Rapport annuel d'activité

2019

Centre national de référence des Vibrions et du Choléra

Année d'exercice

2018

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 2018 6
2/ Activités d'expertise 7
2-1. Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2018 8
2-2. Evaluation des techniques et réactifs 8
2-3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires 8
2-4 Collections de matériel biologique 9
2-5 Activités d'expertise de l'année 2018 9
2-5.1 Echantillons étudiés 9
2-5.2 Niveau de caractérisation réalisé 11
2-6 Activités de séquençage 13
3/ Activités de surveillance 13
3-1. Vibrion cholérique 13
3-1.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées 13
3-1.2 Evolution et caractéristiques des infections 14
3-1.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux 15
3-1.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux 18
3-1.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance 20
3-2. Vibrions non cholériques 20
3-2.1 Réseau des partenaires et définition de l'échantillon de souches isolées 20
3-2.2 Evolution des caractéristiques des infections 22
3-2.3 Surveillance des agents pathogènes et de l'évolution de leur résistance aux anti-infectieux 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 30
5-1. Conseil et expertise aux professionnels de santé 30
5-1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé 30
5-1.2 Accueil de stagiaires 31
5-1.3. Guides élaborés 31
5-1.4. Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et productions du CNR 32
5-1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé 33
5-2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires nationales et internationales 33
6/ Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR 34
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année 2018 35
6.2. Liste des publications et communications 2018 37
7/ Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux 38
8/ Programme d'activité 2019-2020 39

ANNEXES *41*

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR
1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR
1.2 Organisation du CNR
1.3 Locaux et équipements
1.4 Collections de matériel biologique
1.5 Démarche qualité du laboratoire
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR
2.1 Techniques de référence, marqueurs épidémiologiques disponibles
2.2 Techniques recommandées par le CNR
Annexe supplémentaire : Déclaration d'intérêt

Résumé analytique

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

• **Le choléra** reste aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique dans toutes les régions du monde, représentant une charge estimative de près de 3 millions de cas et 95 000 décès par an, selon l'OMS. Le continent africain est le plus touché, le choléra est également très présent dans la région des Amériques, en Haïti, et en Asie où il circule de manière endémique. Le RSI 2005 encourage les pays confrontés à des épidémies de choléra à rapporter les cas à l'OMS. Cette maladie est à déclaration obligatoire en France, où des cas isolés de choléra importés par des voyageurs de retour de zones endémiques ou épidémiques peuvent survenir de façon sporadique. La détection et l'investigation systématique des cas sur le territoire français reste justifiée afin de détecter tout cas susceptible d'évoluer vers une forme clinique grave, surveiller les co-exposés à une même source de contamination, et du fait des risques de propagation dans certains groupes de populations dans les territoires français d'outre-mer. La déclaration doit être faite dans les délais les plus brefs aux autorités de santé après confirmation d'identification par le CNR. **En 2018, deux cas de choléra importés ont été diagnostiqués sur le territoire français.** Le CNR collabore avec les pays étrangers soumis à des épidémies de choléra, en apportant une aide à l'identification et la caractérisation des souches, également au suivi de leur résistance aux antibactériens. Le CNR a contribué à finaliser en 2018 l'étude des souches responsables de l'épidémie au Yémen, la plus importante jamais enregistrée. Des études de génomique ont montré que l'épidémie était due à une souche nouvellement importée d'Asie, ayant circulé préalablement en Afrique de l'Est avant son introduction au Yémen. Le CNR a également été fortement sollicité du fait de **l'épidémie de choléra en Algérie** fin septembre 2018, essentiellement par des laboratoires de centres hospitaliers pour des suspicions de cas de choléra importés (n=14), également par les médias.
Le CNR a poursuivi en 2018 son implication au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire", et concourt par son implication 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.

• **Les vibrions non cholériques** (VNC) d'intérêt médical, essentiellement les espèce *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, sont à l'origine d'infections sporadiques, gastro-entérites, infections suppuratives, septicémies, dont l'évolution peut être extrêmement sévère, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives. La consommation de produits de la mer et l'exposition de plaies au milieu marin sont les deux voies de contamination. L'augmentation du nombre de souches isolées en 2017 s'est confirmée en 2018 avec la confirmation d'identification au CNR de **66 souches de VNC**, **correspondant à 60 cas cliniques d'infections**, associés majoritairement à *V. parahaemolyticus* (n=29) et *V. cholerae* (n=26). Un lien avec le milieu marin, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer, a été établi dans plus de 70% des cas, l'ingestion d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits en particulier, étant la voie essentielle de contamination. Plus de 80 % des cas d'infections se sont manifestés par des gastroentérites. A noter l'émergence de l'espèce *V. fluvialis* associée à des gastroentérites, concordant à ce qui est rapporté au niveau mondial depuis quelques années. Deux cas inhabituels d'infections, par la sévérité des syndromes ou les caractéristiques de la souche isolée, ont été signalés à Santé publique France, un cas de portage asymptomatique de *V. cholerae* a été mis en évidence.
Le CNR a réalisé une enquête auprès de ses laboratoires correspondants sur leurs méthodes d'identification, PCR multiplex syndromique et/ou spectrométrie de masse, confirmant l'évolution des techniques de diagnostic qui peut expliquer, en association avec des températures élevées durant l'été 2018, l'augmentation du nombre de cas. Une des conséquences de cette évolution est l'augmentation du nombre de souches ou échantillons biologiques envoyés par des laboratoires de ville, et une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés.

Analytical summary

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

• **Cholera** remains a major public health problem in all regions of the world, with an estimated 3 million cases and 95,000 deaths per year, according to the WHO. Africa is the continent most affected, but cholera is also very present in the Americas, particularly Haiti, and in Asia, where it displays endemic circulation. International Health Regulation (IHR) 2005 encourages countries faced with cholera epidemics to report cases to the WHO. The declaration of this disease is mandatory in France, where isolated cases of cholera imported by travelers returning from zones in which cholera is endemic or epidemic may occur sporadically. The detection and systematic investigation of cases on French soil remains justified, to ensure the detection of all cases likely to progress to clinically serious forms, and to monitor all individuals exposed to the same source of contamination and, thus, the risks of spread in certain groups of populations in French overseas territories. The disease must be declared to the health authorities as soon as possible after its confirmation by the CNRVC. **In 2018, two cases of imported cholera were diagnosed in French territory.** The CNRVC works with other countries subject to cholera epidemics, providing assistance with the identification and characterization of strains and the monitoring of their antibiotic resistance. In 2018, the CNRVC also helped to complete a study on the strains responsible for the epidemic in Yemen, the largest ever recorded. Genomic studies showed that this epidemic was due to a strain recently imported from Asia, which had circulated in East Africa before its introduction into Yemen. The CNRVC was also very active during the **Algerian cholera epidemic** at the end of September 2018, essentially through the analysis of samples from suspected cases of imported cholera (*n*=14) by hospital laboratories and through interventions in the media.
In 2018, CNRVC continued its involvement at the heart of the WHO Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) by leading the "Laboratory Surveillance" working group, and through participation in the development of the WHO global roadmap for cholera, with the objective of achieving a 90% decrease in cholera deaths by 20130.

• **Non-cholera vibrios** (NCVs) of medical interest, essentially the species *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, cause sporadic infections, suppurative gastroenteritis and septicemia, progressing to extremely serious forms in some cases, and, more rarely, collective episodes of food poisoning. Infection occurs via two routes: the consumption of contaminated seafood and the exposure of wounds to the marine environment. The increase in the number of strains isolated in 2017 was reproduced in 2018, with the confirmation by the CNRVC of the identification of **66 NCV strains, corresponding to 60 clinical cases of infection**, mostly due to *V. parahaemolyticus* (*n*=29) and *V. cholerae* (*n*=26). A link to the marine environment, seafood consumption or direct contact with seawater was established in more than 70% of these cases, and the ingestion of contaminated foods, such as raw or insufficiently cooked seafood in particular, was the chief mode of contamination. More than 80% of these infections manifest as gastroenteritis. Emergence of the species *V. fluvialis* as a cause of gastroenteritis was noted, consistent with reports from around the world over the last few years. Two cases of infection of unusual severity or due to a strain with unusual characteristics were reported to the French public health authorities, and a case of asymptomatic *V. cholerae* carriage was demonstrated.
The CNRVC has performed a survey of the methods of identification used by its corresponding laboratories: syndromic multiplex PCR and/or mass spectrometry. This survey confirmed changes in the diagnostic techniques used that might, together with the high temperatures of the summer of 2018, explain the increase in the number of cases. The consequences of this change include an increase in the numbers of isolates or biological samples sent to the reference center by urban medical laboratories, and improvements in the detection of non-hospitalized cases with few symptoms.

1/ Missions et organisation du CNR

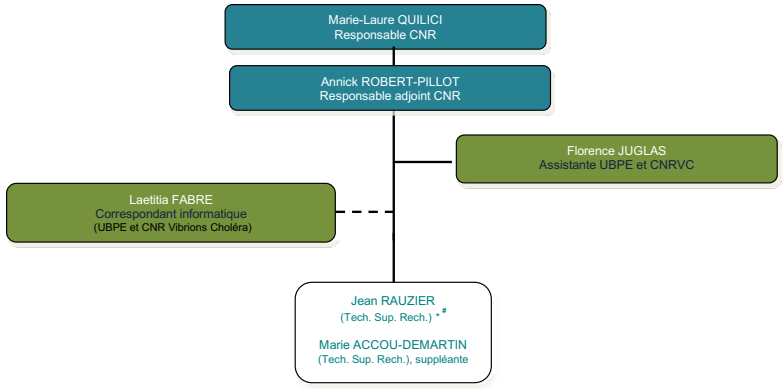
Les missions et objectifs majeurs du CNR sont présentés en *annexe 1*du présent rapport.

1.1 Equipe et organigramme du CNRVC

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

Organigramme du CNR

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



Légende :

Relation hiérarchique et fonctionnelle
Relation fonctionnelle

** Correspondant Qualité du CNR*
 # Correspondant Métrologie et Matériel du CNR

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

1.2 Démarche qualité du CNRVC en 2018

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 2018 de la démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) est présentée en Annexe 1, point 1-5, du présent rapport.

- L'année qualité 2018 du CNRVC s'est organisée comme suit :

CNRVC	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC S5 du CNRVC	23-25 janvier 2018
Revue qualité	7 mai 2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audits internes qualité et technique	Qualité : 04/10/2018 Technique : 19/12/2018
Finalisation d'un nouveau dossier de validation de méthode "Recherche d'un gène spécifique de l'espèce bactérienne *V. cholerae*"	03/07/2018, méthode validée

- Les perspectives 2018 pour le CNRVC se calqueront sur ce qui est présenté en Annexe 1 pour le LREMS.

- En 2018, 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 4 souches de *Vibrio*, *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*, et de deux ADN de *V. parahaemolyticus*. Les analyses portaient sur l'identification des espèces et la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.

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

2/ Activités d'expertise

Les activités d'expertise présentées ici concernent :
- Les souches de vibrions cholériques isolées de cas importés sur le territoire français, également de cas diagnostiqués en zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, envoyées au CNR pour confirmation de diagnostic et caractérisation. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNR et permet de de connaitre les souches de vibrions cholériques circulant dans le monde et susceptibles d'être importées en France. Deux cas de choléra ont été importés en France métropolitaine en 2018, le CNR a par ailleurs étudié 215 échantillons en provenance du continent africain et du Moyen Orient.
- Les souches de vibrions non cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le nombre d'échantillons, souches isolées et prélèvements envoyés au CNR a augmenté de façon significative en 2018 (n=99), en lien avec les températures élevées enregistrées cette année et l'évolution des méthodes de diagnostic, PCR multiplex entérique et spectrométrie de masse. La détermination des espèces par les laboratoires d'analyse médicale était concordante dans près de 90% des cas avec les résultats d'identification du CNR, les écarts concernant essentiellement l'identification de l'espèce *V. cholerae*.

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

2.1 Evolution des techniques, techniques en cours de développement en 2018

- La réalisation des antibiogrammes se fait systématiquement par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations techniques de l'EUCAST 2017 et leurs critères d'interprétation pour les Entérobactéries, et par détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par ETEST®. Depuis 2017, le CNR détermine en parallèle les CMI en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™ (plaque commerciale EUVSEC), afin d'évaluer à terme la meilleure méthode permettant de déterminer la sensibilité des *Vibrio* aux antibiotiques.

- Le CNR développe sa propre base de données protéomiques (spectrométrie de masse Maldi-Tof, système Bruker Daltonics) et génomiques pour les différentes espèces de *Vibrio*, en particulier pour l'espèce *V. cholerae* (n=257), dans l'objectif d'utiliser ces méthodes pour l'identification et le typage.

