



RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Vibrions et choléra

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

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans ce rapport, faite dans l'autorisation écrite du CNR Vibrions et choléra, est illicite. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective, et d'autre part, les analyses et courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées, tout en faisant clairement référence au rapport utilisé. Toute référence aux données de ce rapport se mentionne de la façon suivante : Centre National de Référence Vibrions et choléra, Rapport annuel d'activité 2024, Année d'exercice 2023, p. xx-xx – Institut Pasteur, Paris, France. Les données issues des tableaux et figures présentées dans ces rapports ne doivent pas être publiées sans l'accord explicite du CNR.

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	8
2.1 Evolution des techniques	8
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	9
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	10
2.5 Activités d'expertises	12
2.6 Activités de séquençage	14
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	15
3. Activités de surveillance	16
3.1 Description du réseau de partenaires	16
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	19
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	23
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	26
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	26
4. Alertes	28
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	30
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	30
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	31
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	32
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	32
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	32

6.2	Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	33
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	35
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	36
1.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	37
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	37
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	39
1.3	Locaux et équipements	39
1.4	Collections de matériel biologique.....	42
1.5	Démarche qualité du laboratoire	43
2.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	44
2.1	Liste des techniques de référence.....	44
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	46

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Depuis 2022, après des années de déclin, le nombre de cas de choléra et le nombre de pays ayant déclaré des épidémies, sont à nouveau en hausse dans le monde. En décembre 2022, l'OMS a émis une alerte sur cette explosion sans précédent du choléra dans le monde, associée au taux de létalité le plus élevé enregistré depuis plus d'une décennie. Cette tendance s'est poursuivie en 2023. La résurgence du choléra en Haïti depuis octobre 2022 expose tout particulièrement les territoires français des Antilles. Le choléra est à déclaration obligatoire en France ; en 2023 deux cas ont été rapportés sur le territoire français. Il s'agissait de deux cas importés d'Afrique ou d'Asie identifiés en France métropolitaine.

En 2023, le nombre d'infections à vibrions non cholériques (VNC) a atteint le chiffre le plus élevé rapporté pour ces infections depuis la mise en place de la surveillance en 1995, avec un total de 130 cas, majoritairement associés aux espèces *Vibrio cholerae* et *V. parahaemolyticus*. Les cas d'infections à *V. cholerae* étaient majoritairement (73%) importés de pays où les normes en matière d'hygiène et d'assainissement font défaut. Un lien avec le milieu marin, via la consommation de produits de la mer ou un contact direct avec l'eau de mer, a été établi dans plus de 88% des cas. La majorité des cas d'infections (86%) s'est manifestée par des gastroentérites. Des infections sévères avec bactériémies ont été rapportées, essentiellement liées à l'espèce *V. cholerae*. Deux cas d'infections sévères à *V. vulnificus* ont également été rapportés dont une fatale.

EXECUTIVE SUMMARY

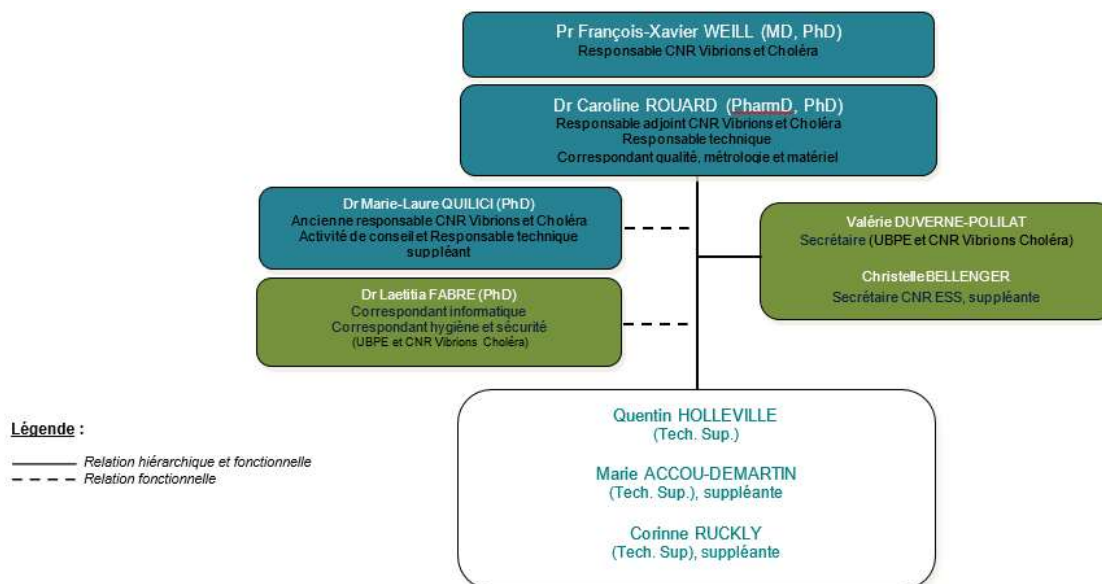
Highlights

Since 2022, after years of decline, the number of cholera cases has been on the rise again at a global scale, associated with a 50% increase over 2021 in the number of countries reporting outbreaks. In December 2022, the WHO warned of an unprecedented explosion of cholera worldwide, associated with the highest case-fatality rate recorded in over a decade. This trend continued in 2023. The resurgence of cholera in Haiti since October 2022 has exposed the French West Indies territories (TFA) to a particular risk of cholera. Cholera is a notifiable disease in France; two cases were reported on French territories in 2023, both imported with one from Africa and one from Asia.

In 2023, the number of non-cholera *Vibrio* infections reached the highest figure reported for these infections since surveillance began in 1995, with a total of 130 cases, mostly associated with *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* species. The majority of *V. cholerae* cases (73%) were imported from countries with poor hygiene and sanitation standards. A link with the marine environment, through consumption of seafood or direct contact with seawater, was established in over 88% of cases, with most infections (86%) manifesting as gastroenteritis. Severe infections with bacteremia were reported, mostly linked to the *V. cholerae* species. Two severe cases of *V. vulnificus* infection were also reported associated with one death.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme



Mission et Organisation

Missions : voir Annexe 1

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

Démarche Qualité

Le CNR Vibriens et Choléra (CNRVC) fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 15. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 30 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 de la Responsabilité Sociétale et Environnementale et des Ressources Techniques et son Service Qualité, qui apportent ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction Médicale ;
- et 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. Les services supports critiques sont

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

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation ainsi que les sites et la portée sont disponibles sur le site du COFRAC (<https://www.cofrac.fr/>).

L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité (CQE). Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle afin de maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

L'année qualité 2023 du CNRVC s'est organisée comme suit :

Étapes clés LREMS	Périodes de réalisation
Revue qualité	8 mars 2024
Revue de direction LREMS	4 juillet 2023
Audits internes qualité	4 décembre 2024
Audit de surveillance S5 COFRAC	14 au 17 novembre 2023
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	Pas d'extension ou ajout en 2023

Lors de l'évaluation COFRAC de novembre 2023, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la norme ISO 15189 version 2012.

Perspectives 2024 :

En 2024, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il est déployé tout au long de l'année 2024 au sein des CNR.

Étapes clés LREMS	Prévision de réalisation
Revue qualité LREMS	Janvier - avril 2024
Audits internes qualité et technique	Juin - décembre 2024
Revue de direction LREMS	à planifier
Audit de surveillance COFRAC	Juin 2025 (demande faite au COFRAC sur le maintien de cette date).

2. Activités d'expertise

Les activités d'expertise conduites au CNRVC concernent :

- La confirmation et le typage de souches de vibriens cholériques isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. En 2023, le CNRVC a analysé 5 prélèvements et 10 souches isolées pour une suspicion de choléra (échantillons ayant fait l'objet d'une déclaration obligatoire aux ARS) sur le territoire français (métropole et territoires d'Outre-Mer). Le CNRVC a également reçu 2 prélèvements d'eau pour recherche de vibriens cholériques. Le CNRVC peut aussi analyser, selon les demandes des pays et de l'OMS, des souches ou prélèvements de zones d'endémie ou d'épidémie cholériques, pour confirmation de diagnostic (31 échantillons en provenance de 3 pays étrangers en 2023). Des souches sont également étudiées dans le cadre de collaborations internationales impliquant l'Unité des Bactéries pathogènes entériques. Cette surveillance internationale est une composante essentielle de l'expertise du CNRVC et permet de connaître les souches de vibriens cholériques circulant dans le monde et susceptibles d'être importées en France.

- L'étude des souches de VNC isolées de cas diagnostiqués sur le territoire français. Le CNRVC a reçu 151 échantillons (120 souches isolées et 31 prélèvements de selles) pour confirmation d'identification, typage ou recherche de *Vibrio sp.* Au-delà de l'isolement et l'identification des souches, le CNRVC effectue la recherche par PCR des gènes codant pour les facteurs de pathogénicité majeurs des différentes espèces isolées et évalue la sensibilité des souches aux anti-infectieux, à des fins de suivi épidémiologique. Toutes les souches reçues sont également séquencées.

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

2.1 Evolution des techniques

- Depuis 2023, le CNRVC a mis en place de façon systématique l'analyse génomique après séquençage en temps réel (WGS, whole-genome sequencing) de la totalité des souches de *Vibrio* reçues, en parallèle des techniques de bactériologie classique et moléculaires, afin d'enrichir une base de données génomique des vibriens cholériques et des VNC. La présence des gènes cibles pour le diagnostic et la détection des facteurs majeurs de pathogénicité a été validée pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. vulnificus*. L'identification de certaines espèces moins fréquemment isolée est également confirmée par les résultats de WGS.

- Depuis 2023, le CNRVC réalise l'identification en systématique des différentes espèces de *Vibrio sp.* à l'aide de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight) Sirius Bruker Daltonics. La base de données de Bruker (comprenant peu de spectres pour les espèces de *Vibrio sp* pouvant être isolés en clinique) est utilisée pour l'identification ainsi qu'une base de données développée par le CNRVC comprenant les spectres de 137 *V. cholerae* O1, 271 *V. cholerae* non-O1/non-O139, 48 *V. parahaemolyticus*, 17 *V. alginolyticus*, 10 *V. fluvialis*, 18 *V. vulnificus*, 4 *Grimontia hollisae*, 4 *V. furnisii*.

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

- Le CNRVC a poursuivi le développement de méthodes de PCR en temps réel (qPCR) pour la détection et la caractérisation des souches de vibriens cholériques (cibles d'identification d'espèce *V. cholerae*, *rfbO1* et *ctxA* par

sondes TaqMan).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Evaluation de différents milieux de culture sélectifs et non sélectifs pour la culture des *Vibrio*

Objectif de l'étude : Le CNRVC est de plus en plus souvent sollicité par les laboratoires de biologie médicale pour la mise en culture des selles positives à *Vibrio* sp. en panel syndromique commerciaux car la majorité des laboratoires ne possède plus de milieux sélectifs (TCBS) permettant l'isolement des *Vibrio* sp. Le CNRVC a débuté l'évaluation de différents milieux de culture sélectifs et non sélectifs (notamment commerciaux) pour la recherche des *Vibrio* sp en culture à partir des selles.

Méthodes : repiquage de souches pures des différentes espèces de *Vibrio* sp et de selles positives en culture sur TCBS au CNRVC (TCBS fabriqué par la plateforme milieu de l'Institut Pasteur).

