

A terme, la portée d'accréditation du CNRVC concernera le diagnostic des infections à vibrions cholériques et non cholériques par l'identification moléculaire des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, le sérogroupage O1 et O139 de l'espèce *V. cholerae*, la recherche des gènes de toxine cholérique.

## 2.1 Techniques de référence

### 2.1-1 Techniques disponibles

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

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

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

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

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

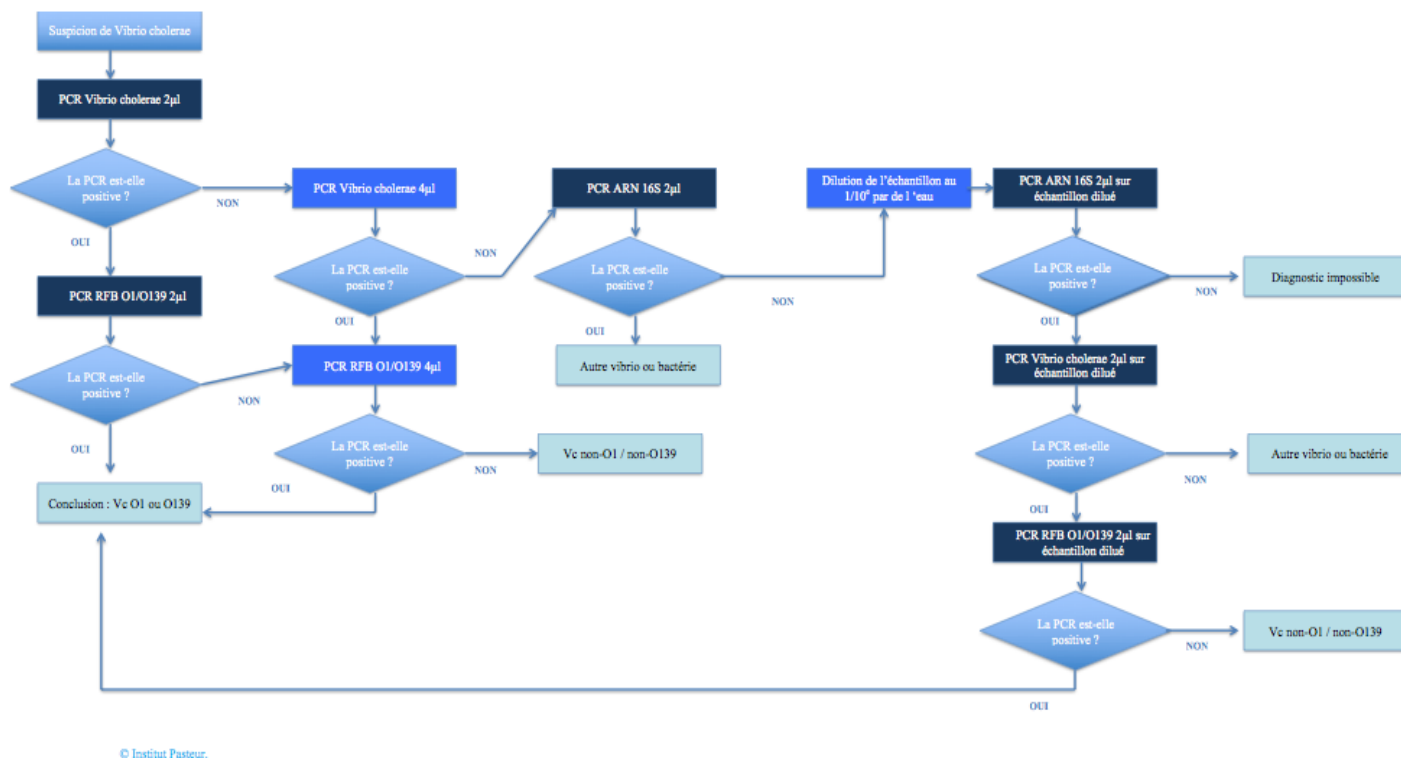
## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

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

Les prélèvements de selles reçus au CNR sont analysés par des techniques de PCR classique (Séquences *ISR*, *ctxA* et *ctxB*, *rfbO1*, *rfbO139*) et par qPCR (Séquences *ISR* et *ctxA*), après extraction de l'ADN par le kit Maxwell. Les PCR sont réalisées sur l'ADN extrait et une dilution au 1/10, une PCR d'amplification des ARN 16S est réalisée si nécessaire pour vérifier la présence d'inhibiteurs.