- Le CNR a mis en place en 2018 le séquençage complet des génomes bactériens (WGS, whole-genome sequencing) sur les souches de vibrions cholériques et non cholériques, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires. La présence des gènes d'intérêt pour le diagnostic et la détection des facteurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, cette technique pourrait remplacer à terme les analyses conventionnelles utilisées pour un rendu de résultats (confirmation de l'espèce, présence des gènes codant pour des facteurs majeurs de pathogénicité), mais cela n'est pas réalisable actuellement en raison des délais d'obtention des séquences.

2.2 Evaluation de techniques et réactifs

- Le CNR teste pour la société BIO-RAD les lots de sérums agglutinants polyvalents destinés au diagnostic de *V. cholerae* O1, sur un panel de 43 souches de référence de différents sérogroupes de l'espèce. Une expertise a été réalisée au CNR en 2018.

- L'utilisation de la spectrométrie de masse Maldi-Tof (système Bruker Daltonics) pour l'identification du genre et des espèces de *Vibrio* impliqués en pathologie humaine est en cours de validation, par l'analyse de souches identifiées préalablement par les méthodes biochimiques traditionnelle et étudiées en parallèle, actuellement pour les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*, par séquençage génomique. Les résultats d'identification sont concordants pour les espèces *V. parahaemolyticus* (n=49), *V. alginolyticus* (n=5), *V. fluvialis* (n=4). A noter cependant les difficultés d'identification de l'espèce *V. cholerae* identifiée *V. albensis* par ce système. Il est nécessaire pour le CNR de compléter le contenu de la base de données pour l'identification de l'espèce *V. cholerae* qui n'est pas distinguée de l'espèce *V. albensis* par l'outil Maldi-Tof de Brucker disponible sur la plateforme P2M.

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 2018 à 30 laboratoires correspondants un protocole de recherche 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 2018 les modalités d'identification d'un vibrion cholérique à 13 laboratoires correspondants, 10 d'entre eux ayant contacté le CNR suite à l'épisode de choléra en Algérie en septembre 2018.

- Le CNR a transféré ses techniques de PCR pour la détection et l'identification des vibrions cholériques (confirmation d'espèce, recherche des gènes de toxine cholérique, détermination des sérogroupes O1 et O139) à l'Institut Pasteur d'Alger.

2.4 Collections de matériel biologique

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

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

- Le CNR a donné des amorces nucléotidiques permettant de réaliser les PCR d'identification d'un vibrion cholérique, ainsi qu'un ADN témoin, à l'Institut Pasteur d'Alger.

2.5 Activités d'expertise de l'année 2018

• 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. Ce sont essentiellement des échantillons issus de zones d'endémie ou d'épidémies cholériques. Les prélèvements se présentent :
- soit sous la forme de papiers filtres humides, trempés dans les selles liquides et placés dans un tube hermétiquement fermé après adjonction de quelques gouttes de sérum physiologique, permettant la mise en culture et l'isolement de souches, également un diagnostic par PCR,
- soit sous la forme de papiers filtres secs, sur lesquels les échantillons de selles sont absorbés. Ces échantillons sont inactivés et ne peuvent être analysés que par des méthodes moléculaires (extraction d'ADN et PCR).

2.5.1 Echantillons étudiés

Durant l'année 2018, **320** échantillons, en provenance de France ou de l'étranger, ont été réceptionnés au CNR, dans le cadre d'activités d'expertise et/ou de travaux en collaboration.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons reçus au CNR en 2018

Origine	Clinique		Animale	CQE		Total
	P	S	S	S	ADN	
France	33	65	1			99
Etranger	111	104	-	4	2	221
Total	144	169	1	4	2	**320**

P : prélèvements, S : souches isolées. CQE : contrôles qualité externes
Parmi les 33 prélèvements français, 5 n'ont pas été étudiés en l'absence de contexte compatible avec une infection à *Vibrio*.

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

Origine géographique	Expéditeur	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM/Plateaux techniques	16	50	66
	CHU/CH	15	14	29
	LA santé animale, aliments et environnement		1	1
Territoires OM	CH	2	1	3
Total		**33**	**66**	**99**

LBM : laboratoires de biologie médicale ; CH : centres hospitaliers

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

Origine	Nbre d'échantillons reçus au CNR		Nbre de souches de vibrions isolées		Total souches isolées
	P	S	P	S	
France	33	66	6	60	**66**
Etranger	111	104	26	36	**62**
Total	144	170	32	96	**128**

Ce tableau n'inclut pas les souches d'*Aeromonas* (1) et du CQE (4) étudiées au CNR en 2018.

Tableau 4 : Provenance des échantillons étrangers d'origine clinique

Pays	Expéditeur	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons
Angola	Institut National de santé publique	3	Souches isolées
RDC	LSHTM	104	Papiers filtres humides
Niger	Ministère de la Santé Publique	6	Papiers filtres humides
Arabie Saoudite	National Health Laboratory	13	12 souches isolées 1 prélèvement
Somalie	NPHRL, Somalie, via AMREF, Kenya	52	Souches isolées
Somalie	NPHRL, Somalie, via NPHL, Kenya	37	Souches congelées -80°C
	Total	**215**	

LSHTM : London School of Hygiene and Tropical Medicine; NPHRL : National Public Health Reference Laboratory, Somalia; NPHL : National Public Health Laboratory in Kenya

Autres échantillons étudiés

Tableau 5 : Echantillons étudiés pour des travaux de recherche

Source	Souches étudiées	Nombre
Collection de l'Unité BPE	*V. cholerae* O1 biotype classique	51
Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC)	*V. cholerae* O1 biotype classique	7
Total		58

La répartition par espèce de toutes les souches isolées et confirmées *Vibrio* en 2018, d'origine françaises ou étrangères, est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Souches de Vibrio isolées en 2018 et étudiées au CNR. Distribution par espèce en fonction de l'origine écologique et géographique des prélèvements.

Origine écologique / Espèce identifiée	**Homme**			**Animal**	Total / espèce
	France		Etranger	France	
	Métropole	France d'outre-mer			
V. cholerae O1	**2**		**57**		**59**
V. cholerae (non-O1/non-O139)	**25**	**1**	**5**	**1**	**32**
V. parahaemolyticus	**29**				**29**
V. alginolyticus	**2**				**2**
V. fluvialis	**5**				**5**
V. mimicus	**1**				**1**
Total	**64**	**1**	**62**	**1**	**128**

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 virulence, était de 5 jours ouvrés à partir de la date de réception d'un échantillon, ce qui entre dans l'objectif des 6 jours annoncés par le CNR sur son site internet. Les valeurs extrêmes variaient de 1 jour à 13 jours.

Les délais non-conformes étaient dus à des souches contaminées, mal identifiées, la nécessité d'attendre des résultats de séquences de produits PCR pour confirmer l'identification de l'espèce (*V. fluvialis*, *V. mimicus*), et des difficultés techniques.

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

2.5.2 Niveau de caractérisation réalisé

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

• Analyses réalisées sur les souches isolées en France

Espèce (Nbre)	Id. bio	Id moléculaire	16S /rpoB et séquençage	Agglutination	PCRgènes pathogénicité	PCR clones pandémiques	Seq. gènes pathogénicité	ATB	Amplification et séquençage gènes R	WGS
V. parahaemolyticus (29)	29	29	-	1	29	1	*tdh* (6) *trh* (20)	29		25
V. cholerae (29)	29	29	-	29	29	-	*ctxB* (2) *tcpA* (2) *rstR* (2)	29	7	29*
V. alginolyticus (2)	2	2	-	-	-	-		2		-
V. fluvialis (5)	5	-	5	-	-	-		5		2
V. mimicus (1)	1	-	1	-	-	-		1		1

* dont 6 séquencées par P2M et 23 PF1.

Analyses réalisées sur les souches isolées à l'étranger

Espèces (Nbre)	Id. bio	Id moléculaire	Agglutination	PCR gènes pathogénicité et séquençage	ATB	Amplification et séquençage gènes R	WGS
V. cholerae O1 (57)	57	57	57	*ctxB* (57) *tcpA* (57)	57	- (alignement de séquences à partir des données génomiques)	En cours

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

Autres analyses :

- 128 souches de *V. cholerae* O1 ont été analysées par MLVA
- 138 prélèvements reçus au CNR ont été analysés par les techniques d'enrichissement et isolement décrites en *Annexe 2*.

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 comme outil de suivi des souches de vibrions cholériques.

En 2018 le CNR a séquencé 99 souches de *Vibrio* dans le cadre de la mise au point de cet outil dans un objectif d'identification et rendu de résultats dans le futur (PibNet). Ce séquençage a concerné 18 souches de *V. cholerae*, 78 souches de *V. parahaemolyticus*, 2 *V. fluvialis* et 1 souche de *V. mimicus*.

Le CNR a également réalisé des activités de séquençage sur 96 souches envoyées pour expertise à la plateforme de génomique PF1 dans le cadre d'un travail de recherche sur la caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origine clinique, environnementale et animale, et de quelques souches de *V. cholerae* O1 isolées à l'étranger. Un travail de séquençage de 250 souches de différentes origines est en cours dans le but de décrire la structure des populations et les facteurs de pathogénicité de ces populations bactériennes mal-connues. Un outil de génotypage in silico des VNC sera également développé.
Le séquençage a été réalisé par la Plate-Forme - Génomique de l'Institut Pasteur (runs HiSeq et MiSeq) et les analyses bioinformatiques sont réalisées dans l'Unité.

3/ Activités de surveillance

- **Deux cas de choléra importés** ont été déclarés sur le territoire français en 2018. Un cas était lié à une souche atypique non toxinogène de *V. cholerae* O1, considéré comme cas de choléra sur la base de la clinique et du contexte épidémiologique selon les critères en vigueur en France.
- **60 cas cliniques d'infections à VNC** ont été confirmés au CNR, se manifestant majoritairement par des gastroentérites. Un lien avec le milieu marin a été établi dans 70% des cas, consommation de produits de la mer ou contact direct avec l'eau de mer. **Deux cas inhabituels d'infections**, par la sévérité des syndromes ou les caractéristiques de la souche isolée, ont été signalés à SpF, un cas de portage asymptomatique de *V. cholerae* a été mis en évidence. Quatre cas de gastroentérites à ***V. fluvialis*** ont été diagnostiqués, confirmant l'émergence de ce pathogène.
Une enquête réalisée auprès des laboratoires correspondants du CNR a montré que 92% d'entre eux, sur un total de 87, utilisaient la PCR multiplex syndromique et/ou la spectrométrie de masse.

3.1. Vibrion cholérique

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

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

Dans la mesure où le nombre de cas recensés chaque année est faible, et que les cas sont des cas importés par des personnes voyageant à des fins touristiques, sans que soit visée une population

particulière, **il n'est pas possible de mettre en évidence de partenariat particulier**. Tout laboratoire de biologie médicale situé en France peut être un jour confronté à une recherche de vibrion cholérique. Les cas diagnostiqués ayant le plus souvent été hospitalisés, leur répartition est conditionnée au lieu d'hospitalisation. Les laboratoires correspondants sont donc généralement des laboratoires hospitaliers, mais les LBM peuvent être amenés à faire le diagnostic bactériologique de cas peu symptomatiques.

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

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

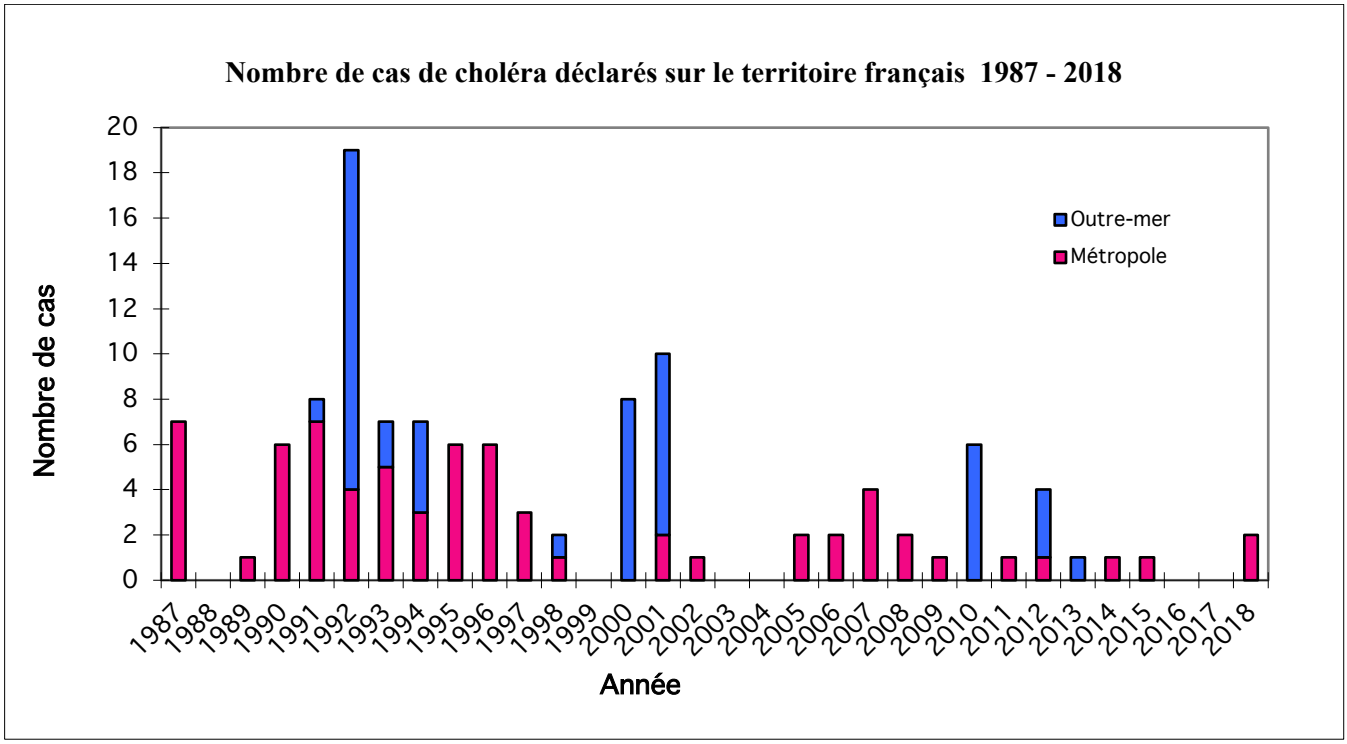
- *Définition de l'échantillon de souches isolées*

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

3.1.2 Evolution et caractéristiques des infections

Deux cas de choléra ont été diagnostiqués en 2018 en métropole, l'un en milieu hospitalier, un autre par un laboratoire de ville.