- Milieux sélectifs *Vibrio* sp testés (incubation à 37°C pendant 24h) :
 - TCBS (Oxoid, ThermoScientific)
 - CHROMID® Vibrio VIB (Biomérieux)
- Milieux non sélectifs (ou non sélectif de *Vibrio*) testés (incubation à 37°C pendant 24h) :
 - Gélose Muller Hinton (Bio-Rad)
 - Gélose au sang (Bio-Rad)
 - Gélose Hektoen (Thermofisher)
 - Gélose Yersinia (CIN) (milieu fabriqué par la plateforme milieu de l'Institut Pasteur)

Résultats :

- Résultats sur les souches

Espèces <i>Vibrio</i> sp.	Caractéristiques des colonies									
	Milieux sélectifs								Milieu non sélectif	
	TCBS Oxoid (n =)		CHROMID Vibrio Biomérieux (n =)		Hektoen (n =)		CIN (n =)		Gélose au sang (n =)	
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	Jaune	6	Bleue	12	Orange	12	Absence de culture	12	β hémolytique	6
<i>V. cholerae</i> O1	Jaune	2	Bleue	5	Orange	5	Absence de culture	5	β hémolytique	2
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vert	5	Rose ou Beige	11	Bleu/Vert	11	Rose	11	β ou non β hémolytique	5
<i>V. vulnificus</i>	Jaune ou Vert	2	Bleue	5	Bleu/Vert ou Orange	5	Absence de culture	5	β hémolytique	2
<i>V. alginolyticus</i>	Jaune	3	Beige	4	Orange	4	Rose ou absence de culture	4	non β hémolytique	3
<i>V. fluvialis</i>	Jaune	2	Violet rose ou bleu violet	5	Orange	5	Rose	5	β hémolytique	2
<i>V. cincinnatiensis</i>	Jaune	1	Rose	1	Orange	1	Rose	1	non β hémolytique	1
<i>V. navarrensis</i>	Jaune	1	Bleue	2	Orange	2	Rose	2	non β hémolytique	1

- Résultats sur les selles

Espèces <i>Vibrio</i> sp.	Nombre selles positives / nombre de selles testées				
	Milieux sélectifs				Milieu non sélectif
	TCBS Oxoid	CHROMID Vibrio	Hektoen	CIN	Gélose au sang
<i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	4/4	5/7	0/7	0/3	2/4 *
<i>V. cholerae</i> O1	1/1	3/3	0/3	0/3	1/1
<i>V. parahaemolyticus</i>	1/1	2/2	2/2	0/2	1/1

* Deux cultures envahies par *Proteus*

Au total, concernant la gélose TCBS (Oxoid), les résultats sont identiques aux géloses TCBS utilisées au CNRVC pour les souches et les selles. Pour la gélose CHROMID® Vibrio, les souches de *V. parahaemolyticus* décrites comme étant roses sur ce milieu peuvent également être beiges ce qui constitue un point d'alerte. D'autre part, les colonies d'autres espèces que *V. cholerae* peuvent être bleues. Enfin pour certaines selles avec un faible inoculum de *V. cholerae*, il n'a pas été possible de les isoler sur CHROMID® Vibrio. Concernant les géloses non sélectives de *Vibrio* sp (Hektoen et CIN), les souches de *Vibrio* sp. cultivent bien sur Hektoen mais il est difficile d'isoler une souche à partir de la flore complexe d'une selle sur ce milieu, excepté pour *V. parahaemolyticus*. Concernant le milieu CIN, les souches de *V. cholerae* ne poussent pas sur ce milieu il est donc peu utile. Enfin pour les milieux non sélectifs, l'isolement des souches de *V. cholerae* semble possible en ciblant les colonies β-hémolytiques. Attention toutefois lorsque la selles est riche en *Proteus* le milieu est rapidement envahi.

Evaluation d'une publication de qPCR multiplex pour la recherche de *V. cholerae* O1/O139 ctxA positif avec Eau de Paris

Objectif : Evaluation de la spécificité des amorces et sondes utilisées dans la publication d'une PCR quadruplex amplifiant en parallèle une cible pour l'espèce *V. cholerae* (*epsM*), une cible pour la recherche du séro groupe O1 (*rfbO1*), une cible pour la recherche du séro groupe O139 (*rfbO139*) et une cible pour le gène codant pour la toxine cholérique (*ctxA*).

Yan Y, Zhan L, Zhu G, Zhang J, Li P, Chen L, He P, Luo J, Chen Z. Direct and Rapid Identification of *Vibrio Cholerae* Serogroup and Toxigenicity by a Novel Multiplex Real-Time Assay. Pathogens. 2022 Jul 30;11(8):865. doi: 10.3390/pathogens11080865. PMID: 36014986; PMCID: PMC9416260.

Méthodes : La PCR quadruplex a été mise en place à Eau de Paris dans le but de tester les eaux usées de Mayotte dans le contexte de la crise de l'eau. Treize ADN extraits à partir de souches de *Vibrio* sp. (*V. cholerae* O1 toxigène, *V. cholerae* O139 toxigène, *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. fluvialis*, *V. navarrensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*) transmis par le CNRVC ont été transmis à Eau de Paris pour détermination de la sensibilité et de la spécificité des sondes et des amorces. Le CNRVC a apporté ses connaissances des Vibrios à Eau de Paris pour les tests à réaliser et l'analyse des résultats.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

- En 2023, le CNR a transféré les techniques de PCR pour la recherche de *V. cholerae* des sérogroupes O1 et O139 au CH de Mayotte.
- Le CNRVC a transféré en 2023 à 27 laboratoires correspondants un protocole de recherche bactériologique des espèces de *Vibrio* sp. à partir de prélèvements de selles sans utiliser les milieux d'enrichissement et d'isolement spécifiques aux *Vibrio*.

2.4 Collections de matériel biologique

Le CNRVC dispose d'une collection de 829 souches d'origine clinique isolées de cas d'infections à *Vibrio* sp diagnostiqués sur le territoire français (métropole et Outre-Mer) depuis 1975 et 2170 souches d'origine alimentaire, environnementale et animale. Ces dernières souches ont été étudiées au CNRVC dans le cadre de l'application de la Note de service DGAL/SDSSA/MCSI/N2004-8255 du 28 octobre 2004.

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

En 2023, le transfert de matériel biologique a concerné :

- Onze extraits d'ADN positifs à *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* transférés à la CIBU (Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence) de l'Institut Pasteur pour évaluation d'une PCR multiplex commerciale pour recherche de bactéries pathogènes entériques.
- Treize ADN extraits à partir de souches de *Vibrio* sp. (*V. cholerae* O1 toxigène, *V. cholerae* O139 toxigène, *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. fluvialis*, *V. navarrensis*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*) transférés à Eau de Paris pour la mise au point et l'évaluation d'une publication d'amorces et de sondes de PCR temps réel multiplex permettant la recherche de l'espèce *V. cholerae* (gène *epsM*), du gène codant pour la sous-unité A de la toxine cholérique (*ctxA*), du gène codant pour le sérotype O1 (*rfbO1*) et du gène codant pour le sérotype O139 (*rfbO139*). Cette PCR a été mise en place dans le cadre de l'analyse des eaux usées de Mayotte à la demande de l'ARS Mayotte et de la DGS.
- Deux ADN de *V. cholerae* O1 toxigène et *V. cholerae* O139 toxigène transférés au CH de Mayotte pour mise au point et contrôle positif d'une PCR d'identification des sérotypes O1 et O139.

2.5 Activités d'expertises

Parmi les échantillons reçus pour expertise au CNRVC en 2023, le nombre de souches ou de prélèvements cliniques français réceptionnés au CNRVC pour expertise est présenté dans le **Tableau 1**, le nombre de prélèvements d'origine environnementale français est présenté dans le **Tableau 2** et le nombre de prélèvements ou échantillons collectés à l'étranger pour appui au diagnostic est présenté dans le **Tableau 3**.

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

Origine géographique de l'expéditeur	Provenance (nombre de LBM/CH correspondants différents)	Prélèvements	Souches isolées	Total
Métropole	LBM (48)	17	97	114
	CHU/CH (25)	13	17	30
Outre-Mer	LBM (1)	0	2	2
	CHU/CH (3)	1	4	5
Total		31 \$	120 #	151

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

dont une souche qui n'appartenait pas au genre *Vibrio*, trois doublons, et trois souches non résolées en culture

\$ dont 11 prélèvements négatifs en culture pour la recherche de *Vibrio*

Tableau 2 : Nombre de prélèvements d'origine environnementale français réceptionnés pour analyse

Origine écologique	Prélèvements	Souches isolées de ces prélèvements
Eaux usées	2	6

Tableau 3 : Nombre de souches ou prélèvements collectés à l'étranger réceptionnés pour appui au diagnostic ou étude européenne (en lien avec ECDC et OMS Europe)

Origine écologique	Prélèvements	Souches	Total échantillons
Clinique	20	11	31

Pays expéditeurs : Congo, Algérie, Suède, Autriche

Le délai moyen de restitution de résultats du CNRVC aux laboratoires, incluant l'identification de l'espèce et la mise en évidence de gènes de pathogénicité, était en moyenne de 3 jours ouvrés à partir de la date de réception d'une souche, conforme à l'objectif des 6 jours annoncés par le CNRVC sur son site internet. Un seul résultat a été rendu hors délais (7 jours). L'analyse des prélèvements ne faisant pas partie des missions du CNRVC, il n'y a pas d'engagement sur les délais de rendu de résultats. Le délai moyen de rendu était de 4 jours ouvrés.

Les types de caractérisation réalisées sur les souches isolées et les prélèvements de cas cliniques français sont présentés dans le **Tableau 4** et le **Tableau 5** respectivement. Les méthodes appliquées à l'étude des souches et prélèvements sont détaillées en *Annexe 2* de ce document.

Tableau 4. Types de caractérisation et nombre de souches cliniques testées sur les cas français étudiés au CNRVC en 2023

Espèce (nombre de souches)	Culture	Identification MALDI-TOF	Identification moléculaire PCR	Séro-agglutination	PCR <i>ctxA</i>	WGS	Caractérisation WGS : identification d'espèce, recherche de facteurs de pathogénicité, typage, résistome	ATB Diffusion & Sensititre
<i>V. parahaemolyticus</i> (49)	49	49	49	-	-	49	Identification : <i>r72H</i> ; Pathogénicité : <i>tdh</i> , <i>trh</i> , T3SS1, T3SS2 Typage : <i>orf8</i> ; <i>toxRS</i> , MLST ; résistome	49
<i>V. cholerae</i> (63)	63	63	63	63	63	63	Identification : ISR; Pathogénicité: <i>st/sm</i> , <i>ctxA</i> , <i>ctxB</i> , <i>rstR</i> , <i>tcpA</i> , <i>hlyA</i> Typage : <i>rfbO1</i> , <i>rfbO139</i> , <i>wbeT</i> : recherche mutation Inaba, MLST, sérogroupage ; résistome	63
<i>V. alginolyticus</i> (9)	9	9	9	-	-	9	Identification : collagénase; Résistome	9
<i>V. fluvialis</i> (7)	7	7	-	-	-	7	Identification : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i> , sur le rMLST et sur l'analyse Kraken ; résistome	7
<i>V. vulnificus</i> (2)	2	2	2	-	-	2	Identification : <i>hly</i> ; résistome	2
<i>V. cincinnatiensis</i> (1)	1	1	-	-	-	1	Identification : l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i> , sur le rMLST et sur l'analyse Kraken ; résistome	1
Autres genres bactériens (2)	2	2	-	-	-	-	-	-

➤ Les différentes techniques de caractérisation sont détaillées dans l'Annexe 2 :

- Culture sur milieu non sélectif (GNA, Gélose Nutritive Alcaline) et sélectif (TCBS, Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)
- Identification MALDI-TOF : identification par spectrométrie de masse sur appareil Sirius Bruker Daltonics, utilisation de la base de données Bruker et base de données CNRVC
- Identification moléculaire PCR : PCR recherchant des gènes spécifiques d'espèces (ISR pour *V. cholerae*, *r72H* pour *V. parahaemolyticus*, collagénase pour *V. alginolyticus*, *hly* pour *V. vulnificus*)
- Séro-agglutination : détermination du sérotype (O1 ou O139) pour toutes les souches de *V. cholerae* isolées, du sérotype (Inaba, Ogawa) pour les *V. cholerae* O1
- PCR *ctxA* : recherche par PCR du gène *ctxA* codant pour la toxine cholérique pour les souches des espèces *V. cholerae*

Tableau 5. Niveau de caractérisation réalisé sur les prélèvements cliniques reçus au CNRVC en 2023

Prélèvement (nombre)	Culture directe sur milieu sélectif et non sélectif	Enrichissement en eau peptonée alcaline puis culture	PCR recherche moléculaire <i>V. cholerae</i>	PCR recherche moléculaire <i>V. parahaemolyticus</i>	PCR recherche moléculaire <i>V. vulnificus</i>	PCR recherche moléculaire <i>V. alginolyticus</i>	Souche isolée (PCR*) (caractérisation cf Tableau 4)
Selles / Fecal Swab (31)	31	31	26	13	4	4	20 (2)

* PCR positive pour *V. parahaemolyticus* sans souche isolée pour deux prélèvements

2.6 Activités de séquençage

Le CNRVC a réalisé du séquençage WGS au cours de l'année 2023. Un séquençage WGS a été effectué sur la totalité des 139 souches de *Vibrio* spp. cliniques et environnementales françaises expertisées par le CNRVC: 113 souches cliniques reçues au CNRVC et confirmées comme appartenant au genre *Vibrio*, 20 souches isolées au CNRVC à partir des prélèvements cliniques reçus, et six souches isolées d'eaux usées.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?

