



Rapport annuel d'activité 2020

Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters année d'exercice 2019

Responsable scientifique : Pr Philippe Lehours

Adjoints : Pr Francis Mégraud, Dr Emilie Bessède

Responsable administratif : Mr David Karle

CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin
Laboratoire de Bactériologie
33076 Bordeaux cedex

Sommaire	
Résumé analytique (français).....	3
Résumé analytique (anglais).....	4
1-Missions et organisation du CNR	5
2-Activités d'expertise.....	5
2.1-Évolutions des techniques.....	6
2.2-Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux.....	7
2.3-Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.4-Collections de matériel biologique	13
2.5-Activités d'expertise.....	16
2.6-Activités de séquençage.....	16
3-Activités de surveillance	17
3.1-Description du réseau de partenaires	18
3.1.1-Description du réseau de partenaires <i>Campylobacter</i>	18
3.1.2-Description du réseau de partenaires <i>Helicobacter pylori</i>	19
3.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	21
3.2.1-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>Campylobacter sp</i> et bactéries apparentées	22
3.2.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à <i>H. pylori</i>	25
3.3-Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	26
3.3.1-Surveillance de la résistance des <i>Campylobacters</i> et bactéries apparentées aux anti-infectieux	26
3.3.2-Surveillance de la résistance de <i>H. pylori</i> aux anti-infectieux	32
3.4-Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	36
3.5-Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	36
4-Alerte	40
5-Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	40
5.1.-Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	40
5.2.-Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	42
5.3.-Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...).....	42
6-Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	43
6.1.-Activités de recherche en cours lors de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	43
6.2.-Liste des publications et communications de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	47
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	54
1.1.-Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	54
1.2.-Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	55
1.3.-Locaux et équipements.....	55
1.4.-Collections de matériel biologique	56
1.5.-Démarche qualité du laboratoire.....	57
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	59
2.1.-Liste des techniques de référence.....	59
2.2.-Liste des techniques recommandées par le CNR.....	59

Résumé analytique (français)

L'entérite à *Campylobacter sp* a été révélée par les travaux de Butzler au début des années 70. Il est maintenant admis que c'est l'infection intestinale bactérienne la plus fréquente tant dans les pays développés que dans les pays en développement. L'incidence des infections à *Campylobacter sp*. est en augmentation constante depuis 1991. Elle est maintenant largement supérieure à celle des Salmonelles.

Le CNR des Campylobacters a pour principale mission de surveiller l'épidémiologie des infections à *Campylobacter sp* en France notamment en terme d'espèces retrouvées en pathologie humaine et en terme de résistance aux antibiotiques. Nous participons à l'évaluation des réactifs commerciaux destinés au diagnostic de ces infections ainsi qu'à la formation des biologistes et cliniciens.

Nous travaillons avec un réseau de correspondants privés et hospitaliers qui acceptent de nous envoyer leurs souches accompagnées d'une feuille de renseignements récapitulant certaines données épidémiologiques et bactériologiques. L'activité Campylobacter a augmenté en 2019, en particulier l'activité des laboratoires privés du réseau de surveillance. Pour l'année 2019, *C. jejuni* reste l'espèce majoritairement isolée de selles suivie par *C. coli*. La troisième bactérie, isolée majoritairement de selles, n'est pas un *Campylobacter sp*. mais *Arcobacter butzleri*. *C. fetus* reste l'espèce la plus invasive. Les travaux d'attribution de sources appliqués à *C. jejuni* démontrent que les souches non invasives et invasives isolées en 2018 en France viennent à part égale des volailles et des ruminants. Les travaux d'attribution de sources réalisés en 2019 pour *C. coli* démontrent que le réservoir volaille est également très important pour cette espèce. Les résistances aux antibiotiques restent stables par rapport à 2018 et 2017. Enfin, le CNRCH a participé à la description d'une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* : *C. armoricus*.

Helicobacter pylori a été cultivé pour la première fois en 1982. L'intérêt pour cette bactérie a augmenté progressivement durant la décennie 80 pour devenir très important dans la décennie suivante quand son rôle dans les maladies gastroduodénales a été constaté. Il est maintenant avéré que l'infection à *H. pylori* est la cause essentielle de la maladie ulcéreuse. De plus, il s'agit de la première infection bactérienne à l'origine de cancers chez l'homme : 80% des lymphomes gastriques du MALT sont dus à *H. pylori* et peuvent être guéris par éradication de cette bactérie (sauf aux stades trop avancés avec translocations associées). Concernant les carcinomes gastriques distaux, il s'agit d'un facteur de risque majeur présent dans 90% des cas.

Depuis les années 90, des traitements efficaces se sont développés et des conférences de consensus se sont tenues sur tous les continents pour recommander quand et comment éradiquer cette bactérie.