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



- *Origines géographiques des lieux de contamination* : les cas importés en France de 2005 à 2018 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 2018 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
Total	0	1	11	15	27

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

- *Caractéristiques des cas importés en 2018*

Les deux cas ont été importés en métropole, au retour de voyages en zone d'endémie et/ou épidémie cholérique (Birmanie, Inde). Le premier cas était peu symptomatique et n'a pas nécessité d'hospitalisation, le second cas était sévère a nécessité 9 jours d'hospitalisation. Aucun des patients ne présentait de facteur de risque. Les deux tableaux cliniques étaient compatibles avec un cas de choléra, les cas peu symptomatiques représentant la forme la plus fréquente de l'infection.

Il n'y a pas eu d'autre cas parmi les co-exposés, et pas de cas secondaire dans l'entourage. Les deux cas ont été traités par une antibiothérapie, ciprofloxacine pour un cas, azythromycine pour le cas le plus sévère, associé à une réhydratation intra-veineuse.

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

- *Caractéristiques des agents pathogènes*

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

La souche de *V. cholerae* O1 associée au cas peu symptomatique s'est avérée être non toxinogène, ce cas a cependant été déclaré comme un cas de choléra sur la base des critères de déclaration admis en France, qui sont cliniques et épidémiologiques, tableau clinique évocateur de choléra avec identification d'un vibrion cholérique, *V. cholerae* O1, retour d'une zone d'endémie ou d'épidémie cholérique.

La souche associée au cas importé d'Inde, présentant un tableau clinique plus sévère, était toxinogène, portant les gènes codant pour la toxine cholérique. Cette souche est un variant El Tor de *V. cholerae* O1, ses caractéristiques phénotypiques et génotypiques sont présentées dans le *tableau 8*.

A noter que la définition d'un vibrion cholérique n'est pas consensuelle au niveau international et fait intervenir des critères autres que strictement microbiologiques, tels que la présentation clinique et le contexte épidémiologique de la contamination. La recherche des gènes de la toxine cholérique n'est pas demandée systématiquement mais en fonction du contexte.

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

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

L'OMS recommande le recours à la doxycycline chez l'adulte et à l'érythromycine chez l'enfant pour le traitement du choléra. Un point particulier à mentionner est l'interprétation des tests de sensibilité à ces deux antibiotiques par la méthode de diffusion en gélose, dont les résultats in vitro ne sont pas toujours corrélés à l'activité in vivo. La lecture interprétative de la sensibilité à la tétracycline permet de prédire la sensibilité possible des souches à la doxycycline.

La sensibilité à l'azithromycine est testée systématiquement depuis fin 2010. En effet, son administration a été recommandée pour tous les patients hospitalisés lors de l'épidémie de choléra en Haïti, 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 à l'avenir en situation d'urgence afin d'éviter l'introduction du choléra dans des zones non-endémiques. Des souches circulant en Afrique présentant un phénotype de résistance aux macrolides ont été détectées en 2018.

- Les principales caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxinogènes importées sur le territoire français entre 2011 et 2018 sont présentées dans le *Tableau 8.*

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

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

Abréviations utilisées :

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

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

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

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

➥ Toutes les souches toxinogènes importées étaient des variants du biotype ElTor, possédant soit le toxinogénotype *ctxB1,* dont la séquence génomique de la sous-unité B est identique à celle des souches du biotype classique (2 mutations par rapport à la séquence des souches prototypes du biotype ElTor), soit le toxinogénotype *ctxB7*, dont la séquence génomique de la sous-unité B possède une mutation par rapport à la séquence des souches du biotype classique (3 mutations par rapport à la séquence des souches prototypes du biotype ElTor). Les variants *ctxB7* correspondent à la vague 3 actuelle, ils étaient associés en particulier à l'épidémie d'Haïti en 2010, et à l'épidémie du Yemen en 2016-2017.

➥ Toutes les souches importées 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.

➥ La souche de *V. cholerae* O1 associée au cas de choléra importé de Birmanie, non toxinogène, s'est montrée sensible à tous les antibiotiques testés, ce qui est en faveur d'une origine environnementale de cette souche.

- Les principales caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches de *V. cholerae* O1 toxinogènes d'origine étrangère isolées en 2018 sont présentées dans le *Tableau 9.*

Tableau 9 : Résistance aux antibactériens des souches de vibrions cholériques isolées à l'étranger étudiées en 2018

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
Vibrions cholériques															
V. cholerae O1 (*n*=58)	**23**	**24**	**3 (20)**	**4**	**4**	**4**	**(3)**	**58**	**29**	**24**	**57 (1)**	**(21)**	**4**	**23 (1)**	**57**

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

➥ **Une multi résistance des souches de vibrions cholériques** aux antibiotiques est rapportée dans toutes les régions du monde, des résistances à tous les agents antimicrobiens recommandés par l'OMS pour le traitement du choléra (tétracycline, doxycycline, furazolidone, triméthoprime-sulfaméthoxazole, érythromycine et chloramphénicol, et plus récemment fluoroquinolones) ont été observées ces dernières années.
➥ Toutes les souches de *V. cholerae* O1 toxinogènes testées étaient résistantes à l'acide nalidixique par la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'évaluation quantitative par la mesure de la CMI par Etest® (CMI NA) a confirmé la résistance des souches, avec des valeurs comprises entre 24 et 256 mg/L. Les souches étaient soit sensibles soit de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones avec des CMI Ciprofloxacine (CMI CI) variant de 0,03 à 0,5 mg/L.
➥ Les souches donnant des valeurs de CMI NA par Etest® comprises entre 24 et 48 mg/L associées à une CMI CI de 0,03 mg/L présentaient une mutation *gyrA*.
➥ Les souches donnant des valeurs de CMI NA par Etest® >256 mg/L associées à une CMI CI de 0,25 à 0,5 mg/L présentaient deux mutations, *gyrA* et *parC*.

Un profil de résistance particulier a été mis en évidence en 2017, avec des souches sensibles aux polymyxines. La résistance à cette famille d'antibiotiques est un marqueur phénotypique d'appartenance des souches de vibrions cholérique au biotype ElTor. Une souche importée du sous-continent indien en France en 2015 présentait cette caractéristique, de même la souche de *V. cholerae* O1 toxinogène importée d'Inde en 2018. Des études de séquençage et phylogénie ont confirmé l'origine indienne de ces souches et leur appartenance à une même lignée, ce qui confirme l'intérêt de l'utilisation des profils de résistance comme marqueur épidémiologique.

Des souches multi résistantes aux antibiotiques, tétracyclines et érythromycine, ont été mises en évidence en 2018 en Afrique, l'origine plasmidique de leur résistance est en cours d'étude dans l'unité.

3.1.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

le CNR et Santé publique France. Des renseignements sur le contexte clinique et épidémiologique de l'isolement (notions de voyage récent dans des pays à risque) sont immédiatement recueillis par téléphone, afin d'évaluer rapidement le risque pour l'entourage immédiat du malade ainsi que pour la collectivité, et l'existence éventuelle de cas groupés. Les ARS sont responsables de l'enquête et du traçage des cas, en collaboration avec les équipes de cliniciens, éventuellement du CNR, et l'appui de Santé publique France et des Cellules interrégionales d'épidémiologie (Cire) si nécessaire.
Chacun des cas fait l'objet d'une fiche standardisée individuelle de renseignements dans le cadre du protocole de déclaration obligatoire
Les cas de choléra importés sur le territoire français font l'objet d'une déclaration par le CNR, après confirmation de l'identification d'un 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 est sollicité pour confirmer l'identification du vibrion cholérique à partir de prélèvements ou de souches isolées, communiquer l'antibiogramme des souches isolées, diffuser les méthodes de typage moléculaire des souches, recevoir et former des stagiaires de différents pays à l'identification et au typage des souches de vibrion cholériques et non cholériques.

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

- L'Institut Pasteur (IP), via le CNR et le Réseau international des Instituts Pasteur, a renforcé en 2014 ses interactions avec l'OMS sur la thématique cholera en devenant membre à titre institutionnel de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC). Les priorités d'action définies par la GTFCC concernent la surveillance (laboratoire et épidémiologique), la vaccination, l'assainissement et l'administration des soins de santé, cinq groupes de travail thématiques ont été mis en place, dont un groupe dédié spécifiquement à l'amélioration des méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra. Le CNR est présent au sein de la Global Task Force on Cholera Control (GTFCC) de l'OMS, dans laquelle son responsable s'implique en particulier par le leadership d'un groupe de travail "Surveillance Laboratoire" (Lab Working Group) qui réunit différents acteurs internationaux de la lutte contre le choléra, provenant de diverses institutions.

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

- The Use of Cholera Rapid Diagnostic Tests, Novembre 2016, http://www.who.int/cholera/task_force/Interim-guidance-cholera-RDT.pdf?ua=1
- Introduction of DNA based identification and typing methods to public health practitioners for epidemiological investigation of cholera outbreaks, Juin 2017 http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Laboratory-support-public-health-surveillance.pdf?ua=1
- Interim Guidance Document on Cholera Surveillance, Juin 2017 http://www.who.int/cholera/task_force/GTFCC-Guidance-cholera-surveillance.pdf?ua=1

- Une note a été publiée en mai 2018, sur l'utilisation des antibiotiques pour le traitement du choléra, https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1

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

3.1.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Le CNR a été sollicité comme laboratoire de première intention pour le diagnostic microbiologique du choléra par 9 centres hospitaliers en 2018, dans un contexte de suspicion de choléra au retour d'Algérie. Dix prélèvements de selles ont été étudiés par les techniques classiques d'enrichissement/isolement et par PCR directe sur échantillon biologique. Aucun cas de choléra n'a été confirmé, mais 2 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 ont été isolées chez deux patients hospitalisés, présentant des diarrhées aqueuses

- L'analyse d'un sérum prélevé chez un patient de retour d'Algérie, hospitalisé et présentant un tableau clinique sévère de gastroentérite, a montré un pouvoir vibriocide élevé vis à vis de souches de *V. cholerae* sérogroupe O1, sérotype Ogawa, qui correspond au sérotype associé aux souches responsable de l'épidémie de 2018 en Algérie. Un diagnostic peut se baser sur une augmentation significative de la concentration en anticorps vibriocides vis à vis du vibrion cholérique. Ce seul examen n'a pas été suffisant pour affirmer que le patient présentait un cas de choléra lors de son hospitalisation en France, d'autant que des cultures réalisées sur les selles se sont avérées négatives, mais permet d'affirmer que patient a été en contact avec une souche de vibrion cholérique, éventuellement comme cas contact, asymptomatique ou peu symptomatique, d'une personne infectée.