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

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

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

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

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

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

- Analyse bio-informatique effectuée en complément d'analyses phénotypiques (caractères biochimiques et culturels, séro-agglutination, résistance aux antimicrobiens) et moléculaires (PCR spécifique d'espèce, gènes de toxine cholérique) pour les souches toxigènes de *Vibrio cholerae* O1 (souches responsables du choléra)
 - o MLST (ST69 et plus rarement ST515 pour *V. cholerae* O1 El Tor)
 - o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination O1 ou O139)
 - o Prédiction du sérotype (confirmation de l'agglutination Inaba ou Ogawa avec recherche de mutation du gène *wbeT*)
 - o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques) : recherche de gènes de résistance acquis et mutations conférant une résistance aux quinolones et aux nitrofuranes ainsi que pour la réversion de la résistance aux polymyxines.
 - o Confirmation des facteurs de virulence et typage : recherche gène *ctxA*, typage *ctxB* par analyse de séquence
- Analyse phylogénétique : confirmation de l'appartenance à la lignée 7PET, confirmation ou détermination de la provenance géographique de la souche comme mentionné au point précédent. Importance des collaborations internationales du CNRVC afin de disposer de souches provenant de différents pays pour pouvoir construire un arbre phylogénétique robuste.
- Analyse bio-informatique effectuée en complément pour les vibrions non cholériques (VNC) comprenant notamment pour les souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* :
 - o MLST (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*)
 - o Prédiction du sérotype (*V. cholerae*, base de données des séquences des différents sérotypes)
 - o Prédiction du sérotype (*V. parahaemolyticus* : détermination de l'appartenance au groupe O3:K6)
 - o Résistome (comparaison avec les résultats phénotypiques)
 - o Recherche de gènes de virulence accessoires ou séquence de gènes : *hlyA*, *ctxA*, *stxsm* pour *V. cholerae* ; systèmes T3SS1 et T3SS2, gènes codant les hémolysines *tdh* et *trh* pour *V. parahaemolyticus*.

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

Aucune épidémie n'a été investiguée

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

139 souches de *Vibrio* spp. séquencées

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

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

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

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Il est prévu que tous les fichiers FASTQ produits en 2023 par le CNRVC soient déposés sans métadonnées sur ENA au cours de l'année 2024.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

La gestion des séquences Illumina produites (FASTQ) par le CNRVC est en train d'être modifiée pour qu'elles soient déposées systématiquement dans les bases de données. Les séquences de 2023 seront ainsi mises à disposition dans l'European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>), sans information épidémiologique cependant, courant 2024 avec partage immédiat. Les séquences (FASTQ) des souches des années précédentes vont être déposées au fur et à mesure. Les données sur les souches seront disponibles dans les publications scientifiques décrivant ces génomes. Les fichiers FASTA annotés (pour les plasmides ou les génomes circularisés) seront déposés dans GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) avec partage immédiat lors d'une publication.

3. Activités de surveillance

- **Deux cas de choléra** ont été déclarés sur le territoire français en 2023. Les deux cas étaient associés à des souches du séro groupe O1 de la lignée 7PET et étaient importés pour l'un d'Afrique et pour l'autre d'Asie.

- **132 cas cliniques d'infections à VNC** (dont trois co-infections) ont été confirmés via l'analyse de **133 souches isolées et de deux diagnostics par PCR**. Il s'agissait majoritairement de gastroentérites (86% des cas). Parmi les cas renseignés et quelle que soit la manifestation clinique, un lien avec le milieu marin a été établi dans 88% des cas avec soit consommation de produits de la mer soit contact direct avec l'eau de mer. Les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* étaient prépondérantes. La tendance à l'augmentation des cas d'infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139 observée en 2022 s'est confirmée en 2023, la majorité d'entre eux (73%) étant importés. Sept cas d'infections à *V. fluvialis* (100% cas importés) ont été diagnostiqués, confirmant comme en 2022 l'émergence de cette espèce comme agent étiologique de gastroentérites. Deux souches de *V. cholerae* O1 non toxigène et une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 toxigène associées à des cas de gastro-entérites ont été isolées en 2023.

3.1 Description du réseau de partenaires

o Description des partenaires, répartition par type d'activités

Le recensement des cas se fait sur la base des déclarations volontaires de la part des biologistes ou bien dans le cadre d'une Déclaration Obligatoire (DO) pour le choléra. Les souches sont envoyées au CNRVC par les laboratoires hospitaliers en lien avec les cas graves, hospitalisés, d'infections à vibrions, mais également par des laboratoires de biologie médicale de ville (LBM), de plus en plus regroupés en plateformes de biologie médicale. La répartition des échantillons envoyés par ces 2 types de laboratoire est présentée dans le **Tableau 6**.

De plus en plus fréquemment, les laboratoires privés et hospitaliers utilisent en première intention des PCR syndromiques dans le diagnostic des gastro-entérites, permettant la détection de *Vibrio sp.* Malheureusement la plupart des laboratoires ne disposent pas de milieux sélectifs permettant l'isolement des souches de *Vibrio sp.* Ainsi, le CNRVC reçoit de plus en plus souvent des prélèvements de selles.

Tableau 6 : Échantillons d'origine clinique reçus de France par type de laboratoires expéditeurs en 2023

Type de laboratoire	Nombre d'échantillons reçus	Nombre de correspondants
CH/CHU	35	28
LBM	116	49
Total	151	77

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

o Définition de l'échantillon de souches isolées

Les souches ont été isolées de sujets infectés par un vibron, dont la pathologie s'est déclarée sur le territoire français, et pour lesquels l'identification du germe responsable a été effectuée ou confirmée par le CNRVC. Les cas pour lesquels l'exposition a été documentée sur le territoire français sont considérés comme des cas autochtones, ceux pour lesquels l'exposition a été documentée à l'étranger comme des cas importés.

- **Répartition géographique, estimation de la couverture du réseau, évolution du réseau**

Le CNRVC collabore avec des laboratoires répartis sur l'ensemble du territoire, avec un nombre de correspondants nettement plus élevé dans les régions côtières, en particulier sur la façade Atlantique. Cette tendance avait été observée dès 1995. Le nombre de correspondants a évolué de façon notable suite à la sensibilisation faite par le CNRVC, qui avait activement sollicité les biologistes en 2011 en réalisant une campagne d'information et sensibilisation par le biais d'un contrôle qualité réalisé sur l'ensemble de la France auprès de 3281 laboratoires participants, et avait à cette occasion incité les laboratoires à envoyer leurs souches sur la base du volontariat et suite à l'évolution récente des méthodes de diagnostic. Les PCR multiplex syndromiques et la spectrométrie de masse permettent de s'orienter plus facilement sur un diagnostic *Vibrio* que les méthodes de bactériologie traditionnelles et d'améliorer ainsi l'exhaustivité du recueil de ces infections, en particulier par une meilleure détection des cas peu symptomatiques, non hospitalisés. Ces techniques présentent en effet l'avantage d'attirer l'attention des biologistes sur ces agents pathogènes, et le CNRVC est régulièrement contacté par des professionnels de santé, suite à un signal *Vibrio* positif en PCR, ce qui représente une occasion supplémentaire de les sensibiliser à ces infections, également de leur demander une participation active à la surveillance.

Le nombre d'échantillons, souches isolées et prélèvements envoyés au CNRVC a augmenté de façon significative entre 2017 et 2021 et le CNRVC avait eu des échanges avec 154 correspondants plus spécifiquement des laboratoires situés dans des régions côtières, départements du Pas-de-Calais, Morbihan, Hérault, Landes. En 2023, 77 correspondants ont été recensés dont 38 nouveaux par rapport à la période 2019-2022. A noter que les souches isolées dans le département de la Gironde, qui représente le plus grand nombre de cas enregistrés au CNRVC, sont envoyées quasi exclusivement par un plateau technique d'un grand groupe de LBM.

La répartition géographique des échantillons reçus au CNRVC en 2023 et la comparaison avec les années précédentes sont présentées dans les **Figures 1** et **2**. La **Figure 1** détaille le nombre de cas reçu en fonction du laboratoire correspondant et du laboratoire préleveur. En effet, du fait de l'existence de plateaux techniques (nommés laboratoires correspondants dans la **Figure 1A** car nous envoyant la souche ou le prélèvement) réalisant les analyses bactériologiques pour de nombreux LBM (nommés laboratoires préleveurs dans la **Figure 1B** car réalisant le prélèvement initial) dans une zone géographique plus ou moins large, la prise en compte seulement du laboratoire correspondant peut biaiser la répartition géographique des cas. Nous observons cela notamment pour le plateau technique de Gironde qui traite les prélèvements de nombreux cas d'infections par VNC, cas initialement prélevés dans des LBM localisés de Biarritz à La Rochelle. Le code postal du laboratoire préleveur est donc à privilégier pour considérer la répartition des cas mais cette information n'est pas toujours disponible lorsqu'un plateau technique transmet un échantillon.

A. Nombre d'échantillons (laboratoire correspondant)

B. Nombre d'échantillons (laboratoire préleveur)

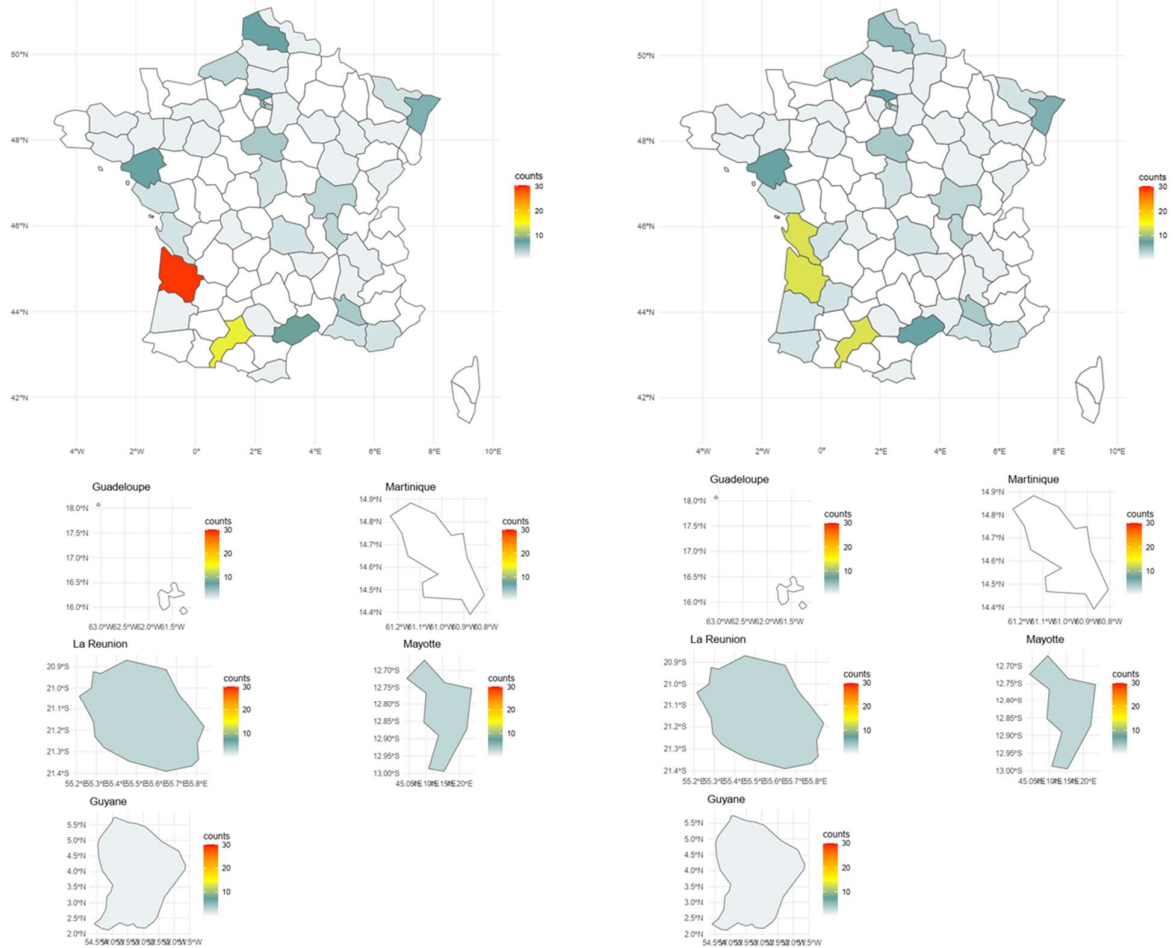


Figure 1. Nombre et origine géographique des échantillons d'origine humaine envoyés par les laboratoires correspondants (A) et le laboratoires préleveurs (B) et reçus CNRVC en 2023