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



### 2.1-4 Identification bactérienne

#### Tests phénotypiques :

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

#### Tests génotypiques :

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

- Amplification de gènes spécifiques d'espèces :

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

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

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

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

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

### 2.1-6 Typage moléculaire

- Une standardisation de la méthode PFGE pour les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* avait été publiée par le réseau PulseNet USA afin de pouvoir effectuer des comparaisons de profils inter-laboratoires. Cette méthode est toujours disponible au CNR mais n'est plus appliquée à la surveillance épidémiologique des souches circulant dans le monde (diversification des populations, introduction éventuelle d'une nouvelle souche, origine des cas importés, ...), car peu discriminante.
- Une surveillance de l'apparition ou de la circulation de variants des vibrions cholériques du biotype ElTor peut être faite en première intention par amplification et séquençage de marqueurs génotypiques spécifiques des biotypes, puis comparaison des séquences avec des séquences de référence : 1) gène *ctxB* codant pour la sous unité B de la toxine cholérique, 2) gène *tcpA* codant pour la protéine TCP (Toxin-corregulated-pilus), récepteur du phage CTX $\Phi$ , 3) gène *rstR* codant pour un répresseur du phage CTX $\phi$ .
- Méthode MLVA (Multi Locus VNTR (variable numbers of tandem repeats) Analysis) réalisée en PCR multiplex pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1, basée sur l'analyse de 6 loci présentant des séquences répétées.
- MLST *in silico* pour les souches de *V. cholerae* O1 (ST69) et non-O1/non-O139, basé sur le schéma d'Octavia.

### 2.1-7 Caractérisations supplémentaires

Les séquences de plusieurs gènes sont extraites des données de WGS et analysées par rapport à des séquences de référence :

## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Pour les souches de *V. cholerae* :

Séquence cible	Fonction – Information recherchée
<i>rfbO1/O139</i>	Synthèse des polysaccharides O1 et O139 de <i>V. cholerae</i>
<i>VcF-VcmR</i>	Spécifique d'espèce
<i>toxR</i>	Spécifique d'espèce
<i>ompW</i>	Spécifique d'espèce
<i>ctxA</i>	Toxine cholérique
<i>ctxB</i>	Toxine cholérique – variation du biotype
<i>tcpA</i>	Récepteur du phage CTX – variation du biotype
<i>rstR</i>	régulateur de la transcription – variation du biotype
<i>hlyA</i>	hémolysine
<i>SN</i>	entérotoxine thermostable
<i>chxA</i>	Cholix-toxine
<i>gyrA</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>gyrB</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parC</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
<i>parE</i>	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones

Pour les souches de *V. parahaemolyticus*

Séquence cible	Fonction – Information recherchée
<i>R72H</i>	Identification espèce
<i>toxR</i>	Identification espèce
<i>TDH</i>	Hémolysine
<i>TRH</i>	Hémolysine
<i>vcrD1</i>	T3SS1
<i>VP1680</i>	
<i>vopD</i>	
<i>vcrD2</i>	T3SS2
<i>vopD2</i>	
<i>vopB2</i>	
<i>vopP</i>	
<i>vopC</i>	
<i>vopT</i>	