3.2 Vibrions non cholériques

3.2.1 Réseau des partenaires

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

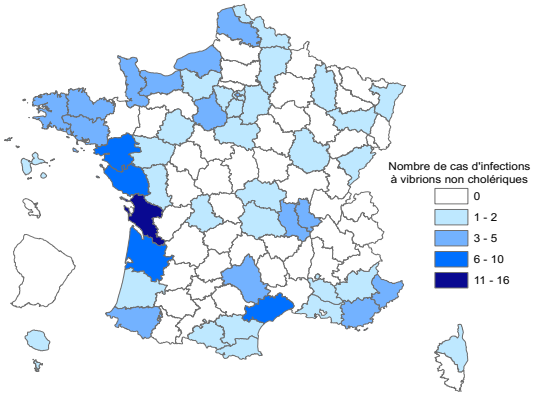
Le recensement des cas se fait sur la base des déclarations volontaires de la part des biologistes après l'isolement des souches par les laboratoires d'établissements publics ou privés de santé. Le CNR avait activement sollicité les biologistes en 2011 en réalisant une campagne d'information et sensibilisation 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, également par des microbiologistes de LBM, regroupés en plateformes de biologie médicale. Une des conséquences de l'évolution des méthodes de diagnostic est l'augmentation du nombre de souches ou échantillons biologiques envoyés par des laboratoires de ville.
L'analyse des cas détectés sur le territoire français entre 1995 et 2017 a mis en évidence une dispersion des cas et des laboratoires correspondants sur le territoire français, avec cependant un tropisme pour les zones côtières et la région Nouvelle Aquitaine, sur les côtes Atlantiques, ce qui s'est également vérifié en 2018.

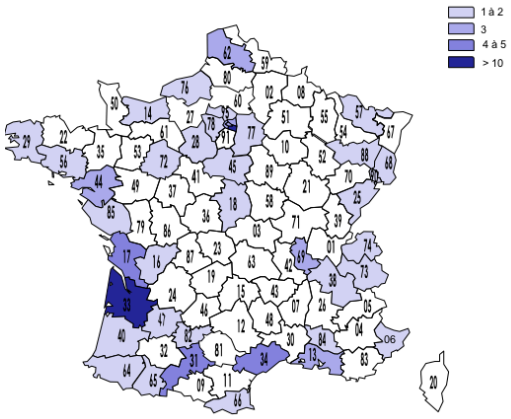
- *Estimation de la couverture du réseau ou représentativité, évolution du réseau*

Le CNR collabore de façon durable avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire, avec un focus particulier sur les zones identifiées comme à risque, où le risque d'exposition est le plus important et dont la répartition est restée relativement constante depuis 1995.

Distribution géographique des cas d'infection à VNC en France :



De 1995 à 2015



En 2018

En 2018, le réseau de partenaires du CNR est composé de 87 correspondants identifiés dans 40 centres hospitaliers et 47 LBM, avec lesquels le CNR correspond activement depuis plusieurs années. Ils sont répartis dans 40 départements dont 10 départements côtiers, avec un focus sur les côtes Atlantiques. La Guadeloupe et la Polynésie française sont également identifiées.
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 a été contacté cette année par un nombre de professionnels de santé beaucoup plus élevé que ces deux dernières années, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR, ce qui a représenté une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance

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

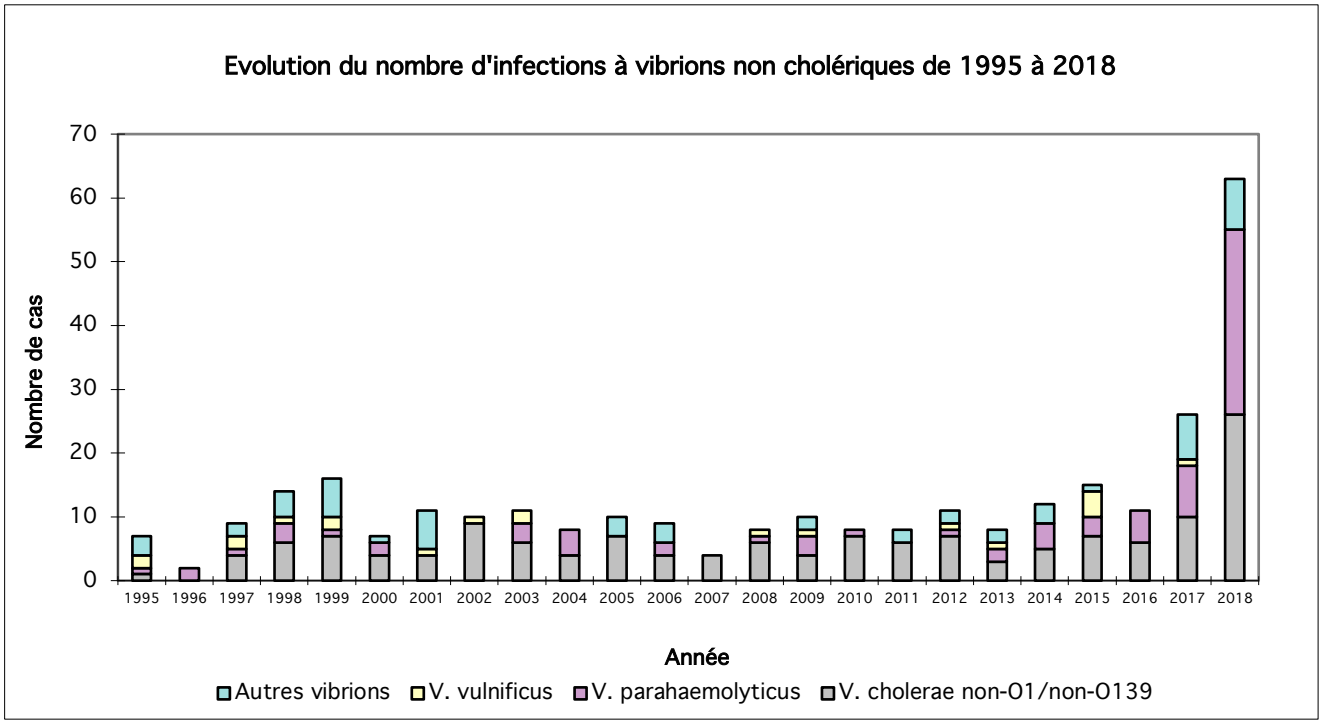
De même, du fait de la rareté des infections à *V. vulnificus*, de la gravité des tableaux cliniques et de la relative facilité d'isolement de ces souches dans les hémocultures, il est probable également que le CNR soit également informé de tous les cas diagnostiqués.

- *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 vibrion 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.



L'analyse des données cliniques, microbiologiques et épidémiologiques des cas confirmés a montré :

- Une **augmentation importante du nombre de cas en 2018**, avec 60 cas cliniques documentés ; 26 cas cliniques avaient été rapportés en 2017, ce qui constituait déjà une augmentation significative par rapport à la moyenne de 10 cas cliniques annuels rapportés entre 1995 et 2016.

- L'âge médian des cas d'infection était de 60,2 ans (18-86), les cas étaient majoritairement des hommes (45%).

- **5 espèces** de *Vibrio*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* et *V. mimicus*, ont été à l'origine des 60 cas cliniques diagnostiqués en 2018. **Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont restées les espèces prépondérantes**, on note une **émergence de l'espèce *V. fluvialis***, dont l'identification par les laboratoires est sans doute associée à l'évolution des techniques de diagnostic, cette espèce semblant bien identifiée par spectrométrie de masse alors qu'elle est difficilement différenciée des souches d'*Aeromonas* sur la base des caractères phénotypiques. *V. parahaemolyticus* et *V. fluvialis* ont été isolés simultanément de deux cas de gastroentérites faisant suite à la consommation de produits de la mer en France.

- **Les manifestations cliniques étaient majoritairement des gastroentérites**, représentant 80% des cas, 54% d'entre eux étant associés à l'espèce *V. parahaemolyticus*, 37% à l'espèce *V. cholerae*. La souche de *V. mimicus* (1) et les souches de *V. fluvialis* (5) isolées étaient également à l'origine de gastroentérites, dont deux en association avec *V. parahaemolyticus*.
  Huit cas ont présenté des formes septiques, 6 à *V. cholerae* et 2 à *V. parahaemolyticus,* bactériémies faisant suite à une primo-infection (gastroentérite ou surinfections de plaies) ou septicémies primaires. Tous les patients présentaient des terrains prédisposants, à l'exception d'un cas de septicémie à *V. parahaemolyticus*, ayant évolué en choc septique. Ce cas inhabituel par la gravité de son évolution a été signalé à SpF (cf Alerte). Trois cas de suppurations diverses, 2 à *V. alginolyticus*, 1 à *V. parahaemolyticus,* associés à un contact direct avec le milieu marin, ont également été rapportés.

- 30% des cas ont été hospitalisés, parmi eux 70% présentaient un terrain prédisposant, diabète, immunosuppression, traitement anti-acide, antécédents de pathologies digestives. Des terrains prédisposants ont été mis en évidence chez des personnes non hospitalisées et plus de 40% des cas présentaient des terrains favorisants, à noter cependant un nombre croissant d'informations non renseignées (plus de 20% des cas) 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* a priori et la possibilité d'interroger le patient à postériori.

- Comme les années précédentes, c'est l'espèce *V. cholerae* qui a été associée à la plus grande diversité de syndromes, gastroentérites, angiocholite, infection de liquide d'ascite, surinfections de plaie, avec évolution vers une forme septicémique pour les trois derniers cas, et trois cas de septicémies primaires. Près de 90% des cas d'infection à *V. parahaemolyticus* était des gastroentérites liées à la consommation de produits de la mer, 2 cas d'infection ont fait suite à un contact direct avec le milieu marin, un associé à une surinfection de plaie, un autre à une septicémie évoluant en choc septique.

Un cas inhabituel d'infection faisant suite à la consommation de produits de la mer, septicémie primaire et évolution vers des lésions bulleuse à distance chez un patient sans terrain favorisant a été signalé (cf alerte).

- 75% des cas étaient associés à une exposition au milieu marin, consommation de produits de la mer pour 80% d'entre eux, contact direct avec le milieu marin pour les autres cas renseignés. Une proportion élevée de transmission alimentaire confirmée était principalement associée à *V. parahaemolyticus* alors que les cas d'infection à *V. alginolyticus* étaient associées à une transmission par contact direct avec l'eau de mer.

- Distribution géographique des cas : 30% des cas d'infections ont été importés, majoritairement du Maghreb et d'Asie, se manifestant par des gastroentérites et faisant le plus souvent suite à la consommation de produits de la mer ou de crudités. L'espèce majoritairement concernée était *V. cholerae* (14 cas/25), *V. parahaemolyticus* a été associée à 3 cas d'importation.
  Les cas autochtones ont été plus fréquemment signalés dans les zones côtières et particulièrement sur la côte atlantique, avec une répartition géographique qui reste remarquablement stable depuis 1995.

- Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.

- La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année (juin à octobre, avec un pic en juillet et août).

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

Tableau 10 - Distribution des espèces de Vibrio non cholériques isolées chez l'homme sur le territoire français en 2018 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
V. cholerae (non-O1/non-O139)	**26***	Gastroentérite (19)	oui (6)	oui (6)	0	Consommation produits de la mer en France (4) Voyage Etranger (12) dont conso. produits de la mer (5), crudités (1) NR (3)
		Plaie, septicémie (1)	oui	oui	0	Manipulation de produits de la mer, territoires Outre-Mer
		Septicémie (3)	oui (3)	oui (3)	0	Consommation de produits de la mer (1), voyage Etranger (1), NR(1)
		ILA, sepsis sévère (1)	oui	oui	0	Contact avec l'eau douce
		S, angiocholite (1)	oui	oui	0	ND
V. parahaemolyticus	**29**	Gastroentérite (26)	oui (4)	oui (6)	0	Voyage à l'étranger + conso. produits de la mer (3) Consommation produits de la mer en France (20) NR (3)
		Suppuration (1)	non	oui	0	Contact avec le milieu marin
		Septicémie et lésions bulleuses (1)	oui	non	0	Consommation de produits de la mer
		Septicémie, choc septique (1)	oui	oui	0	Contact avec le milieu marin
V. alginolyticus	**2**	Suppurations (2)	non	oui	0	Voyage à l'étranger (1) contact avec l'eau de mer (2)
V. fluvialis	**5**	Gastroentérite (5)	non	oui (2)	0	Consommation de produits de la mer (3) Voyage à l'étranger (1) NR (1)
V. mimicus	**1**	Gastroentérite (1)	non	oui	0	Consommation de produits de la mer
Total de cas	**63**				**0**	

* correspondant à 25 cas d'infections.
NR : Non Renseigné (pas d'information transmise)
ND : Non Documenté (pas d'exposition compatible mise en évidence)
ILA : infection de liquide d'ascite

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

Caractérisation des souches analysées en 2018

Echantillons d'origine clinique isolés sur le territoire français

- Une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolée d'un cas importé de Tunisie possédait les gènes *ctxA* et *ctxB* de la toxine cholérique, elle était associée à un cas de septicémie.
  L'isolement de cette souche a été signalée à Santé publique France (voir paragraphe "Alerte").
- Aucune des autres souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origine clinique isolée ne possédait les gènes de la toxine cholérique, ni les gènes du récepteur du phage CTXϕ. Une souche possédait le gène *stn,* codant pour une entérotoxine thermostable de *V. cholerae*. Toutes possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la grande majorité des souches cliniques, quels que soient les syndromes associés.
- 18 souches de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines associées au pouvoir pathogène de l'espèce, *tdh* et/ou *trh*+, une souche était positive pour le gène codant l'hémolysine TDH. Les analyses moléculaires complémentaires ont mis en évidence l'appartenance de cette dernière souche à un clone pandémique de l'espèce (clone O3:K6) par la présence des gènes *orf8* et *toxRS*. Cette souche était importée de Tanzanie.
  A noter un nombre élevé de souches (8), à l'origine de diarrhées aigües, ne possédant pas les gènes des hémolysines TDH et TRH, habituellement associées au pouvoir pathogène de l'espèce.