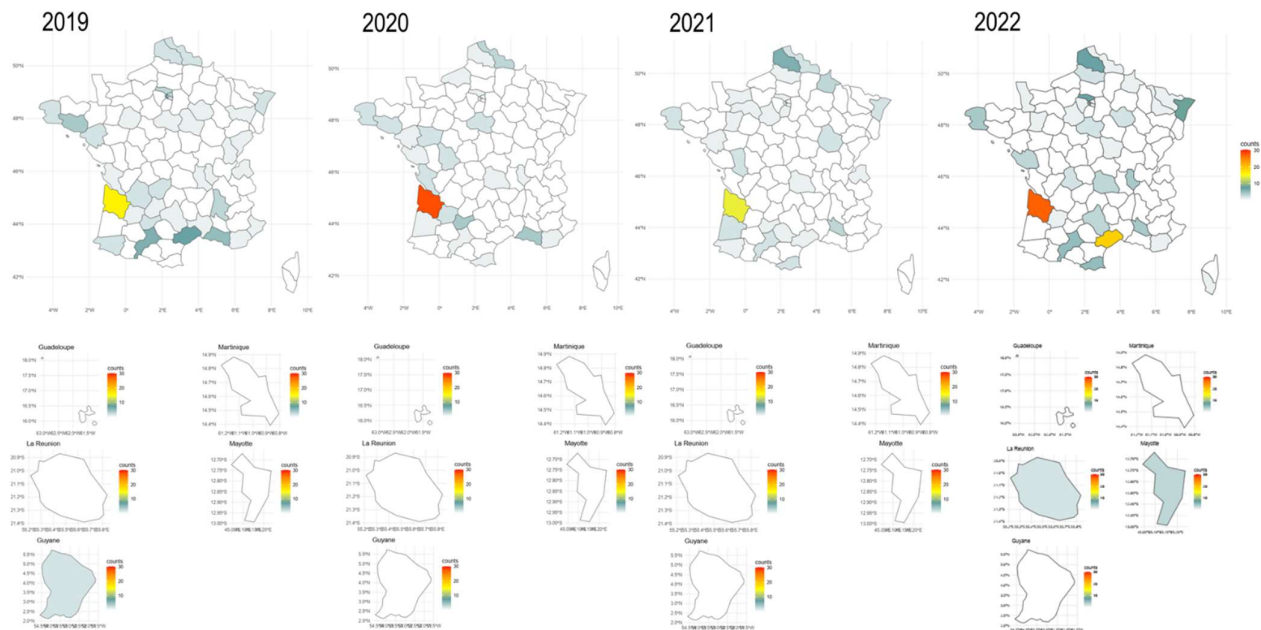


Figure 2. Nombre et origine géographique des échantillons d'origine humaine envoyés par les laboratoires correspondants et reçus au CNRVC de 2019 à 2022

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

○ Vibriion cholérique

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

Evolution du nombre de cas d'infections : aucun cas de choléra n'avait été rapporté en 2020 et 2021, sept cas ont été rapportés en 2022 et deux cas en 2023. L'évolution du nombre de cas est présentée sur la **Figure 3**.

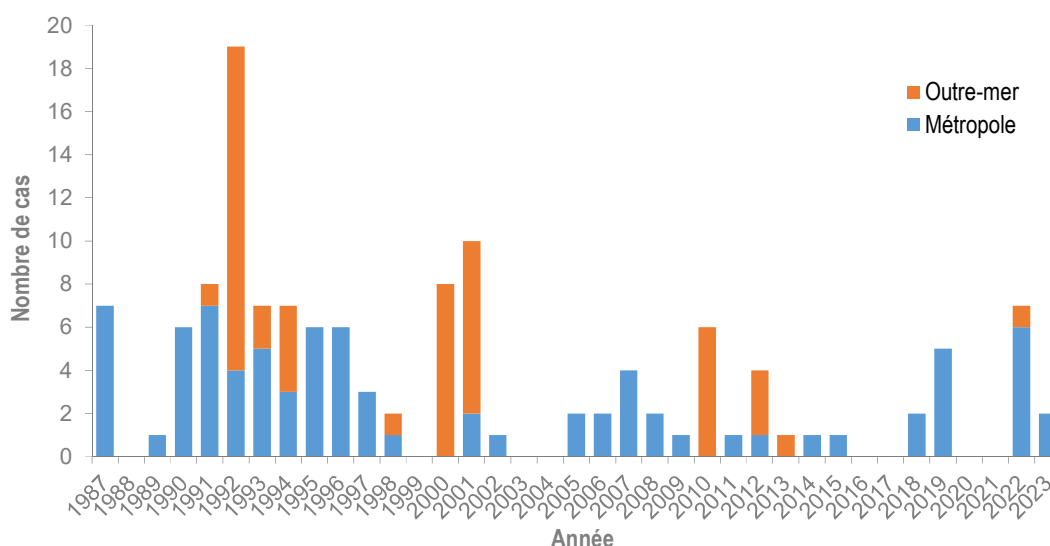


Figure 3. Nombre de cas de choléra déclarés sur le territoire français entre 1987 et 2023

Origines géographiques des lieux de contamination : parmi les deux cas de choléra diagnostiqués sur le territoire français en 2023, un cas était de retour d'Asie du Sud et l'autre d'Afrique de l'Est.

Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections : un cas présentait une gastroentérite banale traitée par son médecin généraliste, l'autre cas présentait un syndrome digestif de type cholériforme et a été hospitalisé en réanimation. Ce dernier cas présentait un terrain prédisposant. Les deux cas étaient âgés de 50 à 60 ans et il n'a pas été rapporté de cas de transmission secondaire dans leurs entourages. Les vibrions cholériques étaient des souches de *V. cholerae* séro groupe O1, sérotype Ogawa pour les deux souches isolées, porteuses des gènes de la toxine cholérique et appartenant à la lignée 7PET.

- **Vibrions non cholériques**

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

Evolution du nombre de cas d'infections : 132 cas d'infections à vibrions non cholériques ont été confirmés ou diagnostiqués au CNRVC en 2023, confirmant l'augmentation du nombre de cas observée depuis 2017 (**Figure 4**). Tous les cas se sont manifestés sous la forme de cas isolés.

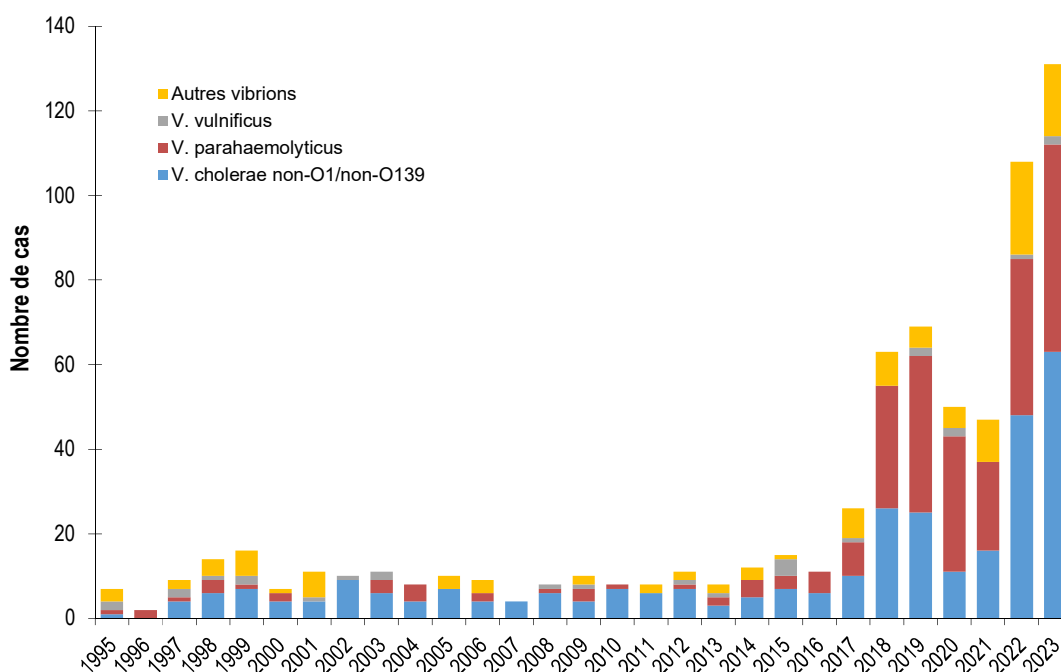


Figure 4. Evolution du nombre d'infections à vibrions non cholériques de 1995 à 2023

Origines géographiques des lieux de contamination : 50 % des cas d'infections ont été contractés sur le territoire français (47% en France métropolitaine, 3% en Outre-Mer), 50% à l'étranger. Parmi les cas d'infections contractés à l'étranger, 73% étaient dus à l'espèce *V. cholerae*, représentant 74% de l'ensemble des cas d'infections dus à cette espèce.

Aspects cliniques, épidémiologiques et microbiologiques des infections

- L'âge moyen des cas était de 50 ans (de 1 mois à 93 ans) et 54% des cas étaient des hommes et 46% des femmes.
- Parmi les terrains prédisposants ont été considérés : âges extrêmes, antécédents de pathologies digestives, immunosuppression, cancer/hémopathie, hépatopathie, traitement anti-acide, diabète, plaies préexistantes.

Présentations cliniques :

- L'espèce *V. cholerae* (n=63 souches au total) a été associée aux manifestations les plus sévères, avec des bactériémies secondaires à une gastroentérite (quatre cas) ou bactériémies primaires (deux cas). La voie de contamination a été associée à la consommation de produits de la mer pour deux patients et à la consommation de crudités pour un patient. Quatre patients ayant présenté une telle évolution avaient un terrain favorisant.
- *V. vulnificus* (deux cas) a également été à l'origine de deux bactériémies faisant suite à une surinfection de plaie après contact avec le milieu marin dans un cas et une exposition au milieu marin dans l'autre cas aux USA. La seconde infection ayant été fatale. Les deux patients présentaient des terrains favorisants.
- L'espèce *V. alginolyticus* a été associée à des infections cutanées après exposition au milieu marin (trois cas) ayant nécessité des interventions chirurgicales dans deux cas. Cette espèce a également été associée à des otites (4 cas) et des gastro-entérites (2 cas).
- Les espèces *V. fluvialis* et *V. parahaemolyticus* ont été associées exclusivement à des gastroentérites.
- *V. cincinnatiensis* (un cas de bactériémie), espèce peu courante d'origine marine, a déjà été associée à des pathologies chez l'homme.