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

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



## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

- La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par bandelettes Etest® (AB bioMérieux) est systématiquement effectuée pour détecter les souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (test de l'acide Nalidixique et de la ciprofloxacine), apparaissant comme sensibles par la technique de diffusion en gélose, et depuis 2018 pour l'Azithromycine. De même les valeurs de CMI sont mesurées pour les antibiotiques pour lesquels les souches présentent une résistance intermédiaire par la méthode de diffusion. L'interprétation est faite à partir des valeurs de concentrations critiques définies pour les Entérobactéries.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a également été réalisée en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™ (plaque commerciale EUVSEC). Des plaques plus adaptées aux vibrions ont été utilisées avec les concentrations suivantes d'antibiotiques (mg/L) : ampicilline (0,5 à 128), azithromycine (0,5 à 128), céfotaxime (0,06 à 4), chloramphénicol (1 à 128), ciprofloxacine (0,008 à 8), colistine (0,25 à 32), acide nalidixique (2 à 256), sulfaméthoxazole (4 à 1024), tétracycline (0,5 à 64), triméthoprime (0,12 à 32) et triméthoprime/sulfaméthoxazole (0,12/2,38 à 16/304). La lecture a été faite à partir des critères d'interprétation de l'EUCAST 2020 ou du CLSI.
- Les supports de résistance aux fluoroquinolones (mutation des gènes cibles) sont caractérisés par amplification par PCR et séquençage des produits amplifiés, les mécanismes de résistance étant principalement des modifications, dues à des mutations ponctuelles dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*, du site de fixation de ces antibiotiques au niveau de la DNA gyrase et la topoisomérase IV. L'accumulation de mutations augmente le niveau de résistance de ces souches.

### 2.1-9 Mesure du titre d'anticorps vibriocides

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

## 2.2 Marqueurs épidémiologiques disponibles

### 2.2-1 Pour les vibrions cholériques

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

## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

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

### 2.2-2 Pour les vibrions non cholériques

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

### 2.3 Techniques recommandées par le CNR

- Bactériologie classique et méthodes moléculaires (PCR) :

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

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

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

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

- *WHO/CDS/CSR/EDC/99/8/EN, Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera, Atlanta, GA: CDC. 1999.* accessible en ligne à l'adresse suivante :

[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera\\_lab\\_manual.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm).

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

- *WHO/CDS/CSR/EDC/99.8, Méthodes de Laboratoire pour le diagnostic de la dysenterie épidémique et du choléra », Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 2002*  
[http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EDC\\_99\\_8\\_FR/en/index.html](http://www.who.int/topics/cholera/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_99_8_FR/en/index.html)

#### **Diagnostic des infections à vibrions non cholériques**

- Un article sur les Infections à vibrions non-cholériques, publié en 2011 dans l'Encyclopédie Médico Chirurgicale (Elsevier Masson SAS, Paris, Maladies infectieuses), décrit les méthodes d'isolement des VNC ainsi que les milieux à utiliser pour leur recherche :

*Quilici M.-L, Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non-cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-026-F-15, 2011, 12 p.*

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

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

## Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

- Boutonnier A, Dassy B, Dumenil R, Guenole A, Ratsitorahina M, Migliani R et al. *A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to Vibrio cholerae O1 and Vibrio cholerae O139. J Microbiol Methods. 2003 ; 55 : 745-53.* Cette méthode peut être utilisée pour un diagnostic rétrospectif du choléra et pour le suivi de la protection vaccinale.

- Un protocole international PulseNet a été publié en 2006 pour le typage de *V. cholerae* par électrophorèse en champ pulsé, en 2007 avec mise au point en 2008 pour le typage de *V. parahaemolyticus*. Toutefois cette méthode n'est pas recommandée par le CNR pour le suivi des souches de *V. cholerae* O1 car non discriminante.

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

[https://www.who.int/cholera/task\\_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1](https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1)

L'analyse phylogénétique basée sur le WGS et l'analyse comparative des génomes sont utilisées pour étudier la structure des populations et l'évolution des *V. cholerae* O1.

Des renseignements techniques concernant toutes ces méthodes sont disponibles auprès du personnel du CNR, dont les contacts sont accessibles par le site Web de l'Institut Pasteur.