Sensibilité aux anti-infectieux

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

***Tableau 11* : Résistance aux antibactériens des souches de VNC isolées en France - 2018**

	SSS	SXT	C	AM	TE	E	AZM	FT	PB	CS	NA	CIP	CF	S	O129
V. cholerae non-O1/non-O139 (n=26)	6	4	-	-	4	5	2	-	25	25	7	4 (2)	-	(1)	5
V. parahaemolyticus (n=29)	(1)	-	-	10	-	-	-	-	17	15	-	(1)	-	2(9)	4
V. alginolyticus (n=2)	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1
V. fluvialis (n=5)	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
V. mimicus (n=1)	-	-	-	-	-	(1)	-	-	1	1	-	-	-	-	-

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

Les souches de VNC isolées en France restent globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés. Les souches présentant le niveau de résistance le plus élevé étaient associées aux cas importés d'infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139. Les trois souches importées d'Algérie ainsi qu'une souche importée d'Inde étaient résistantes à la ciprofloxacine, à la colistine, à l'érythromycine, à l'acide nalidixique, aux sulfamides, à l'association triméthoprime/sulfaméthoxazole, aux polymyxines, aux tétracyclines et au composé vibriostatique O129.

Les souches de *V. parahaemolyticus* étaient également globalement sensibles à la majorité des antibiotiques testés. Une résistance à l'ampicilline est classiquement décrite pour cette espèce et a été observée chez 34.5% des souches. 51,7% et 58,6% des souches étaient résistantes à la colistine et aux polymyxines. Il n'a pas été noté de différence dans le niveau de résistance pour la souche appartenant au clone pandémique O3 :K6.
Parallèlement à l'étude de la résistance des souches humaines par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de disques BIORAD, la détermination des CMI a été réalisée par la technique Sensititre (Sensititre, Trek) au moyen d'un appareil de lecture semi-automatique. Les antibiotiques testés correspondent ceux de la plaque commerciale EUVSEC, à des dilutions dont la concentration est exprimée en mg/L : ampicilline (1 à 64), céfotaxime (0,25 à 4), ceftazidime (0,5 à 8), méropénème (0,03 à 16), gentamicine (0,5 à 32), sulfaméthoxazole (8 à 1024), triméthoprime (0,25 à 32), tétracycline (2 à 64), tigécycline (0,25 à 8), chloramphénicol (de 8 à 128), l'acide nalidixique (4 à 128), ciprofloxacine (0,03 à 8), azithromycine (2 à 64) et colistine (1 à 16). La validation de la méthode et des valeurs d'interprétation est en cours.

3.2.4. Interface avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

3.2.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Le CNR a participé 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 utilisent un panel PCR multiplex entérique incluant *Vibrio*, 6 en milieu hospitalier et 23 en LBM. Les laboratoires ayant répondu à l'enquête n'étaient pas représentatifs de nos correspondants, seuls 15 d'entre eux ont participé à l'enquête.

- Le CNR a 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'utilisent ni la spectrométrie de masse ni la PCR multiplex syndromique, les autres laboratoires utilisent au moins l'un des deux systèmes.

- Une analyse des données de surveillance cliniques, microbiologiques et épidémiologiques, des cas d'infections à VNC confirmés depuis 1995 en France, menée en 2017 conjointement par le CNR et Santé Publique France à partir des données collectées par le CNRVC, a été finalisée en 2018. Des modifications ont été apportées par l'ajout de nouvelles souches sur la période 2017.

- Le CNR a apporté un soutien aux laboratoires utilisant la PCR syndromique, en réalisant l'étude de 34 échantillons de selles, 16 en 2017, 18 en 2018, à partir desquelles un signal PCR positif avait été obtenu au laboratoire. Seuls 30% d'entre eux 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
- La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNR.
Les médecins ou les biologistes déclarants notifient le cas au médecin inspecteur de santé publique de l'ARS du lieu d'exercice au moyen de la fiche de DO choléra.
De son côté, le CNR déclare l'identification d'une souche de vibrion cholérique sur le territoire français (France Métropolitaine, DOM et Mayotte) à la DGS, Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires et sociales (CORRUS) et à Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail et par courrier.
Le ministère de la Santé et des Solidarités peut être amené à assurer la déclaration internationale des cas confirmés à l'OMS, si le cas entre dans les critères de déclaration du Règlement Sanitaire International en vigueur.
• Dans le cas des infections à vibrions non cholériques, le CNR informe systématiquement Santé publique France, Direction des maladies infectieuses, par mail ou par téléphone, en cas de phénomène anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (formes cliniques inhabituelles, souches atypiques, infections à *V. vulnificus*,...).

4.2. Evènements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année 2018

➥ ***Signalement d'un cas de choléra importé de Birmanie, associé à une souche atypique de vibrion cholérique***

Le CNR a signalé à Santé publique France et à la DGS, Centre opérationnel de réception et de régulation des urgences sanitaires et sociales (CORRUS) l'isolement d'une souche de *V. cholerae* O1 associée à une gastroentérite chez un patient de retour de Birmanie. Ce cas a été déclaré comme un cas de choléra sur la base des critères de notification en France, qui sont un tableau clinique évocateur de choléra avec identification d'un vibrion cholérique, *V. cholerae* O1, et un contexte épidémiologique compatible (retour d'une zone d'endémie ou d'épidémie cholérique).

Sur le plan strictement microbiologique, la définition d'un vibrion cholérique n'inclut pas la notion de toxinogénicité (souche portant les gènes de la toxine cholérique), et le tableau clinique était compatible avec un cas de choléra peu symptomatique. La souche isolée s'est cependant avérée i) non toxinogène, ce qui ne lui confère pas le potentiel épidémique des souches de vibrions cholériques responsables de la 7ème pandémie actuelle, ii) sensible à tous les antibiotiques testés au CNR, ces deux critères étant en faveur d'une origine environnementale.

Ces souches, dont l'isolement chez l'homme est rapporté de façon occasionnelle, n'ont pas le potentiel épidémique des souches toxinogènes et sont généralement à l'origine de cas sporadiques. Leur isolement pose toujours un problème pour ce qui est de la classification et de la souche et du cas clinique, et pose la question de la définition d'un vibrion cholérique, dès lors qu'entrent en considération, outre les critères microbiologiques, des critères tels que la présentation clinique et le contexte épidémiologique de la contamination.

L'existence de telles souches a été signalée depuis de nombreuses années dans plusieurs régions du monde, en particulier lors de la septième pandémie cholérique en Amérique Latine. Notifier des infections par *V. cholerae* O1 ou O139 ne produisant pas de toxines comme des cas de choléra peut prêter à confusion dans des zones d'endémie cholérique ou à potentiel épidémique, et n'est pas recommandé, mais ne pas notifier comme tel des cas cliniquement et épidémiologiquement compatibles avec du choléra et associés à une souche de *V. cholerae* O1 ne semble pas souhaitable.

➥ ***Signalement d'un cas de choléra importé d'Inde***

Un cas de choléra a été déclaré en 2018 chez un patient de retour d'un séjour en Inde, selon les critères de notification définis sur la fiche de DO d'un cas de choléra en France, qui sont "un tableau clinique évocateur de choléra et l'identification d'un vibrion cholérique avec confirmation par le Centre National de Référence des Vibrions et du Choléra.

➥ ***Signalement d'une souche atypique de V. cholerae*** (*V. cholerae* non-O1/non-O139 toxinogène)

Le CNR a signalé à Santé publique France l'isolement d'une souche atypique de *V. cholerae* non-O1/non-O139, porteuse des gènes de la toxine cholérique, considérée comme le facteur de virulence majeur des souches de *V. cholerae* O1 et O139, agents étiologiques du choléra, et associée au potentiel épidémique des souches de vibrions cholériques. Cette souche a été isolée d'une hémoculture chez un patient de retour de Tunisie, présentant un tableau clinique de septicémie primaire et des facteurs de risque compatible avec une telle évolution. De telles souches atypiques sont rarement été isolées de cas cliniques, en France trois souches présentant cette caractéristique avaient été auparavant, 2 en 2009, une en 2017, chez des patients de retour du Maroc.

➥ ***Signalement d'une forme inhabituelle d'infection à V. parahaemolyticus***

Le CNR a signalé à Santé publique France un cas sévère d'infection septique et lésions cutanées bulleuses à *V. parahaemolyticus* chez un patient ne présentant pas de facteur de risque connu et pour lequel la seule exposition retrouvée était la consommation d'huîtres.

V. parahaemolyticus est habituellement responsable de syndromes entériques d'origine alimentaire, évoluant extrêmement rarement vers une forme septicémique chez des patient débilités. La clinique décrite pour ce cas semblait davantage évocatrice d'une infection à *V. vulnificus*, pour lesquelles une telle évolution n'est cependant rapportée que chez des patients présentant un terrain prédisposant (hôtes immunodéprimés ou atteints de maladies sous-jacentes, maladies hépatiques chroniques ou exposant à une surcharge en fer).

➥ ***Signalements de suspicions de cas de choléra importés***

Le CNR a signalé à Santé publique France 3 suspicions de cas de choléra importés chez des patients hospitalisés, pour lesquels les biologistes ou cliniciens avait fait un signalement à l'ARS, concernant :

- un patient de retour d'Haïti, janvier 2018
- un patient de retour d'Afrique du Sud, avril 2018
- un patient de retour d'Algérie, août 2018

➥ ***Autre signalement***

Le CNR a informé Santé publique France de l'isolement au cours d'un dépistage systématique pré-opératoire d'une souche de *V. cholerae* chez une personne arrivant du Koweit, ne présentant aucun symptôme digestif. Un signalement avait été fait à l'ARS par le Centre hospitalier ayant effectué l'examen et devant prendre en charge cette personne.

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

5.1. Conseils et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Enseignements et formations aux professionnels de santé

Les cours donnés en 2018 se sont adressés à des médecins, pharmaciens, vétérinaires, scientifiques et ingénieurs souhaitant se spécialiser dans les relations entre les agents infectieux, leurs hôtes et l'environnement. Des cours ont également été donnés à des cadres bactériologistes du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), sur la surveillance microbiologique en Santé Publique dans le cadre d'un Programme RESER (Réseau d'Etude et de Surveillance des Pathogènes Émergents), dans l'objectif de renforcer les capacités de référence de 6 instituts du RIIP en Afrique, pour une meilleure détection des maladies bactériennes et de leur émergence :

- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, "Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque", "Le Choléra, épidémiologie et prévention", Institut Pasteur, 30/01/2018 (M-L Quilici).
- Cours Master 2, Université Paris 6, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. "Epidémiologie du Choléra", Faculté de Médecine Saint-Antoine, 25/09/2018 (M-L Quilici).
- Cours RESER, Instituts de Madagascar, Cameroun, Côte d'Ivoire, Sénégal, Maroc et Tunisie, Module *Vibrio* et choléra, Institut Pasteur Paris :

- Choléra, rôle du CNR, identification et méthodes de typage, 23/11/2018 (M-L Quilici).
- Clinique et épidémiologie des infections à vibrions non-cholériques (M-L Quilici).

5.1.2 Accueil de stagiaires

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

- Une étudiante en BTS Bioanalyses et Contrôles, Adeline COLOMBE, a été accueillie du 28 mai au 6 juillet 2018 (6 semaines), pour la validation de sa première année de formation, puis du 29 octobre au 21 décembre 2018 (8 semaines), pour son stage de fin d'études. Son travail a porté sur une étude par MLVA de souches de *V. cholerae* O1 isolées au Sud-Soudan.
- Une stagiaire du programme RESER de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur de Paris, Lovasoa RAMPARANY, biologiste à l'Institut Pasteur de Madagascar, membre du Réseau International des Instituts Pasteur, a été accueillie au CNR du 27 novembre au 07 décembre 2018, pour un stage d'observation.
- Une stagiaire du programme RESER de la Direction Internationale de l'Institut Pasteur de Paris, Ariane NZOUANKEU, biologiste à l'Institut Pasteur du Cameroun, membre du Réseau International des Instituts Pasteur, a été accueillie au CNR du 10 au 20 décembre 2018, pour un stage d'observation.
- Un étudiant en Licence Professionnelle de Génomique (CNAM), Hugo LEPY, est accueilli en alternance au CNR depuis le 10 septembre 2018 pour une étude de caractérisation des vibrions par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof. Il sera accueilli jusqu'au au 06 septembre 2019.