Facteurs bactériens de pathogénicité :

- *V. cholerae*
 - Deux souches de *V. cholerae* O1 non toxigènes importées ont été isolées en France en 2023, alors que de telles souches ont rarement été isolées ces dernières années.
 - Une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 (sérogroupe O35) isolée chez un patient au retour du Pakistan, possédait les gènes codant pour la toxine cholérique et le gène du récepteur du phage CTX (*tcpA*). De telles souches sont très rarement isolées en France.
 - Seize souches possédant le gène *ctxA*, codant la cholix-toxine (considéré comme des facteurs de pathogénicité de l'espèce) ont été isolées. Il n'a pas été observé cependant de corrélation entre la présence de ce gène de toxine et le type (intestinal ou extra-intestinal) ou la gravité des infections.
 - Toutes les souches possédaient le gène de l'hémolysine *hlyA*, initialement associé au pouvoir invasif de l'espèce, mais retrouvé chez la quasi-totalité des souches d'origine clinique et environnementale.
- *V. parahaemolyticus*
 - La majorité (84%) des souches de *V. parahaemolyticus* possédaient les gènes des hémolysines TDH et/ou TRH, classiquement associées au pouvoir pathogène de l'espèce.
 - Cinq souches importées appartenaient aux clones pandémiques (clone O3 :K6) de l'espèce avec la présence de l'hémolysine TDH, du système de sécrétion de type 3 (T3SS2) et appartenaient au ST3.
 - Trois autres souches n'appartenant pas aux clones pandémiques possédaient les gènes codant pour le T3SS2.
 - Les gènes codant pour le T3SS1 étaient quant à eux présents chez la totalité des souches.

La saisonnalité des infections a été confirmée pour les cas autochtones, contractés durant les mois les plus chauds de l'année : juin à octobre, avec un pic très marqué en juillet et août (**Figure 5**).

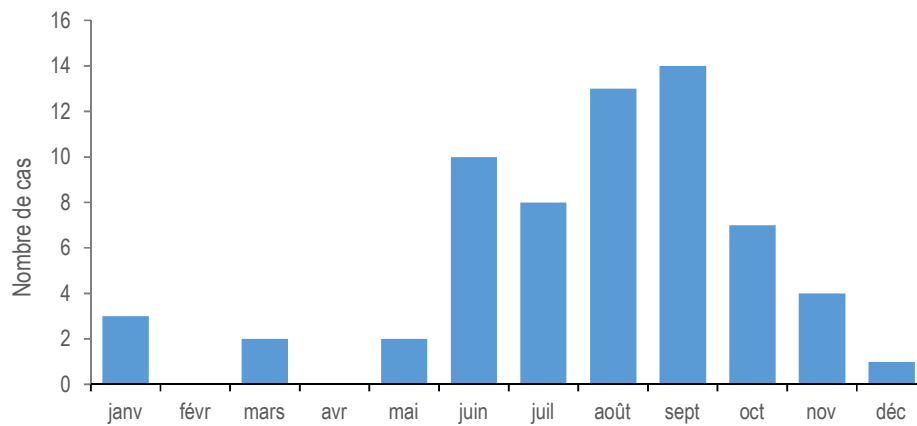


Figure 5. Saisonnalité des cas d'infections à vibrions non cholériques acquis sur le territoire français métropolitain en 2024

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

○ *Vibrio cholerae* O1 toxigène

Les deux souches isolées en France en 2023 appartiennent à la lignée 7PET. Ces deux souches présentent un profil de résistance aux antibiotiques différents (**Tableau 7**), un antibiogramme est donc absolument nécessaire pour déterminer la sensibilité des souches. La souche d'origine africaine présentait une multi-résistance similaire à des souches isolées au Yémen en 2019 et au Liban en 2022. L'autre souche présentait uniquement une résistance aux fluoroquinolones et au triméthoprim-sulfaméthoxazole.

Tableau 7. Résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *V. cholerae* O1 de la 7ème pandémie isolées en France en 2023

Antibiotique	Nombre (pourcentage) de souches résistantes	
	<i>V. cholerae</i> O1 7PET	
	<i>n</i> = 2	Résistome (<i>n</i>)
Ampicilline**	1 (50)	<i>bla</i> _{PER7} (1)
Céfotaxime*	1 (50)	<i>bla</i> _{PER7} (1)
Pefloxacin*	2 (100)	<i>gyrA</i> (S83I) et <i>parC</i> (S85L) (2)
Ciprofloxacine* (CMI)	2 (100)	<i>gyrA</i> (S83I) et <i>parC</i> (S85L) (2)
Erythromycine*	1 (50)	<i>mph(A)</i> et <i>mph(E)</i> et <i>msr(E)</i> (1)
Azithromycine*	1 (50)	<i>mph(A)</i> et <i>mph(E)</i> et <i>msr(E)</i> (1)
Triméthoprim**	2 (100)	<i>dfrA1</i> (2)
Triméthoprim-sulfaméthoxazole *	2 (100)	<i>sul2</i> et <i>dfrA1</i> (1), <i>sul2</i> et <i>sul1</i> et <i>dfrA1</i> (1)
Tétracycline*	0	-
Nitrofuranes*	2 (100)	VC0175 (R169C) et VCA0637 (Q5stop) (2)

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

* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023

** interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023 pour les entérobactéries

○ Vibrions non cholériques

Les souches de VNC restaient globalement très sensibles aux antibiotiques. Les résistances observées phénotypiquement étaient toutes corrélées avec le résistome (issu de l'analyse génomique des gènes de résistance) pour les souches de *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*. La résistance aux antibiotiques des principales espèces de VNC isolées en 2023 est présentée dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Résistance aux antibiotiques des principales espèces de souches cliniques de Vibrions non cholériques isolées en France en 2023

Antibiotique	Nombre de souches résistantes				
	<i>V. cholerae non-O1/non-O139</i> ^a n = 63	<i>V. parahaemolyticus</i> n = 49	<i>V. alginolyticus</i> n = 9	<i>V. fluvialis</i> n = 7	<i>V. vulnificus</i> n = 2
Ampicilline ^{**} ([£])	7	37 (12)	9	3 (2)	0
Pipéracilline-tazobactam*	2	0	0	7	0
Céfotaxime*	0	0	0	1 \$	0
Pefloxacin*	12	0	0	0	0
Ciprofloxacine* (CMI)	12	0	0	0	0
Erythromycine*	1	0	0	0	0
Azithromycine*	0	0	0	0	0
Triméthoprime-sulfaméthoxazole*	4	0	0	1	0
Tétracycline*	3	0	0	0	0

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

* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023

** interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023 pour les entérobactéries

\$ CMI supérieure strictement à 0,25 mg/L (les concentrations critiques du CASFM-EUCAST ne s'applique pas pour *V. fluvialis*)

([£]) nombre de souches présentant un diamètre proche du diamètre critique

^a dont les deux souches de *V. cholerae* O1 non toxigènes

V. parahaemolyticus

Toutes les souches présentaient une résistance modérée à l'ampicilline en lien avec la présence d'un gène de bêta-lactamase de type *bla*_{CARB}. Elles restaient sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole (triméthoprime-sulfaméthoxazole) ainsi qu'aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G). Ce phénotype de résistance reste identique à celui des années précédentes.

***V. cholerae* (60 souches sérogroupes non-O1/non-O139, deux souches de *V. cholerae* O1 non toxigène, et une souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 toxigène)**

Sur les treize souches originaires de France métropolitaine, uniquement deux souches présentaient une résistance isolée soit à l'ampicilline soit aux fluoroquinolones. Les 50 souches provenant de l'étranger ou de l'outre-mer présentaient quant à elles plus de résistances. Parmi celles-ci, onze souches étaient résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 0,5 et 4 mg/L) via des mutations dans *gyrA* et *parC*. Les souches ayant les CMI les plus élevées étaient celles possédant également un gène *qnrVc*. En l'absence de *qnrVc*, la CMI de la souche était juste supérieure à la concentration critique de 0,25 mg/L. A noter que 12 souches au total portaient seulement un gène *qnrVc*. Chez ces souches, le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de pefloxacin était proche du diamètre critique mais il n'y avait pas de résistance à la ciprofloxacine. Quatre souches étaient résistantes au cotrimoxazole en lien avec une combinaison de gènes *dfra* et *sul* pour trois d'entre elles. L'augmentation du diamètre critique du cotrimoxazole de 18 à 21 mm dans le CASFM-EUCAST 2023 fait dorénavant passer une

souche ayant uniquement un gène *dfrA* dans les souches résistantes. A noter que six autres souches possédaient un gène *dfrA* avec un diamètre égal au diamètre critique de 21 mm. Une seule souche était résistante à l'érythromycine en lien avec un gène *mph(A)*. La présence de ce gène unique entraînait une CMI à l'azithromycine à 4 mg/L (sensible). Au total, 4 souches sont multi-résistantes (résistance à plus de trois familles d'antibiotique). Il n'a pas été observé d'évolution de la résistance aux antibiotiques d'intérêt ces dernières années malgré l'augmentation importante de souche de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en 2023 (cf. **Tableau 9**).

Tableau 9. Evolution de la résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *V. cholerae* non-O1/non-O139 isolées en France entre 2018 et 2023

Antibiotique	Nombre (pourcentage) de souches résistantes de <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139					
	2018 <i>n</i> = 26	2019 <i>n</i> = 24	2020 <i>n</i> = 11	2021 <i>n</i> = 16	2022 <i>n</i> = 48	2023 <i>n</i> = 63
Ampicilline**	0	2 (8)	0	2 (13)	5 (10)	7 (11)
Céfotaxime*	0	0	0	0	0	0
Acide nalidixique***	8 (31)	5 (21)	1 (9)	4 (25)	10 (21)	12 (19)
Ciprofloxacine*	3 (12)	2 (8)	0	4 (25)	9 (19)	12 (19)
Erythromycine*	0	0	0	0	0	1 (2)
Azithromycine*	0	0	0	0	0	0
Triméthoprimé-sulfaméthoxazole*	4 (15)	4 (17)	1 (9)	4 (25)	6 (13)	4 (6)
Tétracycline*	4 (15)	3 (13)	1 (9)	3 (19)	3 (6)	3 (5)

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

* interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023

** : Interprétation basée sur les critères du CASFM-EUCAST 2023 pour les entérobactéries

*** le dépistage de la résistance aux fluoroquinolones était effectué avant 2023 l'aide d'un disque d'acide nalidixique

V. fluvialis

Toutes les souches isolées de *V. fluvialis* étaient résistantes à la pipéracilline-tazobactam. Pour les C3G, nous observons des CMI comprises entre <0.006 et 0,5 mg/L (à noter qu'aucun diamètre/CMI critique n'est défini pour les C3G dans le CASFM EUCAST 2023 pour *V. fluvialis*). Une seule souche est résistante au cotrimoxazole (gène *dfrA*). Toutes les souches restent sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine. Ce phénotype de résistance reste identique aux années précédentes.

V. alginolyticus

Toutes les souches isolées de *V. alginolyticus* étaient résistantes à l'ampicilline en lien avec un gène de bêta-lactamase de type *bla*_{CARB}. Toutes les souches restaient sensibles aux antibiotiques utilisés dans le traitement des gastro-entérites : fluoroquinolones, tétracyclines, azithromycine et cotrimoxazole ainsi qu'aux C3G. Ce phénotype de résistance reste identique à celui des années précédentes.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

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

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

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

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

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

L'ANSES s'est fait le relais auprès du CNRVC et de SpF, en septembre 2023, d'une question de l'EFSA sur l'émergence de *V. fluvialis* et le lien avec la consommation de produits de la mer, pour une évaluation du risque pour la sécurité sanitaire des produits de la mer.

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

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Etude des types de PCR syndromiques utilisées pour le diagnostic des gastro-entérites en France en 2023

Objectif de l'enquête : Déterminer les types de panel syndromique utilisés pour le diagnostic des gastro-entérites en France par les laboratoires ainsi que le Ct des PCR positives pour lesquelles une souche de *Vibrio* sp. est isolée.

Partenaires : Le type de PCR syndromique utilisée est demandée sur la feuille de renseignement lors de l'envoi d'un échantillon au CNRVC par les laboratoires correspondants. Le Ct a été ajouté en cours d'année 2023 sur la feuille de renseignement.

Principaux résultats :

Caractéristiques des différents panels retrouvés dans les qPCR syndromiques commerciales utilisées par les laboratoires.