Le CNR *Helicobacter* travaille avec un réseau de correspondants locaux et nationaux. L'activité *H. pylori* au CNRCH a poursuivi sa progression en 2019. L'année 2019 confirme la stabilisation de la résistance primaire aux macrolides, l'augmentation des résistances aux fluoroquinolones et au métronidazole. De rares souches résistantes à l'amoxicilline, la rifampicine et à la tétracycline ont été identifiées en 2019. Notre participation à un réseau de surveillance Européen a permis de comparer ces données à celles de nos voisins européens. Nous démontrons également l'intérêt d'associer la recherche par culture de cette infection à une détection moléculaire de la bactérie et des mutations associées à la résistance aux macrolides. Un nouveau format de PCR commercial a été évalué ainsi que deux nouveaux tests de détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles.

De nombreux correspondants souhaitent avoir des conseils thérapeutiques ainsi que des conseils concernant la culture et les conditions de réalisation des antibiogrammes de *H. pylori*. Le CNR répond systématiquement à ces demandes, des formations théoriques ou pratiques peuvent être organisées si besoin. Enfin, nous avons décrit dans une publication acceptée en 2019 deux nouvelles espèces du genre *Helicobacter* : *H. burdigaliensis* et *H. labetoulli*.

Résumé analytique (anglais)

Campylobacter enteritis was revealed by Butzler's work in the early 1970s. It is now accepted that it is the most common bacterial intestinal infection in both developed and developing countries. The incidence of Campylobacter sp infections has been steadily increasing since 1991 and is now significantly higher than that of *Salmonella* sp.

The NRC for Campylobacter's main mission is to monitor the epidemiology of *Campylobacter* sp infections in France, specifically in term of species found in human and in terms of antibiotic resistance. We participate in the evaluation of commercial reagents for the diagnosis of these infections as well as the training of biologists and clinicians.

We work with a private laboratories and hospitals network which send us their strains along with a request form summarizing some epidemiological and bacteriological data. The Campylobacter activity increased in 2019, in particular the participation of private laboratories to our surveillance network.

In 2019, *C. jejuni* remained the species mainly isolated from stools followed by *C. coli*. The third bacterium isolated mainly from stools is not a *Campylobacter* sp. but *Arcobacter butzleri*. *C. fetus* remained the most invasive species. The source attribution work applied to *C. jejuni* demonstrated that the non-invasive and invasive strains isolated in France come equally from ruminants and from poultry. Resistance to antibiotics remained stable compared to 2017 and 2018. Finally, the CNRCH participated in the description of a new species of the genus *Campylobacter*: *C. armoricus*.

Helicobacter pylori was first cultured in 1982. Interest in this bacterium increased gradually during the 1980s and became strong in the following decade when its role in gastroduodenal diseases was shown. It has now been shown that *H. pylori* infection is the main cause of peptic ulcer disease. In addition, it is the first bacterial infection causing cancer in humans: 80% of gastric MALT lymphomas are due to *H. pylori* and can be cured by eradication of this bacterium (except in stages too advanced with associated translocations), and for distal gastric carcinomas, this is a major risk factor present in 90% of cases.

Since the 1990s, effective treatments have been developed and consensus conferences have been proposed on all continents to recommend when and how to eradicate this bacterium.

The NRC for Helicobacter works with a local and national correspondents network. The *H. pylori* activity continued to increase in 2019. The year 2019 confirms the stabilization of primary resistance to macrolides and the increase in resistance to fluoroquinolones. Rare strains resistant to amoxicillin, rifampicin and tetracycline were identified in 2019. We also demonstrate the interest of coupling culture with molecular detection of the bacterium and mutations associated with macrolide resistance. A new commercial PCR format was evaluated as well as two new tests for detection of *H. pylori* antigens in stool.

Many correspondents seek advice on eradication strategies as well as on the culture and conditions of *H. pylori* antibiograms. The NRC systematically responds to these requests, and theoretical or practical training can be organized on demand. Finally, we described in a publication accepted in 2019 two new species of the genus *Helicobacter*: *H. burdigaliensis* and *H. labetoulli*.

1-Missions et organisation du CNR

Organigramme 2017-2021 actualisé au 1^{er} avril 2020

<u>Fonction</u>	<u>Nom</u>	<u>Qualification</u>	<u>Statut</u>
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH
Responsable adjoint	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Émérite, vacataire
Responsable adjoint	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Ingénieur hospitalier	Lucie Bénéjat	M2	CDD
Ingénieur hospitalier	Quentin Jehanne	Master bio-info	CDD
Technicienne	Astrid Ducournau	BTS	CDD
Technicienne	Chloé Domingues Martins	BTS	CDD
Technicien(ne)	X (pool des techniciens du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin)	BTS	CDI
Technicienne Qualité	Mélanie Lecoeur	BTS	CDI (40%)
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDD (60%)

D'autres éléments relatifs à cette section sont disponibles en annexe 1 de ce rapport.