D'autres étudiants ont été accueillis dans l'unité de recherche BPE, pour des travaux sur la thématique *Vibrio* :

- Une étudiante en Master 2, Microbiologie appliquée et génie biologique, de l'université Paris Diderot, Marine GAILLARD, pour son stage de fin d'études, du 19 février au 31 août 2018 (28 semaines), pour une étude de la résistance aux antibiotiques de Vibrio cholerae O1, corrélation avec des données de séquences génomiques (soutenance le 14 septembre 2018).
- Une chercheuse statutaire, le Dr Mihaela OPREA, biologiste à l'Institut de recherche Cantacuzène (Bucarest, Roumanie), membre du Réseau International des Instituts Pasteur, du 1er octobre au 30 novembre 2018, pour une session de formation à l'analyse de données de séquences de vibrions cholériques.
- Une biologiste à l'hôpital Béclère de Paris, Caroline ROUARD, dans le cadre d'un Poste d'accueil de l'AP-HP, du 05 novembre 2018 au 31 octobre 2019, pour une étude de génomique comparative et évolutive des vibrions cholériques du biotype classique.

5.1.3 Guides élaborés

- Quilici M.-L, Robert-Pillot A. Chapitre *Vibrio*. In : Précis de bactériologie clinique, 3e Edition, Ed. ESKA 2018, Chap 67, 28 p.
- Un article à destination des biologistes a été publié dans la revue Spectra Biologie, portant sur la

recherche de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae* dans les selles en absence de milieux spécifiques, Quilici ML, Robert-Pillot A. *Vibrio* et gastroentérites : vigilance et bonnes pratiques. Spectra Biologie n° 215, Mai 2015, 67-70.

- Une revue sur « Les Infections à Vibrions non cholériques » a été rédigée pour le traité Maladies Infectieuses de l'Encyclopédie Médico-Chirurgicale; elle traite de parties techniques concernant l'identification des souches, en particulier les méthodes de fabrication des milieux utiles au diagnostic Quilici ML, Robert-Pillot A. Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 2011, 8- 026-F-15, 2011, 12 p.
- Un article sur le diagnostic bactériologique du choléra a été rédigé pour la « Revue francophone des laboratoires », dans le cadre d'un numéro spécial consacré à la Pathologie Tropicale,
  Quilici ML, Le diagnostic bactériologique du choléra, (Elsevier Masson SAS), 2011, 431, 51-65.
- Un « Protocole provisoire de détection de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio parahaemolyticus* dans les produits de la mer », rédigé en collaboration avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Environnement et Santé, Ecole Nationale de la Santé Publique, Rennes, et le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Produits de la Pêche, AFSSA-Site de Boulogne-sur-Mer, a été diffusé auprès des laboratoires vétérinaires départementaux dès 2003. Il a été et remis à jour en 2010, et est disponible sur le site internet du CNR, http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-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 :

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

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

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

5.1.5. Activités de conseil aux professionnels de santé

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

5.2. Conseils et expertises aux autorités sanitaires nationales et internationales

- La responsable du CNR a été sollicitée en 2017-2018 pour la mise à jour d'une fiche de dangers *Vibrio* dans le cadre du CES BIORISK de l'ANSES, en tant que rapporteur. La fiche a été présentée au CES Biorisk le mardi 10 avril 2018.

- 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 aux groupes de travail internationaux suivants :

- GTFCC WASH Working Group, 27 - 28 February 2018, Fondation Merieux, Centre de Conference des Pensières, Veyrier du Lac, France.

• GTFCC Surveillance Working Group, 16 to 18 April 2018, Fondation Merieux, Centre de Conference des Pensières, Veyrier du Lac.

• 5th GTFCC Annual Meeting, 13 - 14 June 2018, Fondation Merieux, Conference Centre les Pensieres, Veyrier du Lac, France.

• GTFCC Research Agenda – Scoping meeting on 23rd and 24th July, Welcome Trust and the Department for international development (DFID), Londres, Angleterre.

• Consultative meeting to discuss knowledge gaps and unanswered questions related to the cholera outbreak in Yemen, 9 - 11 October in Amman, Jordan, World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean.

• GTFCC 3rd meeting of the Case Management Working Group, 5 - 6 november 2018, Fondation Merieux, Centre de Conference des Pensières, Veyrier du Lac, France.

- La DGS, Centre Opérationnel de Régulation et de Réponse aux Urgences Sanitaires et Sociales, a invité le CNR à participer à une conférence téléphonique le mardi 11 septembre 2018, pour un retour d'expérience de la gestion de la suspicion de choléra chez un enfant à bord du vol Oran – Perpignan du mercredi 05/09, notamment sur les aspects de communication (gestion médiatique).

• Le Ministère des affaires étrangères a sollicité le CNR dans le cadre de l'épidémie de choléra en Zambie, sur l'intérêt d'une indication vaccinale pour les ressortissants français.

• Le Ministère de l'agriculture, DGAL, a sollicité le CNR sur la surveillance et les mesures de gestion existant en France pour l'espèce *V. fluvialis*, éventuellement présente dans les produits de la mer.

• Le Ministère de l'agriculture, DGAL, a sollicité le CNR sur l'impact de la production de tétrodoxine par *V. parahaemolyticus*, ce sujet ayant été discuté au niveau communautaire.

• L'Agence Régionale de Santé Ile-de-France (ARS DD78) a sollicité le CNR sur la signification d'un portage asymptomatique de *V. cholerae*.

• Santé publique France a relayé au CNR une demande de la CIRE d'Auvergne dans le cadre de l'investigation d'une TIAC à *V. parahaemolyticus* incriminant des moules.

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 2018

• Immunogénicité d'un vaccin anticholérique oral administré selon un schéma vaccinal impliquant une deuxième dose différée. Kalémie, République démocratique du Congo.
Projet de recherche clinique n° 2016-032, mené en collaboration entre le CNR, Médecins sans Frontières/Epicentre et la Plate-Forme d'Ingénierie des anticorps, Institut Pasteur.
Un vaccin anticholérique oral (VCO) préqualifié par l'OMS est utilisé dans le cadre de campagnes vaccinales de prévention et riposte aux épidémies de choléra. Ce vaccin est normalement donné en deux doses à 14 jours d'intervalle, mais les schémas d'administration alternatifs, qui pourraient être plus pratiques à mettre en place au cours d'une épidémie, n'ont pas été étudiés. La région de Kalémie, en RDC, est une zone endémique pour le choléra. Une campagne de vaccination orale contre le choléra a été organisée en novembre 2013 dans le cadre de mesures préventives visant à protéger la population. Pour des raisons de sécurité, la deuxième dose n'a pas pu être administrée à 14 jours d'intervalle, et une nouvelle activité de vaccination a été entreprise en juillet 2014. Cette situation a donné une opportunité unique pour mieux comprendre la réponse immunitaire à une deuxième dose différée du vaccin. L'objectif principal de cette étude est donc de comparer les niveaux d'anticorps vibriocides après deux doses de VCO administrées à 14 jours ou 8 mois d'intervalle. Pour cela des prélèvements de sang ont été effectués immédiatement avant la vaccination (J0), que les sujets aient été ou non préalablement vaccinés huit mois auparavant, à J14 et J28 ; 1124 sérums sont en cours d'étude au CNR par la méthode de dosage des anticorps vibriocides et détection des Immunoglobulines impliquées dans la réponse immunitaire. Ce travail est toujours en cours et a bénéficié d'un soutien financier de l'OMS permettant le recrutement d'une aide technique ponctuelle.

• Etude de l'efficacité d'une dose unique de vaccin anticholérique oral en réponse à une épidémie en Zambie. *Collaboration avec Epicentre, MoH Zambia, MSF, WHO, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.*
Une étude cas-témoin a été mise en place pour quantifier l'efficacité à court terme d'une campagne de vaccination à dose unique, du fait du nombre insuffisant de doses disponibles, du vaccin Shanchol®, menée en 2016 en Zambie; 330 participants ont été enrôlés pour l'étude, une efficacité de 88,9% a été montrée. Les résultats ont été publiés en 2018.

• Evaluation du test de diagnostic rapide du choléra SD Bioline. *Collaboration avec Epicentre, MSF, ECDC, MoH Zambia, University of Zambia, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health.*
En parallèle à l'étude d'efficacité vaccinale les performances du test de diagnostic SD Bioline ont été évaluées en combinant culture et PCR comme gold standard. Les tests ont montré une sensibilité de 90,9% et une spécificité de 95,2%. Après enrichissement, la sensibilité était de 95,5% et la spécificité de 100%. Les résultats ont été publiés en 2018.

• **Analyse de l'origine et l'évolution dynamique de l'épidémie de choléra de 2014 au Sud Soudan et en Ouganda**, *collaboration avec le Ministère de la santé du Sud Soudan, World Health Organization South Sudan Country Office, Kenya Medical Research Institute, MSF / Epicentre.*
Le choléra a tendance à être rapporté au niveau national, peu d'études ont fourni des preuves de l'interdépendance des épidémies dans des pays frontaliers sur des résultats combinant à la fois données microbiologique et épidémiologiques. L'analyse des données des ministères de la santé en Ouganda et au Soudan du Sud et l'analyse moléculaire de souches de *V. cholerae* par MLVA ont révélé l'interdépendance des épidémies dans les deux pays en 2014. Les résultats ont été publiés en 2018.

• **Etude de l'épidémie de choléra au Yemen, 2016-2017**. *Collaboration Epicentre, London School of Hygiene &Tropical Medicine, WHO Yemen, Egypt, CPHL Yemen, MSF, WHO Geneva, Johns Hopkins School of Public Health, UNICEF, Sana'a, Yemen.*
Des cas de choléra ont été signalés en septembre 2016 puis à partir d'avril 2017, à l'origine de la plus grande épidémie documentée de choléra des temps modernes. L'épidémie s'est manifestée sous forme de deux vagues distinctes avec une forte augmentation de la transmission en mai 2017. L'analyse de l'épidémie a été réalisée à partir des données de surveillance récoltées par les autorités de santé, et par le suivi microbiologique des souches. La transmission généralisée du choléra qui a conduit à la deuxième vague catastrophique observée en 2017 a été associée à la saison des pluies. L'analyse microbiologique a montré que la résurgence de l'épidémie en 2017 n'était pas associée à l'introduction d'une nouvelle souche de *V. cholerae* différente de celle de la première vague. Les résultats ont été publiés en 2018 (Lancet Glob Health).

En collaboration entre l'Unité BPE et le Wellcome Trust Sanger Institute, le séquençage du génome de souches isolées des deux vagues cette épidémie ainsi que d'isolats récents de pays voisins a été réalisé pour identifier les origines et les voies de transmission possibles des souches du Yémen. Il a pu être démontré qu'elles faisaient partie d'une lignée unique originaire d'Asie du Sud, ayant circulé préalablement en Afrique. Cette lignée représente l'introduction la plus récente en Afrique de l'Est, elle présente la particularité d'être sensible aux polymyxines, dont la résistance est utilisée comme l'un des principaux marqueurs des souches du biotype El Tor, responsables de la septième pandémie. La propagation de cette souche doit être surveillée attentivement afin de mesurer les conséquences cliniques et épidémiologiques de ce profil de résistance particulier.
Ces résultats ont été publiés en janvier 2019 dans la revue Nature, "Genomic insights into the 2016-2017 Yemen cholera outbreak".

• Etude de la résistance aux antibiotiques de *V. cholerae* O1, corrélation avec des données de génomes,
CNRVC/Unité BPE
En l'absence d'un consensus international sur la définition des valeurs critiques qui délimitent les catégories cliniques pour les *Vibrio*, un travail visant à faire des propositions permettant d'établir des valeurs de cut-offs, en associant le contenu en gènes de résistance de souches sensibles et résistantes et les valeurs de CMI/diamètres obtenus au CNR, a été initié en 2017 au CNR ; les résultats de l'étude de 250 souches sont en cours d'analyse.

• **Etude et comparaison des profils de résistance aux antibiotiques des souches de *V. parahaemolyticus* isolées d'aliments et de cas humains**.
Projet sur deux ans en collaboration avec l'ANSES de Boulogne-sur-Mer, financement de la Direction Générale de l'Alimentation.
Cette étude vise à apporter des données participant à la standardisation et à la définition de critères d'interprétation pour la réalisation des antibiogrammes pour *V. parahaemolyticus,* et des informations sur l'impact éventuel de souches alimentaires résistantes en santé publique après comparaison des profils de résistance aux antibiotiques des souches de *V. parahaemolyticus* isolées d'aliments et de zones géographiques diverse, et de cas humains.