Seegene Allplex™ GI-Bacteria(I) assay (Eurobio)	BioFire FilmArray gastrointestinal (GI) panel	Diag CORE Gastrointestinal Panel (Qiasat DX Qiagen)	BD MAX Extended Enteric Bacterial Panel (xEBP)
Recherche <i>Vibrio</i> sp. (<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>)	Recherche <i>Vibrio</i> sp. et <i>V. cholerae</i>	Recherche <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>	Recherche <i>Vibrio</i> sp. (<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i>)
Cible inconnue pan Vibrio	Cible <i>gyrB</i> pour <i>Vibrio</i> sp. et <i>toxR</i> pour <i>V. cholerae</i>	Cibles spécifiques de chaque espèce inconnues	Cible inconnue pan Vibrio

Nom panel qPCR syndromique	Nombre échantillons	Nombre échantillons avec Ct connu	Résultats Ct si culture <i>Vibrio</i> positive			Résultats Ct si culture <i>Vibrio</i> négative		
			Moyenne Ct	Min Ct	Max Ct	Moyenne Ct	Min Ct	Max Ct
Seegene Allplex™ GI	60	20	30,1	21	38,3	37,4	33,2	42,4
BD MAX (xEBP)	20	4	22,7	18	29,5	35,8	35,8	35,8
FilmArray (GI)	13	6	21,8	13	25	NA	NA	NA
Nimbus	1	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Qiasat (GI Panel)	4	3	19,6	16	23	NA	NA	NA
Non précisé	53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Total	151	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA : Non applicable, absence de données

Conclusion : Un grand nombre de LBM utilise le panel Seegen Allplex™. La moyenne des Ct pour les cultures positives à *Vibrio* sp. semble plus faible pour les panels FilmArray, BDMax et Qiasat (19,6 à 22,7) par rapport au panel Seegene Allplex™ (30,1). Au-delà d'un Ct de 37 pour Seegene Allplex™, il était difficile de retrouver la souche en culture (faux positif ?). Il est légitime de se demander si l'observation du Ct est valable d'une selle à l'autre au regard des nombreux inhibiteurs de PCR dans les selles.

Etat d'avancement : Cette étude doit être poursuivie à l'aide de la fiche de renseignement du CNRVC. Une étude complémentaire des modalités de prise en charge des selles dans les laboratoires est prévue en 2024 : PCR syndromique en première intention ou PCR syndromique effectuée uniquement dans des cas spécifiques. En effet, nous avons déjà constaté qu'un grand nombre de laboratoires (plateaux techniques) utilisent en première intention les panels syndromiques pour le diagnostic des gastro-entérites. Cela conduit à une plus grande détection des vibrions mais les LBM n'ont pas les milieux sélectifs pour isoler les souches. Les seules recommandations présentes dans le REMIC restent assez floues concernant la culture pour les vibrions.

4. Alertes

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

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

- Les médecins et les biologistes qui suspectent un diagnostic de choléra (cas probable d'après la clinique et le contexte épidémiologique) doivent en informer le médecin inspecteur de santé publique de l'ARS de leur lieu d'exercice (signalement) et les biologistes doivent envoyer la souche suspecte au CNRVC. Le signalement, procédure d'urgence et d'alerte, s'effectue sans délai et par tout moyen approprié (téléphone, télécopie). Il n'existe pas de support spécifiquement dédié au signalement, c'est généralement la fiche de Déclaration Obligatoire (DO) qui en fait effet, disponible sur le site internet du CNRVC ainsi que sur le site de SpF, https://www.formulaires.service-public.fr/qf/cerfa_12197_02.do. La notification intervient après le signalement et après confirmation du diagnostic par le CNRVC.

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

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

• Dans le cas des **infections à VNC**, le CNRVC informe systématiquement SpF, par mail ou par téléphone, en cas de phénomène anormal, dès lors qu'il peut constituer une urgence de santé publique (formes cliniques inhabituelles, souches atypiques, cas d'infections à *V. vulnificus*, ...).

Événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année 2023.

• **Quinze signalements** pour suspicion de cas de choléra ont été faits en 2023 par des biologistes ou cliniciens aux ARS, qui ont elles-mêmes alerté SpF et le CNRVC. Les ARS concernées étaient :

- Auvergne Rhône Alpes
- Grand Est
- Guyane
- Ile de France
- Normandie
- Occitanie
- Pays de la Loire
- La Réunion

- **Deux cas de choléra importés de pays d'épidémies ou d'endémies (Afrique, Asie) ont été confirmés et ont fait l'objet d'un signalement** du CNRVC vers la DGS et SpF.

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

Le CNRVC a été sollicité par l'ARS Bretagne pour un avis dans l'investigation d'une TIAC après consommation de langoustines sur le risque d'infection à *V. parahaemolyticus*.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Formations

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

- Diplôme Universitaire en Histoire de la médecine et des maladies, Faculté de médecine de Paris-Cité, « Histoire du choléra », site universitaire de Necker (Marie-Laure Quilici, 1h30), 7 janvier 2023.
- Cours de l'École Pasteurienne d'Infectiologie, « Circulation des Agents Infectieux et Maîtrise du Risque", "Le choléra, épidémiologie et prévention », Institut Pasteur (Marie-Laure Quilici, 2 h), 31 janvier 2023.
- Cours Master 2, Université Paris, Sorbonne Université, Spécialité Microbiologie, option bactériologie moléculaire et médicale, Module épidémiologie. « Epidémiologie du choléra », Faculté de Médecine, Saint-Antoine et Sorbonne Université (Marie-Laure Quilici, 2h), 5 décembre 2023.
- MOOC Waterborne Infectious Diseases - Institut Pasteur, Diplôme Numérique des Maladies Infectieuses de l'Institut Pasteur (DNM2IP), « Le choléra », édition 2023, (Marie-Laure Quilici), diffusion à partir du 24/10/2023.
- Présentation Le Rémic's de la Société Française de Microbiologie « Actualités sur *Vibrio cholerae* » (François-Xavier Weill), 8 décembre 2023.

Le CNRVC forme des étudiants aux techniques de laboratoire, un stagiaire BTS Bioanalyses et contrôles a été reçu en 2023 pour « Recherche du Vibriophage ICP1 et tests de sensibilité au phage », cinq semaines en juin.

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

Auprès des partenaires

- SpF, DGS : les échanges de données de surveillance en interface avec SpF ont été décrits au point 3-4 de ce rapport. Les données de surveillance sont communiquées à SpF sur demande, à l'occasion d'enquêtes ponctuelles, et annuellement par le rapport d'activité du CNRVC.
- Auprès d'autorités partenaires telles que l'ANSES, l'IFREMER : le CNRVC communique régulièrement avec ces différentes instances, dans le cadre de programmes de recherche communs, ou à l'occasion d'enquêtes ponctuelles ou de sollicitations conjointes par les autorités partenaires (DGS ou DGAL).

Auprès des professionnels de santé et des laboratoires correspondants

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

La diffusion d'informations est effectuée par l'envoi de documents de référence (articles généraux publiés dans l'EMC, la Presse Médicale, Spectra Biologie, case reports). Une fiche de recueil de données cliniques et épidémiologiques est systématiquement demandée, l'importance de ce recueil est soulignée, d'autant que c'est l'interrogatoire du patient ou de son entourage, effectué le plus souvent a posteriori, plutôt que l'observation des manifestations cliniques, qui permet généralement d'évoquer l'hypothèse d'une infection à VNC.

Les résultats de l'identification bactériologique et de la recherche des facteurs de pathogénicité sont communiqués aux microbiologistes et/ou cliniciens par un courrier personnalisé, les sensibilisant à l'intérêt de la recherche des vibrions dans les prélèvements biologiques. Le CNRVC est prêt à collaborer avec les médecins ou cliniciens souhaitant publier des « case reports ».

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

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

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Le CNRVC a été sollicité par la DGS en juillet 2023 pour une réunion sur « La surveillance environnementale de poliovirus et choléra à Mayotte » avec l'ARS de Mayotte afin de déterminer la nécessité d'effectuer une surveillance de la présence de choléra dans l'eau à Mayotte dans le cadre de la problématique de l'eau à Mayotte.
- Le CNRVC a été sollicité par la DGS en septembre 2023, via l'astreinte épidémiologique de SpF, pour une réunion avec l'ARS de Mayotte afin de déterminer la nécessité d'effectuer une vaccination choléra pour des professionnels de santé partant à Mayotte dans le cadre des problématiques d'eau. Du fait de l'absence de choléra à Mayotte en septembre 2023, la vaccination n'a pas été recommandée.
- Le CNRVC a été sollicité par la DGS en octobre 2023 avec l'ARS Mayotte et Eau de Paris dans le cadre de la problématique d'accès à l'eau pour la mise en place d'un circuit d'analyse des eaux usées de Mayotte. Des réunions ont été organisées pour définir les examens à effectuer sur les eaux usées. Le CNRVC a fourni un appui technique et scientifique pour la mise en place d'une PCR multiplex pour la détection du choléra. Le CNRVC a réalisé des analyses des eaux pour infirmer certains résultats douteux par PCR.
- Le CNRVC a été sollicité en décembre 2023 par la mission nationale Coordination Opérationnelle Risque Epidémique de Biologique (COREB) pour la relecture et modification d'un document choléra à destination des soignants pour Mayotte dans le contexte de crise sanitaire pour identification et traitement des cas de choléra.

Le CNRVC a poursuivi ses activités en lien avec la GTFCC/OMS par l'animation du « Groupe de travail laboratoire » (**Marie-Laure Quilici**) dont une partie des activités participe également au « Groupe de travail Surveillance ». L'objectif est d'améliorer les méthodes de laboratoire appliquées à la surveillance du choléra, participant à l'élaboration de stratégies de diagnostic dans un objectif global de surveillance des épidémies. Plusieurs notes et directives techniques sont publiées en anglais et français sur le site web de la GTFCC de l'OMS, <https://www.gtfcc.org/fr/>, une a été publiée en 2023 :

- Public health surveillance for cholera, Interim guidance February 2023, <https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/02/gtfcc-public-health-surveillance-for-cholera-interim-guidance.pdf>
<https://www.gtfcc.org/wp-content/uploads/2023/04/gtfcc-surveillance-de-cholera-lignes-directrices-provisoires.pdf>

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

- Février 2023 – Interview de François-Xavier Weill pour un article du journal « Le Monde » sur les conséquences du séisme en Turquie
 - o https://www.lemonde.fr/international/article/2023/02/15/apres-les-seismes-en-turquie-un-impact-environnemental-redoute_6161967_3210.html
- Octobre 2023 – Interview de François-Xavier Weill pour un article du journal « Le Monde » sur le doublement des cas de choléra rapporté à l'OMS entre 2021 et 2022
 - o https://www.lemonde.fr/planete/article/2023/10/03/cholera-le-nombre-de-cas-rapportes-a-l-oms-a-double-entre-2021-et-2022_6192071_3244.html

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

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Etude surveillance génomique européenne des cas de choléra importés en 2022

Objectif de l'enquête : En 2022, le nombre de cas de choléra signalés à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a plus que doublé par rapport à 2021. Le nombre de pays déclarant des cas a atteint un pic, à 44, avec sept pays déclarant plus de 10 000 cas. Neuf pays de la région européenne de l'OMS ont signalé 51 cas de choléra (dont 47 cas importés), contre seulement cinq cas en 2021. Nous avons voulu réaliser une étude microbiologique sur les souches issues de tous ces cas européens pour confirmer que tous ces cas étaient bien causés par le vibron de la septième pandémie de choléra (lignée 7PET) et pour identifier plus précisément les souches en circulation en particulier en fonction de leurs origines géographiques.

Partenaires et contribution du CNRVC : En 2023, le CNRVC a donc contacté (via l'ECDC et l'OMS Europe) tous les pays européens ayant signalé des cas importés afin d'initier et coordonner une étude de génomique bactérienne. Les différents pays ont transmis soit les séquences génomiques soit du matériel biologique (cultures ou ADN).

Principaux résultats :

Sur les 51 cas européens, 49 souches ont pu être isolées puis séquencées. Les 46 génomes de bonne qualité obtenus appartenaient tous à la lignée 7PET. Tous les isolats sauf deux appartenaient à la vague génomique 3 et étaient regroupés en trois sous-lignées, dont l'une - Pre-AFR15 - prédominait (77,3 %, 34/44). Cette sous-lignée, présente dans plusieurs pays d'Asie du Sud, du Moyen-Orient, d'Afrique de l'Est et d'Afrique australe, a probablement joué un rôle majeur dans la recrudescence mondiale des cas de choléra en 2022. Aucun profil de multi-résistance n'a été détecté. Cette étude a permis d'obtenir des génomes de souches provenant de pays ne déclarant pas de cas de choléra.

En conclusion, des études génomiques collaboratives régulières basées sur des isolats provenant de voyageurs peuvent fournir des informations utiles sur les souches en circulation et leur évolution, en particulier en ce qui concerne la résistance aux antimicrobiens.

Une publication soumise au journal « Eurosurveillance » est en relecture par des pairs à ce jour.

Etude de souches de *V. cholerae* O1 hautement résistantes aux antibiotiques et importées du Kenya dans trois pays européens en 2023

Le Kenya a connu une épidémie majeure de choléra qui a débuté en octobre 2022 avec 12 120 cas de choléra en un an. En 2023, un cas de choléra importé de ce pays a été diagnostiqué en France. La souche isolée était une souche de *V. cholerae* O1 El Tor de la 7^{ème} pandémie appartenant à la sous-lignée AFR13. Cette souche présentait la particularité d'être une souche hautement résistante, restant sensible uniquement à la doxycycline. Cette souche possédait un plasmide de résistance IncC porteur d'un gène codant pour une beta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et des gènes de résistance à l'azithromycine. Cette souche était phylogénétiquement reliée aux souches BLSE que nous avons précédemment identifiées au Yémen en 2019 (Lassalle *et al.* Nature Microbiology 2023) et au Liban en 2022 (Abou-Fayad *et al.* BioRxiv 2024). Après une enquête auprès de nos interlocuteurs européens et des analyses génomiques, nous avons pu identifier deux autres souches identiques isolées au cours de l'année 2023 (cas importés du Kenya en Belgique et au Royaume-Uni). L'isolement de ces trois souches chez des voyageurs suggère que l'épidémie au Kenya en 2023 est liée à cette souche. Celle-ci a probablement été introduite récemment au Kenya car elle est différente des souches isolées lors de l'épidémie antérieure (2017-2020). Notre étude permet de documenter la diffusion de cette souche inquiétante de *V. cholerae* BLSE en Afrique.

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

Nombre de publications internationales : 3

Nombre de publications mentionnant les financements de Santé publique France : 2

Publications internationales

Smith AM, Sekwadi P, Erasmus LK, Lee CC, Stroika SG, Ndzabandzaba S, Alex V, Nel J, Njamkepo E, Thomas J, Weill FX. Imported Cholera Cases, South Africa, 2023. **Emerg Infect Dis.** 2023 Aug;29(8):1687-1690. doi: 10.3201/eid2908.230750.

Lassalle F, Al-Shalali S, Al-Hakimi M, Njamkepo E, Bashir IM, Dorman MJ, Rauzier J, Blackwell GA, Taylor-Brown A, Beale MA, Cazares A, Al-Somainy AA, Al-Mahbashi A, Almoayed K, Aldawla M, Al-Harazi A, Quilici ML*, Weill FX*, Dhabaan G*, Thomson NR*. Genomic epidemiology reveals multidrug resistant plasmid spread between *Vibrio cholerae* lineages in Yemen. **Nat Microbiol.** 2023 Oct;8(10):1787-1798. doi: 10.1038/s41564-023-01472-1. *auteurs ayant co supervisé le travail

Hounmanou YMG, Njamkepo E, Rauzier J, Gallandat K, Jeandron A, Kamwiziku G, Porten K, Luquero F, Abedi AA, Rumedeka BB, Miwanda B, Michael M, Okitayemba PW, Saidi JM, Piarroux R, Weill FX, Dalsgaard A, Quilici ML. Genomic Microevolution of *Vibrio cholerae* O1, Lake Tanganyika Basin, Africa. **Emerg Infect Dis.** 2023 Jan;29(1):149-153. doi: 10.3201/eid2901.220641.

Communications internationales

Achievements, challenges and identified priorities of the Laboratory Working Group, Marie-Laure Quilici, Institut Pasteur Paris, 10th Annual Meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), June 26 - 28, 2023, Les Pensières Center for Global Health, Veyrier-du-Lac, France.

Achievements of the GTFCC Laboratory Working Group, Marie-Laure Quilici, Institut Pasteur Paris, 8th SURVEILLANCE meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 02-05 May 2023, Maputo, Mozambique

Testing and confirmation of cholera, GTFCC interim testing strategy, K. Heitzinger, US CDC; Marie-Laure Quilici, Institut Pasteur Paris, 8th SURVEILLANCE meeting of the Global Task Force on Cholera Control (GTFCC), 02-05 May 2023, Maputo, Mozambique.

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

- Dans le domaine de la santé alimentaire, le CNRVC collabore principalement, et depuis de nombreuses années, avec le Laboratoire d'Études et de Recherche sur les Produits de la Pêche de l'ANSES à Boulogne-sur-Mer, désigné en 2011 LNR *Vibrio* dans les Produits de la Pêche. En 2023, le CNRVC a organisé un échange inter-laboratoire constituant un contrôle de qualité externe en envoyant six souches de *Vibrio* sp. au LNR. Le CNRVC et le LNR sont également en contact pour la mise en place de différentes qPCR de diagnostic.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Activités d'expertise

- Développement d'outils bioinformatiques pour assurer la transition entre bactériologie classique et génomique haut-débit pour l'identification et le typage des VNC. Le premier outil permettra le sérogroupage *in silico* des *V. cholerae*.
- Validation de méthode de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des souches de *Vibrio sp*
- Poursuite du développement de méthodes de qPCR pour remplacer les PCR conventionnelles utilisées en routine au CNRVC pour le diagnostic avec réalisation de dossiers de validation de méthode :
 - o *V. cholerae* : identification d'espèce, recherche gène *ctxA*, gène *rfbO1*, gène *rfbO139*,
 - o *V. parahaemolyticus* : identification d'espèce
- Réalisation d'une enquête sur les modalités de réalisation des PCR syndromiques auprès des correspondants du CNRVC
- Rechercher les différents acteurs pour une concertation concernant les modalités de diagnostic des *Vibrio sp* : place de la PCR syndromique, obligation de la culture des souches ?

Recherche

- Poursuite des analyses phylogénomiques des souches récentes de vibriens cholériques de la septième pandémie pour mieux comprendre la circulation mondiale et l'évolution génétique de cet agent pathogène.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection historique de 250 souches du vibron cholérique de biotype classique pour mieux comprendre la structure des populations et l'évolution de ce pathogène historique qui a disparu au profit du biotype El Tor au cours des années 1970 et 1980.
- Poursuite de l'étude génomique d'une collection de 250 souches représentatives de *V. cholerae* non-O1/non-O139 pour mieux décrire les populations pathogènes de ce groupe bactérien peu connu quant à sa diversité génétique et sa pathogénèse.
- Analyse génomique des souches de *V. alginolyticus* de la collection du CNRVC (notamment la différenciation avec l'espèce *V. diabolicus*)
- Analyse fine de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *V. fluvialis*
- Analyse des souches de *V. cholerae* non-O1/non-O139 toxigène (séro groupe O141)

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Vibrions et choléra

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

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

*Pour le **Vibrio cholerae***

1. Expertise

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

2. Conseil

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout cas diagnostiqué en France Métropolitaine, dans les DOM, toute augmentation inhabituelle de cas, l'apparition de cas groupés, toute modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), toute modification des profils de résistance et l'apparition de souches inhabituelles, etc.

Pour les vibriens non cholériques

1. Expertise

- en apportant une expertise aux laboratoires de biologie médicale pour l'identification et le typage des souches de Vibriens (espèces peu courantes, rarement isolées par ces laboratoires) ;
- en diffusant les informations et techniques visant à identifier les vibriens halophiles dans un contexte de toxi-infection alimentaire d'origine halieutique ou marine.

2. Conseil

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

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

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

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

1.3 Locaux et équipements

Surface des locaux et plan

Le CNRVC se situe dans l'Unité des Bactéries pathogènes entériques à l'Institut Pasteur, dont les locaux sont formalisés en rouge sur le plan ci-dessous. Cette unité est localisée dans le bâtiment BioTop du campus du 28 du Dr Roux, Paris 15.

Les locaux se trouvent principalement au 3^e étage de ce bâtiment :

- les pièces 01A et 02, représentant deux laboratoires pour une surface totale de 26 m², sont plus spécifiquement dédiées aux activités de bactériologie (pièce 01A : laboratoire P2) et de biologie moléculaire du CNRVC (pièce 02) ; un de ces deux laboratoires (pièce 01A), dont l'accès est limité au personnel du CNRVC, est également la pièce d'archivage des dossiers,
- le secrétariat (pièces 03/04) est commun à l'UBPE, pour effectuer la saisie informatique des renseignements épidémiologiques accompagnant les souches, l'envoi et l'archivage des résultats,
- la pièce 11 est un bureau commun pour le personnel permanent du CNRVC, ainsi que pour les stagiaires,
- la pièce 01B est un bureau pour le responsable du CNRVC,
- des locaux techniques sont partagés entre l'Unité des Bactéries pathogènes entériques et l'Unité des Spirochètes :
 - * une pièce climatisée de 16,1 m² (n°10) pour les migrations par électrophorèse en agarose, les thermocycleurs, l'appareil d'acquisition d'image de gels et pour réaliser les extractions semi-automatiques d'ADN,

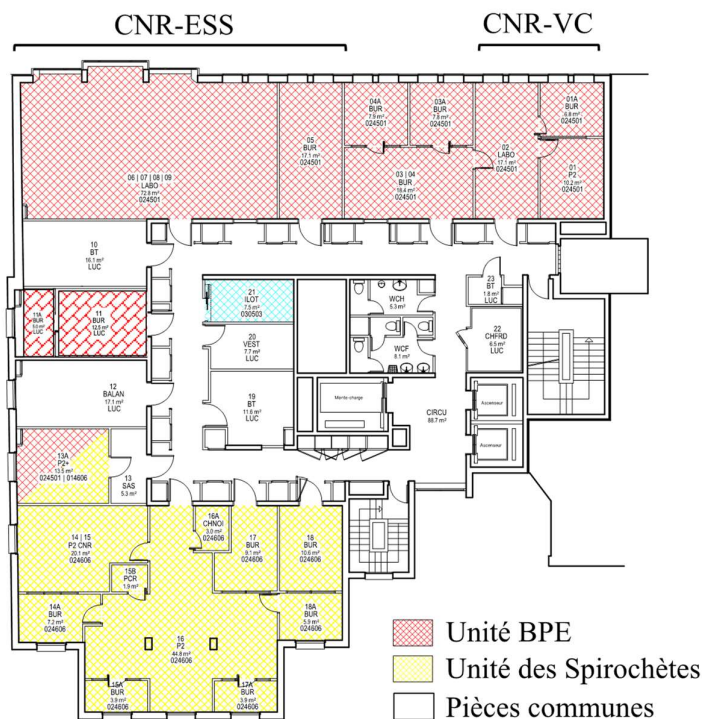
- * une pièce de 11,6 m² (n°19) contenant les agitateurs Infors, les 2 congélateurs à -80°C et l'ultracentrifugeuse,
- * une pièce de 12 m² (n°12) contenant les balances et une hotte chimique,
- * une chambre froide de 6,5 m² (n°22) contenant les milieux de cultures, les antisérums et les réactifs.

D'autres locaux sont localisés à différents étages du bâtiment BioTop :

- au 1^{er} étage, il existe des locaux (n°14, 14A, 14B, 15 et 15A, partagés avec l'Unité des Spirochètes) de 33,1 m² pour réaliser la PCR « marche en avant » dans le cadre de l'accréditation,
- au 3^e étage, il existe des bureaux (n°03A, 04 et 04A) avec 10 places et un laboratoire de 10,3 m² (n°03) pour faire les mix PCR (hors accréditation) et le séquençage Long Read.