• **Caractérisation des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 d'origines écologiques diverses** : la reconnaissance du *rôle des vibrions en pathologie humaine est surtout due à l'existence du vibrion cholérique, V.* cholerae des sérogroupes O1 ou O139. Cependant les souches d'autres sérogroupes peuvent être à l'origine de pathologies sévères et rapidement évolutives chez des patients immunodéprimés. Contrairement aux souches de vibrions cholériques (*V. cholerae* O1 et O139), les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 sont génétiquement très hétérogènes, et aucun facteur de pathogénicité n'a été à ce jour associé aux souches responsables de pathologies chez l'homme. Les infections font suite à un contact direct avec l'eau ou à la consommation de produits de la mer dans lesquels les *Vibrio* sont naturellement présents. Actuellement, en l'absence de marqueurs moléculaires spécifiquement associés à l'expression du pouvoir pathogène chez l'homme, rien ne permet aujourd'hui de différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes. Le CNR dispose d'une collection de plus de 350 souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées chez l'homme (plus de 160 souches cliniques d'origines géographiques diverses et associées à différents syndromes) ou dans les aliments, qui sont séquencées dans le but de décrire la structure des populations, d'identifier les facteurs de pathogénicité, de créer des banques de données génomiques et de développer un schéma Whole genome MLST ; 96 souches ont été séquencées en 2018.
Ce projet bénéficie du recrutement en CDD d'un Ingénieur de recherche – Slim EL KHIARI.

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

6.2 Liste des publications et communications

- *Publications nationales*

Pougnet L, Pougnet R, Voarino A, Sapin J, Drouillard I, **Quilici ML**, Désidéri-Vaillant C. Cholera in Brest, France. Ann Biol Clin (Paris). 2018 Jan 1;76(1):107-110. doi: 10.1684/abc.2017.1307.

- *Publications internationales*

Ferreras E, Chizema-Kawesha E, Blake A, Chewe O, Mwaba J, Zulu G, Poncin M, Rakesh A, Page AL, Stoitsova S, Voute C, Uzzeni F, Robert H, Serafini M, Matapo B, Eiros JM, **Quilici ML**, Pezzoli L, Azman AS, Cohuet S, Ciglenecki I, Malama K, Luquero FJ. Single-Dose Cholera Vaccine in

Response to an Outbreak in Zambia**.** ***N Engl J Med*** 2018; 378:577-579. DOI: 10.1056/NEJMc1711583

Abubakar A, Bwire G, Azman AS, Bouhenia M, Deng LL, Wamala JF, Rumunu J, Kagirita A, Rauzier J, Grout L, Martin S, Orach CG, Luquero FJ, **Quilici ML**. Cholera Epidemic in South Sudan and Uganda and Need for International Collaboration in Cholera Control. **Emerg Infect Dis**. 2018 May;24(5):883-887. doi: 10.3201/eid2405.171651.

Camacho A, Bouhenia M, Alyusfi R, Alkohlani A, Naji MAM, de Radiguès X, Abubakar AM, Almoalmi A, Seguin C, Sagrado MJ, Poncin M, McRae M, Musoke M, Rakesh A, Porten K, Haskew C, Atkins KE, Eggo RM, Azman AS, Broekhuijsen M, Saatcioglu MA, Pezzoli L, **Quilici ML**, Al-Mesbahy AR, Zagaria N, Luquero FJ. Cholera epidemic in Yemen, 2016–18: an analysis of surveillance data. **Lancet Glob Health.** 2018 Jun;6(6):e680-e690. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30230-4. Epub 2018 May 3.

Mwaba J, Ferreras E, Chizema-Kawesa E, Mwimbe D, Tafirenyika F, Rauzier J, Blake A, Rakesh A, Poncin M, Stoitsova S, Kwenda G, Azman AS, Chewe O, Serafini M, Lukwesa-Musyani C, Cohuet S, **Quilici ML**, Luquero FJ, Page AL. Evaluation of the SD Bioline Cholera Rapid Diagnostic Test During the 2016 Cholera Outbreak in Lusaka, Zambia. **Trop Med Int Health**. 2018 May 31. doi: 10.1111/tmi.13084.

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

- *Conférences*

5th Annual Meeting of the GTFCC 13 and 14 June 2018 Fondation Merieux, Centre de Conference des Pensières, Veyrier du Lac. Communication orale, " Update from the Laboratory and Surveillance Working Group", ML Quilici.

4th Institut Pasteur International Network Symposium, Paris, November 15-16, 2018. Combating resistance: microbes and vectors. Communication orale, "The 2016-2017 Yemen cholera outbreak is caused by a recent seventh pandemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor sublineage with an unexpected antibioresistance profile", ML Quilici.

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 ».
- 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.
- Dans le domaine de la santé animale, le CNR a été contacté par le laboratoire LABOCEA pour la confirmation d'identification d'une souche de *V. cholerae* isolée chez un bovin. Cette souche sera intégrée à l'étude en cours au CNR sur les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 de diverses origines écologiques.

8/ Programme d'activité pour 2018-2019

Le CNR a été reconduit, suite à l'appel à candidature lancé le 20 juin 2016 par Santé publique France en vue de la nomination des Centres Nationaux de Référence, pour la période 2017-2021. Il poursuivra donc son activité conformément au programme de travail quinquennal présenté dans le dossier de candidature de l'Unité des Bactéries Pathogènes Entériques.
Concernant la partie recherche, les projets seront essentiellement centrés sur l'amélioration des méthodes de diagnostic et de typage appliquées aux investigations épidémiologiques, sur la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques des souches de vibrions cholériques, sur le développement d'outils permettant une amélioration des systèmes de surveillance des aliments et de l'environnement.

Seront poursuivis :

- 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.

- La transition entre bactériologie classique et génomique/protéomique haut-débit par le séquençage à la Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) par la technique Illumina des souches reçues au

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

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

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

ANNEXES

Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

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

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

Annexe supplémentaire : Déclaration d'intérêt

1.1 Missions et objectifs majeurs du CNR

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

Cahiers des charges spécifiques du CNR

Vibrions et choléra

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

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

Pour le Vibrion cholérique

1. Apporter une expertise microbiologique :

   - confirmer l'identification et typer les souches de vibrion 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.

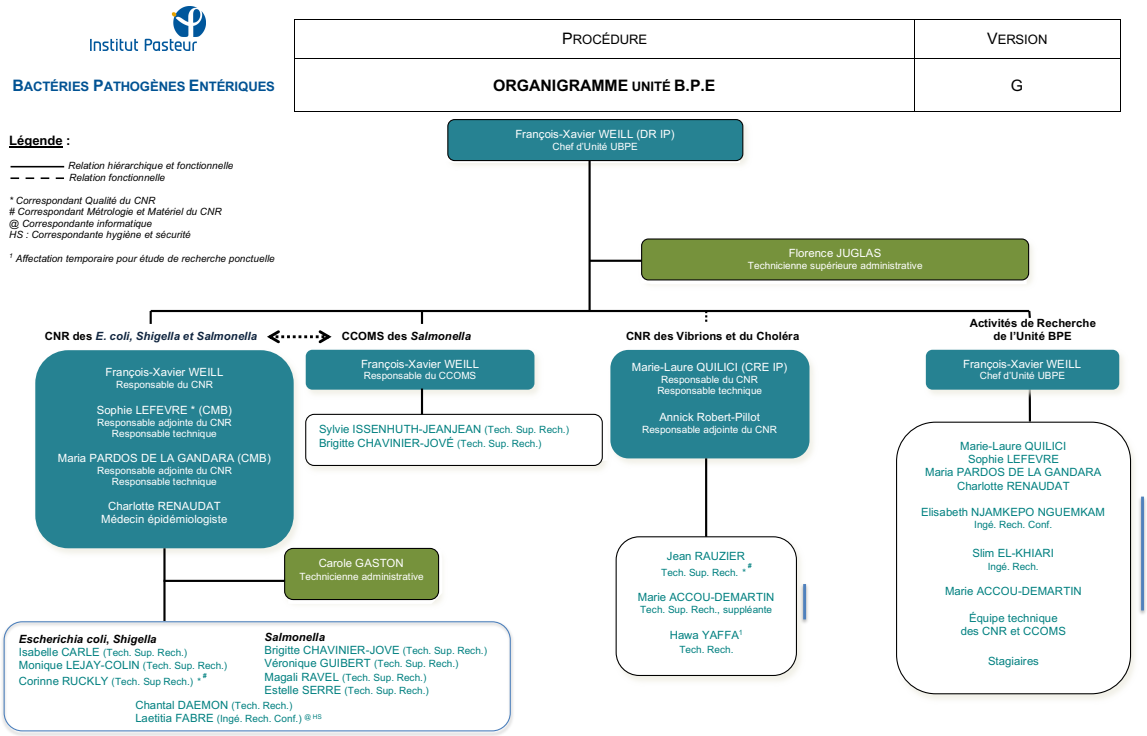
1.2 Organisation du CNR

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

Effectif pour le CNR par catégories de fonctions

Nom - prénom	Qualifications*	ETP
QUILICI Marie-Laure	**Scientifique (Responsable du CNR)**	0,40
ROBERT-PILLOT Annick	**Scientifique (Responsable-adjointe)**	0,20
RAUZIER Jean	**Technicien supérieur de recherche**	0,65
ACCOU-DEMARTIN Marie	**Technicienne supérieure de recherche**	0,10
JUGLAS Florence	**Assistante**	0,25
TOTAL 2018		1,6

Organigramme de l'Unité BPE



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

1.3 Locaux et équipements

1.3-1 Locaux

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

Plan 1, 3ème étage du bâtiment Biotop

- Les pièces 01A et 02, représentant deux laboratoires pour une surface totale de 26 m^2, 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^2 (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^2 (pièce 19) contenant des agitateurs Infors, 2 congélateurs à -80°C et une ultracentrifugeuse
- Une pièce de 12 m^2 (pièce 12) contenant les balances et une hotte chimique.
- Une chambre froide de 6,5 m^2 (pièce 22) contenant les milieux de cultures et certains réactifs.

Plan 2, 1er étage du bâtiment Biotop

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

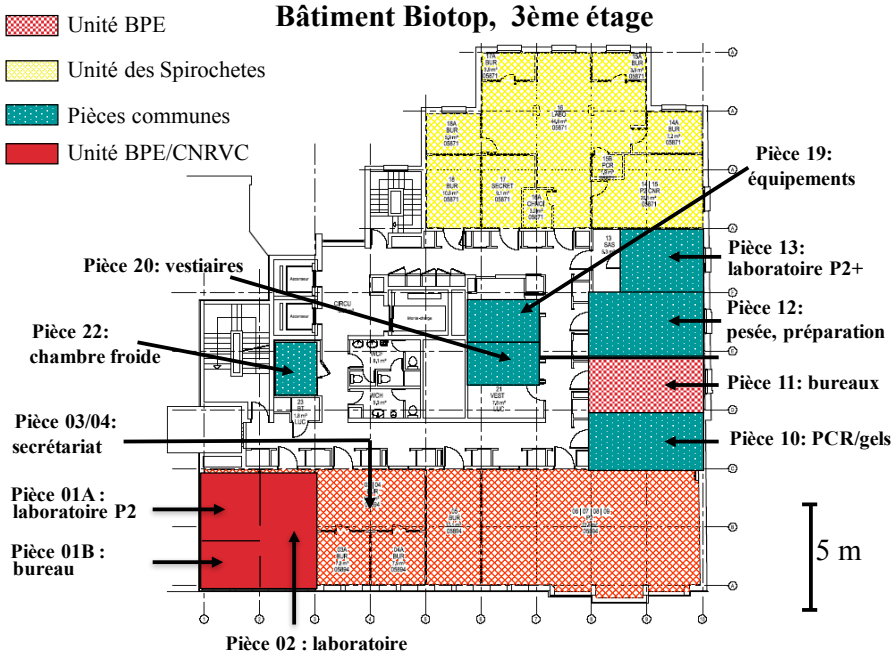
Plan 3, 4ème étage du bâtiment Biotop

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

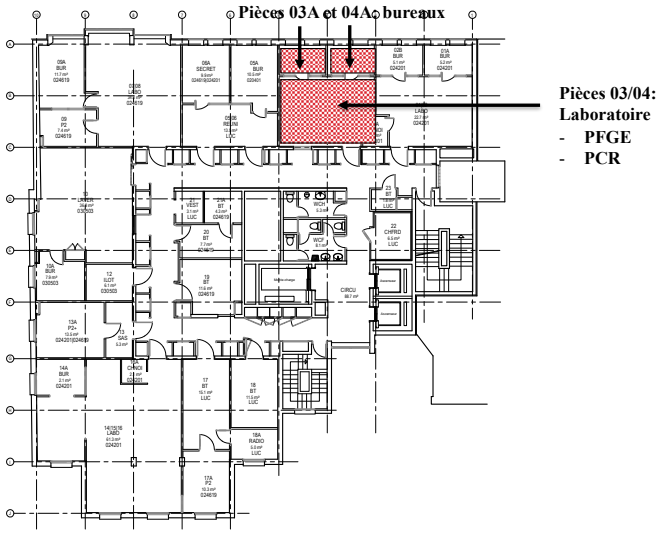
Le CNR-VC comprend également :

- 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.