Le CNRVC 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 CNRVC,
- un local au sous-sol du bâtiment Fernbach et un au rez-de chaussée du bâtiment Jacques Monod (les deux bâtiments situés au 25 rue du Dr Roux), partagés avec d'autres entités, abritant des containers d'azote liquide, dont deux contenant une partie de la collection de souches du CNRVC,
- un local au 1^{er} sous-sol du bâtiment 8 (28 rue du Dr Roux), partagé avec d'autres entités, et contenant les souches lyophilisées du CNRVC.



Bâtiment BioTop, 3^eme étage

Principaux équipements

Dans la structure

Spécifiques au CNRVC :

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

Commun à l'Unité BPE :

- un appareil PCR temps réel CFX96 (Bio-Rad),
- un système automatisé de lecture et d'interprétation d'antibiogrammes Sirscan,
- un système de lecture et d'interprétation des CMI en microdilution sur plaques Sensititre,
- un séquenceur MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies) pour effectuer du séquençage « long-read ».

Partagé avec d'autres entités :

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

Moyens extérieurs à la structure et services supports

L'organisation générale et les moyens supports mis à disposition des unités hébergeant un CNR à l'Institut Pasteur sont décrits dans l'Annexe C, « Organisation des CNR à l'Institut Pasteur », et concernent en particulier :

- la Plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) qui effectue les séquençages de génomes bactériens en temps réel dans le cadre des activités de Santé Publique (extracteur automatique d'ADN et séquenceur à haut débit NextSeq 500 d'Illumina),

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

Viennent également en support aux CNRVC :

- la Plateforme Milieux, qui réalise la fabrication des milieux, tampons et solutions simples et complexes en intégrant les normes ISO 9001 pour le management de la qualité et ISO 11133 pour la qualité des milieux de culture,
- la Plateforme OMICS qui permettra le séquençage des génomes bactériens pour les activités de recherche (séquenceurs à haut débit MiSeq et HiSeq2500 d'Illumina),
- le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP) qui est équipé d'un appareil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) Sirius (Bruker),
- le Centre de Bioinformatique, Biostatistique et Biologie intégrative (C3BI) qui sera impliqué dans les analyses bioinformatiques et le développement d'interfaces web,
- l'Animalerie centrale,
- le Service informatique pour les infrastructures informatiques,
- la Médiathèque scientifique avec la grande majorité des revues de microbiologie accessibles en ligne,
- le Service de Coordination des CNR et des CCOMS, chargé de coordonner les activités des Centres Nationaux de Référence et des Centres Collaborateurs de l'OMS placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur.

Les CNR de l'UBPE bénéficient également de l'assistance :

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

1.4 Collections de matériel biologique

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

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

- Le CNRVC peut être amené à assurer une distribution de certaines souches, utilisées comme souches de référence (souches témoins de PCR par exemple) ou dans le cadre de collaborations scientifiques. L'accès aux souches et données associées collectées dans le cadre de l'activité des CNR se fait après accord des responsables du CNRVC. Il est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques en fonction de l'utilisation finale du matériel et de la nature industrielle ou académique du partenaire. Par exemple, un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement ou MTA) et un accord de collaboration peuvent être nécessaires selon la nature des interactions entre les deux parties. Ces accords pourront éventuellement donner lieu à une contrepartie financière limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.

- Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial.
- En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNRVC soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.
- A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNRVC.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRVC fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2023. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

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

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyses 2023	Accrédité (A) / non accrédité (NA)
Vibrons et choléra	Microbiologie	Bactériologie	Identification moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	124	NA
			Identification moléculaire de <i>V. alginolyticus</i>	33	NA
			Identification moléculaire de <i>V. vulnificus</i>	26	NA
			Agglutination sur lame <i>V. cholerae</i>	64	A
			Détection des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant la toxine cholérique	153	A
			Identification moléculaire de <i>V. cholerae</i>	206	A

En 2023, le CNRVC a participé à deux échanges interlaboratoire (EIL) :

- L'un organisé par le Centre national de référence de Belgique pour *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (CHU de Liège), par l'analyse de six souches de *Vibrio* (deux *V. cholerae*, trois *V. parahaemolyticus*, un *V. fluvialis*). Les analyses portaient sur l'identification des espèces, la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 et sérotypes Inaba/Ogawa pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.
- L'autre organisé par le CNRVC avec le LNR Vibrio de Boulogne sur Mer. Six souches de *Vibrio* sp (3 *V. cholerae*, 1 *V. vulnificus*, 2 *V. parahaemolyticus*) ont été envoyés par le CNRVC au LNR de Boulogne sur Mer. Les analyses portaient sur l'identification des espèces, la détection des gènes de virulence, ainsi que la détermination des sérogroupes O1/O139 et sérotypes Inaba/Ogawa pour *V. cholerae*. Les résultats étaient 100% conformes aux résultats attendus.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Liste des techniques de référence du CNRVC		Technique accréditée
Recherche des vibrions à partir de prélèvements par des techniques d'enrichissement en eau peptonée alcaline et isolement sur milieu sélectif (TCBS et GNA)		
Identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI TOF (Sirius Bruker) avec utilisation de la base de données Bruker ainsi que d'une base de données spécifique développée au CNRVC pour l'identification des espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme		
Identification bactérienne par autres techniques de bactériologie classiques des différentes espèces de <i>Vibrio spp</i> pathogènes pour l'homme (Oxydase, Galerie API 20E, Cultures en concentrations croissantes de NaCl)		
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérogroupes O1 et O139		Oui
Séro-agglutination des souches de <i>V. cholerae</i> pour recherche des sérotypes Inaba et Ogawa		
Identification de <i>V. parahaemolyticus</i> (recherche du gène <i>r72H</i>) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. cholerae</i> (recherche de l'espace intergénique 16-23S) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. vulnificus</i> (recherche du gène <i>hly</i>) par PCR en point final		Oui
Identification de <i>V. alginolyticus</i> (recherche du gène de la collagénase) par PCR en point final		Oui
Recherche des gènes <i>ctxA</i> et <i>ctxB</i> codant pour la toxine cholérique par PCR en point final		Oui
Identification bactérienne par séquençage Sanger de l'ARNr16S et du gène <i>rpoB</i>		
Séquençage complet des génomes (WGS) : short reads (Illumina), long reads (Minion)		
Caractérisation moléculaire de <i>V. cholerae</i>	Recherche et typage des gènes <i>hlyA</i> (hémolysine), <i>tcpA</i> (Toxin-corregulated pilus), <i>rstR</i> (Répresseur du phage CTX)	
	Recherche du gène <i>chxA</i> (codant pour la cholix-toxine)	
	Recherche du gène <i>stn</i> codant pour une entérotoxine thermo-stable	
	Recherche des gènes <i>rfbO1</i> et <i>rfbO139</i> (codant les sérogroupes O1 et O139)	
	Recherche des gènes <i>ToxR</i> et <i>OmpW</i> (identification espèce <i>V. cholerae</i>)	
	MLST <i>in silico</i>	
Caractérisation moléculaire de <i>V. parahaemolyticus</i>	Recherche des gènes codant pour les hémolysines <i>tdh</i> et <i>trh</i>	
	Recherche des gènes correspondant aux clones pandémiques (<i>orf8</i> , <i>toxRS</i>)	
	Recherche du gène <i>toxR</i> (identification espèce <i>V. parahaemolyticus</i>)	
	MLST <i>in silico</i>	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS1 (<i>vcrD1</i> , <i>VP1680</i> , <i>vopD</i>)	
	Recherche des gènes codant pour le T3SS2 (<i>vcrD2</i> , <i>vopD2</i> , <i>vopB2</i> , <i>vopP</i> , <i>vopC</i> , <i>vopT</i>)	
Mesure du titre d'anticorps vibriocides de sérums vis à vis des vibrions cholériques.		
Elution et PCR sur échantillons déposés sur papiers filtres secs (selles ou enrichissement), pour la confirmation de la présence de vibrions cholériques.		

Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

- Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé
- Détermination de la CMI en milieu liquide sur microplaques par une approche semi-automatisée Sensititre™
- Détermination de la CMI en bandelettes Etest®
- Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2023 *Vibrio spp*, CASFM-EUCAST 2023 Entérobactérales ou CLSI M45 (2015) en fonction des molécules
- Recherche de gènes de résistance acquis sur génome (Resfinder) et recherche de mutations chromosomiques (résistance aux fluoroquinolones : *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* ; résistance aux nitrofuranes : VC0175, VCA0637 ; réversion de la sensibilité à la colistine)

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Liste des techniques recommandées par le CNRVC
<p>Recommandations pour la recherche des bactéries du genre <i>Vibrio sp</i> à partir des selles :</p> <ul style="list-style-type: none">- Enrichissement des selles à l'aide d'eau peptonée alcaline- Culture sur milieux spécifiques et sélectifs : TCBS et GNA <p>Cependant de nombreux laboratoire ne disposent pas de ces différents milieux :</p> <ul style="list-style-type: none">- Sur la base des retours d'expérience fait par les biologistes au CNRVC, la détection des espèces de <i>Vibrio spp</i> peut se faire sur des milieux habituellement utilisés pour la mise en œuvre d'une coproculture standard, éventuellement sans étape d'enrichissement préalable. <i>V. cholerae</i> en particulier est une bactérie peu exigeante pour sa culture, qui peut être isolée à partir d'une coproculture standard si elle est présente en grande quantité dans les selles. Le facteur limitant en l'absence d'une étape d'enrichissement cependant pourrait être la charge de l'inoculum initial, en particulier dans des cas peu symptomatiques. Les <i>Vibrio spp</i> poussent également très bien sur géloses au sang.- Quilici ML, Robert-Pillot A. Spectra Biologie n°215, mai 2015 <p>Références pour le diagnostic du choléra :</p> <ul style="list-style-type: none">- Quilici M.-L. (2011). Le diagnostic bactériologique du choléra. Revue Francophone des Laboratoires (Elsevier Masson SAS), Dossier Les Maladies Tropicales, 431, 51-65.- 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.- 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 <p>Référence pour le diagnostic des vibrions non cholériques (VNC) :</p> <ul style="list-style-type: none">- 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.
<p>Utilisation des PCR multiplex / syndromiques pour la recherche des <i>Vibrio</i> dans les selles :</p> <ul style="list-style-type: none">- Le CNRVC recommande d'être attentif aux gènes cibles de la PCR et à l'interprétation d'un signal positif. Ainsi une PCR ciblant les gènes de la toxine cholérique ne peut prétendre détecter l'ensemble des souches de l'espèce <i>V. cholerae</i>.- Le CNRVC rappelle la nécessité de confirmer par culture des résultats positifs par PCR multiplex syndromiques. Il recommande également de vérifier la cohérence d'un signal positif avec les données cliniques et épidémiologiques du cas.
<p>Identification des bactéries du genre <i>Vibrio sp</i> :</p> <ul style="list-style-type: none">- Spectrométrie de masse MALDI-TOF<ul style="list-style-type: none">o ATTENTION à la base de données utilisée avec le système Bruker : l'identification de l'espèce <i>Vibrio cholerae</i> n'est possible que si l'extension (MNT IVD Library extension) a été ajoutée. Dans le cas contraire, une souche de <i>V. cholerae</i> sera identifiée <i>Vibrio albensis</i> ou <i>Vibrio mimicus</i> (avec un score entre 1.8 et 2).- Identification moléculaire : cible spécifique pour les différentes espèces ou séquençage de l'ARNr16S et gène <i>rpoB</i>
<p>Typage :</p> <ul style="list-style-type: none">- L'analyse phylogénétique basée sur le WGS et l'analyse comparative des génomes sont utilisées pour étudier la structure de la population et l'évolution des <i>V. cholerae</i> O1 El Tor de la 7^{ème} pandémie
<p>Évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :</p> <ul style="list-style-type: none">- AntibioGramme par diffusion en milieu gélosé- Détermination des CMI- Interprétation de la sensibilité avec les critères CASFM-EUCAST 2023 <i>Vibrio spp</i>