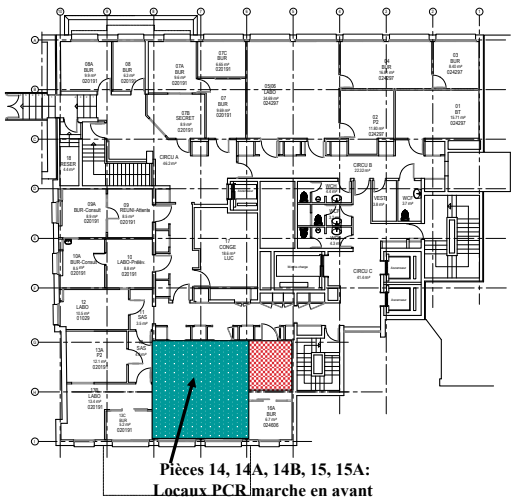
Plan 1



Plan 2



Plan 3



1.3-2 Équipements

Dans la structure

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

Commun à l'Unité BPE :
- Un appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad)
- Un système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan

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

1.3-3 Moyens extérieurs à la structure et services supports

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

- La Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M),

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Collection de matériel biologique

• Toutes les souches appartenant au genre *Vibrio* collectées dans le cadre des activités du CNR sont conservées par congélation à -80°C et en azote liquide. Les souches de *V. cholerae* étaient jusqu'en 2000 également conservées sous forme lyophilisée.
• Les souches issues de collaborations scientifiques nationales ou internationales sont également conservées dans l'unité par congélation à -80°C et en azote liquide. La majorité d'entre elles sont des souches de vibrions cholériques. Ce matériel biologique permet de suivre l'évolution des populations bactériennes.
• Toutes les souches du CNR mises en collection ont été caractérisées par l'étude de leurs caractères biochimiques et culturaux, et par des techniques moléculaires effectuées systématiquement, en fonction des critères définis précédemment et des techniques mises en place au CNR depuis 1998.
• Production d'immun sérums de référence :
Le CNR préparait jusqu'en 2011 des immuns sérums polyclonaux de lapins pour le diagnostic bactériologique du choléra par agglutination (sérums anti-O1 et anti-O139), ainsi que pour la détermination du sérotype des souches de vibrions cholériques (sérums anti-Ogawa et anti-Inaba), à partir d'une collection de souches de référence. Un stock de ces sérums est actuellement maintenu au CNR, mais leur préparation n'est plus assurée, ces sérums étant maintenant commercialisés.
• Le CNR peut être amené à assurer une distribution de certaines souches, utilisées comme souches de référence (souches témoins de PCR par exemple), ou dans le cadre de collaborations scientifiques. L'accès aux souches et données associées collectées dans le cadre de l'activité des CNR se fait après accord du responsable du CNR. Il est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) et d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.
Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.
En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNR soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.
A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNR.

1.5 Démarche qualité du laboratoire de Référence et d'Expertise Multi-Site (LREMS) : synthèse 2018

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

Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur : le CNRVC fait partie des 14 Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur. Ces CNR sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.
Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

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

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

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

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

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

Le CNR-VC est engagé dans la démarche qualité depuis 2000. Il est inclus dans la 4ème vague d'accréditation des activités analytiques. La rédaction des procédures et modes opératoires analytiques et documents d'enregistrement pour ses activités de diagnostic a été réalisée, avec une gestion documentaire électronique des documents et leur mise en ligne sur la plateforme webcampus de l'Institut Pasteur, dans l'espace dédié au CNR. Le CNRVC participe annuellement à des contrôles externes de la qualité via des essais inter laboratoires, avec le CNR de Liège.
La démarche qualité spécifique au CNRVC en 2018 a été présentée au point 1-3 de ce rapport. A terme, la portée d'accréditation du CNRVC concernera le diagnostic des infections à vibrions cholériques et non cholériques par l'identification moléculaire des espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*.

Perspectives 2019 pour le LREMS et le CNRVC :

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revues qualité LRE (CNRVC)	Avril 2019
Audit COFRAC LREMS S6 (Le CNRVC ne fait pas partie de l'échantillonnage)	15 au 19 Avril 2019
Audits internes qualité et technique	Dernier trimestre 2019
Revue de direction LRE-MS	Mai -Juin 2019
Portée d'accréditation complète liste des techniques et prévisions en Annexe 2	Octobre 2020

2.1 Techniques de référence

2.1-1 Techniques disponibles

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

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

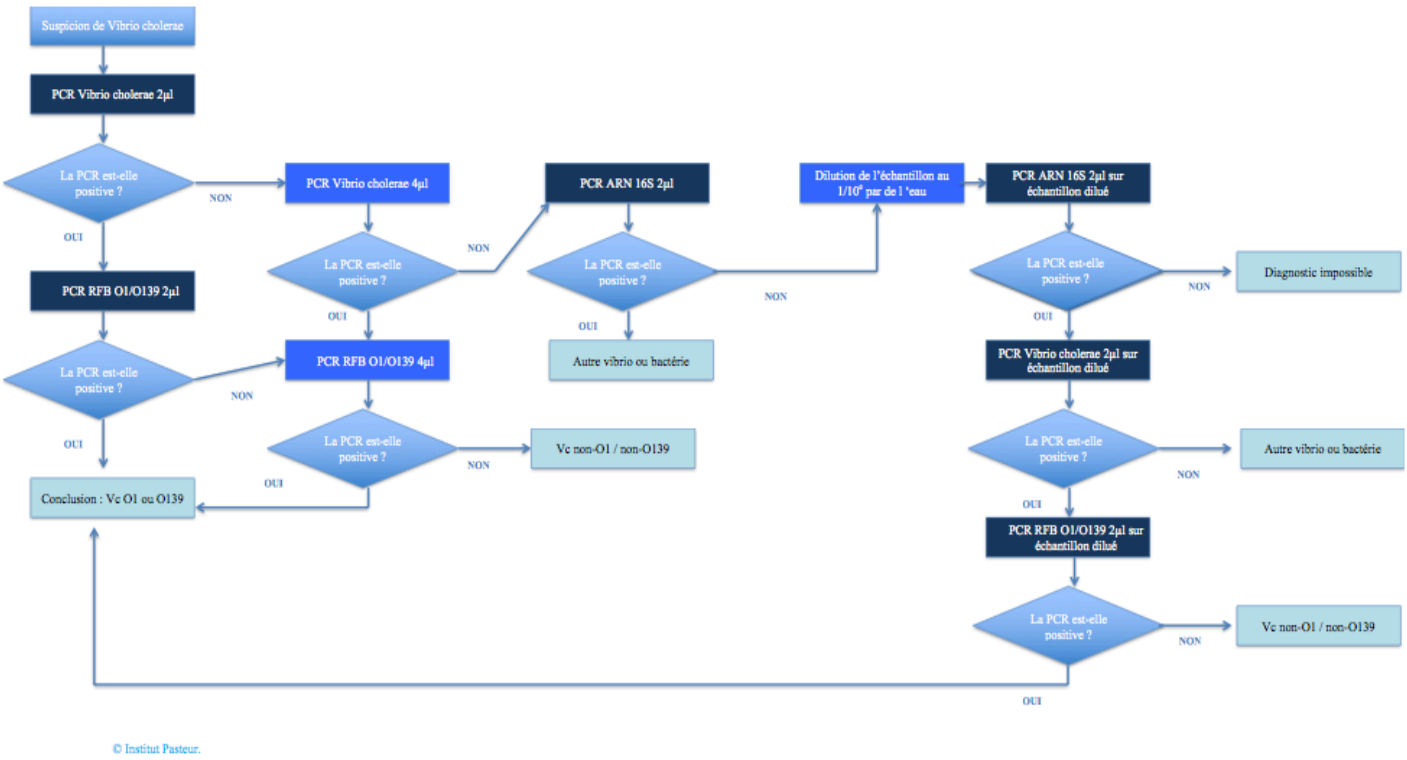
Le CNR peut être amené à rechercher le vibrion cholérique directement sur des prélèvements de selles. Ces prélèvements sont le plus souvent envoyés par des organisations humanitaires, et proviennent de pays en zone d'endémie cholérique et/ou exposés à un risque d'épidémie. Leur analyse revêt toujours 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 vibrion 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 vibrion 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 vibrion cholérique, qui va entraîner une déclaration aux autorités sanitaires, associe l'étude de quelques caractères - morphologiques, culturaux et biochimiques - à la recherche de l'agglutination des colonies suspectes par les sérums anti *V. cholerae* O1 et O139.

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

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

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

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



© Institut Pasteur.

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 culturaux : 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
r72H / toxR	*V. parahaemolyticus*
hly	*V. vulnificus*
espace intergénique 16-23S	*V. cholerae*
espace intergénique 16S-23S	*V. cholerae* et *V. mimicus*
collagénase	*V. alginolyticus*

- Amplification et séquençage des gènes *rrs*, codant pour l'ARN 16S, et des gènes *rpoB* (codant pour la sous-unité béta 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
ctxA	Toxine cholérique	*V. cholerae*
ctxB		
tcpA classique	Toxin-corregulated pilus	
tcpA El Tor		
hlyA classique	hémolysine	
hlyA El Tor		
rstR	Répresseur du phage CTXϕ	
stn	Entérotoxine thermo-stable	
tdh	Hémolysine TDH	*V. parahaemolyticus*
trh	Hémolysine TRH	
orf8	Séq. phage filamenteux	
toxRS	Régulateur de transcription	

2.1-6 Typage moléculaire

Le typage moléculaire est effectué lorsqu'il existe une notion de cas groupés ou que l'origine d'une contamination est recherchée.

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

2.1-7 Caractérisations supplémentaires

Les PCR suivantes sont également effectuées en routine au CNR :

Séquence cible	Fonction
*rfb*O1/O139	Synthèse des polysaccharides O1 et O139 de *V. cholerae*
*gyr*A	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
*gyr*B	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
*par*C	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones
*par*E	Associé à la sensibilité diminuée aux fluoroquinolones

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

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

  L'interprétation en catégories S (Sensible), I (Intermédiaire) et R (Résistant) est faite en accord avec l'édition 2017 de l'EUCAST, basés sur le diamètre des zones d'inhibition des Entérobactéries, en l'absence de critères spécifiques aux vibrions définis par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Les résultats sont exprimés de manière qualitative en catégories cliniques (sensible, intermédiaire, résistant).
- La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par bandelettes Etest® (AB bioMerieux) est systématiquement effectuée pour détecter les souches de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones (test de l'acide Nalidixique et 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. L'interprétation est faite à partir des valeurs de concentrations critiques définies pour les Entérobactéries. Depuis 2017, le CNR détermine en parallèle les CMI en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™ (plaque commerciale EUVSEC), afin d'évaluer à terme la meilleure méthode permettant de déterminer la sensibilité des *Vibrio* aux antibiotiques.
- 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 vibrion 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 sérogroupe 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 corregulated 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 évidences, 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 sérogroupe 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 ; 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.

2.3 Techniques recommandées par le CNR

- Bactériologie classique :

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

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

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

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

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

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/cholera_lab_manual.htm.

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

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

Diagnostic des infections à vibrions non cholériques

- Un article sur les Infections à vibrions non-cholériques, publié en 2011 dans l'Encyclopédie Médico Chirurgicale (Elsevier Masson SAS, Paris, Maladies infectieuses), décrit les méthodes d'isolement des VNC ainsi que les milieux à utiliser pour leur recherche :
  Quilici M.-L, Robert-Pillot A. (2011). Infections à vibrions non-cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-026-F-15, 2011, 12 p.

Le CNR recommande l'utilisation des méthodes moléculaires (PCR) pour l'identification des vibrions non cholériques, ou l'utilisation de la spectrométrie de masse. Le CNR recommande cependant aux utilisateurs de la spectrométrie de masse d'être attentifs à la base de données associée, en particulier concernant l'identification de l'espèce *V. cholerae*.

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

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

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

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

- Le CNR recommande de réaliser un antibiogramme pour le traitement des cas de choléra, du fait des multirésistances des souches, et renvoie aux recommandations de l'OMS pour le choix des antibiotiques,
https://www.who.int/cholera/task_force/use-of-antibiotics-for-the-treatment-of-cholera.pdf?ua=1
En l'absence de critères spécifiques aux *Vibrio*, le référentiel d'interprétation est celui appliqué aux Entérobactéries (EUCAST).

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.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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 *V. cholerae*	Portée A flexible	Accrédité
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Recherche des gènes *ctxA* et *ctxB*	Portée A flexible	Accréditée
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de *V.parahaemolyticus*	Portée A	2019
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR duplex et monoplex	ADN	Recherche des gènes *trh* et *tdh*	Portée B flexible Méthodes publiées et internes – Modes opératoires Ajout d'une étape supplémentaire	2019
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de *V. vulnificus*	Portée A	2019
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	Identification moléculaire de *V. alginolyticus*	Portée A	2019
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	PCR	ADN	PCR 16 S / rpoB	Portée B	2020
CNRVC	Biologie Médicale	Bactériologie	Agglutination sur lame	Souche bactérienne	Sérotypage de *V. cholerae*	Portée A flexible Utilisation de sérum commercialisées	Extension, juin 2020