2-Activités d'expertise

Les techniques disponibles au CNR sont décrites en annexe 2 de ce rapport.

Nous ne mentionnons ici que les responsabilités scientifiques des biologistes responsables du CNR Campylobacters-Helicobacters, en insistant sur quelques éléments clés de l'année 2019.

Éléments clés 2019 :

- L'activité Campylobacters et *H. pylori* du CNRCH a continué d'augmenter au cours de l'année 2019. Notre réseau de correspondants Campylobacter a été élargi nous permettant de couvrir encore plus largement le territoire français.
- Nous avons proposé au CASFM des seuils adaptés à l'interprétation des bactéries du genre *Arcobacter*. Nous avons également proposé la gélose Schaedler vit K1 comme alternative à la gélose MH-F ou MH10% (non commercialisée) pour la réalisation des antibiogrammes.
- Comme en 2018, nous avons été sollicités par de nombreux laboratoires confrontés à des problèmes de CQ pour *C. jejuni*. Le CNR va proposer au CASFM d'adapter certains seuils d'interprétation.
- Le CNR a publié une étude concernant l'interprétation des PCR syndromiques positives à Campylobacters en l'absence de culture.
- Nous avons évalué les performances de la trousse Novodiag (Mobidiag) dans le diagnostic moléculaire syndromique des infections intestinales bactériennes.
- Un protocole français de surveillance des résistances de *H. pylori* aux antibiotiques ainsi qu'un protocole de surveillance Européen mis en place en 2018 ont été finalisés en 2019.
- Nous avons participé avec IFREMER à la caractérisation d'une nouvelle espèce du genre *Campylobacter*, proche de *C. lari* : *C. armoricus*. Nous avons également caractérisé deux nouvelles espèces du genre *Helicobacter*.
- Nous avons développé courant 2019 les stratégies de NGS appliquées à l'attribution de sources des souches de *C. coli*.
- Les biologistes du CNRCH ont été impliqués dans la co-organisation du 27^{ème} congrès du GEFH en janvier 2019 à

Paris (F Mégraud, P Lehours, E Bessède) et du 32^{ème} congrès de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group (EHMSG) (F Mégraud), qui s'est tenu à Insbrück en septembre 2019.

-Nous avons organisé en septembre 2019 à Paris la deuxième journée des correspondants du CNRCH.

Responsabilités scientifiques :

-P Lehours

- Assistant Editeur de Frontiers in Microbiology
- Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters
- Membre du CA de la Société Française de Microbiologie

-F Mégraud

- Assistant Editeur du journal Helicobacter
- Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters
- Participation au Comité Scientifique de l'étude SAPHARY visant à surveiller les effets secondaires et la bismuthémie des patients traités par Pylera-IPP
- Membre du sous-comité de Taxonomie des Epsilonproteobactéries de l'International Union of Microbiological Societies
- Membre de l'International Editorial Board de l'European Journal of Gastroenterology & Hepatology, du Journal of Digestive Diseases (Chine), de Gut and Liver (Corée), de Minerva Gastroenterologica e dietologica (Italie) et Senior Editor-Clinical de Gut Pathogens,

-Participation à 2 jury d'HDR de l'Université de Bordeaux :

Caroline Gronnier le 16 octobre 2019

Claire Roubaud Baudron le 9 décembre 2019

- Reviewer pour articles scientifiques en moyenne un tous les 10 jours (35 sur 100 demandes en 2019).
- Editeur du numéro spécial du journal Helicobacter : The Year in *Helicobacter* 2019.
- Participation au Hp Genome Project de l'Institut National du Cancer du National Institutes of Health Américain.
- Participation au Stool Banking Project de l'United European Gastroenterology visant à harmoniser en Europe les conditions de test et de conservation des selles, dans le but de la Transplantation de Microbiote Fécal.
- Participation à la création d'un nouveau journal intitulé Microbiota in Health & Disease lancé en juillet 2019, publié par Verduci, Rome, Italie, et membre du Comité Editorial.
- Participation aux activités de l' "Healthy Stomach Initiative" ayant pour but d'alerter le grand public sur les maladies de l'estomac et la nutrition.
- Responsable du Comité de Sélection des résumés concernant *H. pylori* pour la Digestive Disease Week américaine (2020).
- Secrétaire de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group pour 2020 et 2021.
- Co-organisateur de la Conférence Maastricht VI sur les recommandations de prise en charge de l'infection à *H. pylori* (janvier 2021).

-E Bessède

- Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters.

2.1-Évolutions des techniques

L'activité technique relative au diagnostic des infections à Campylobacters et Hélicobacters est restée stable par rapport aux années précédentes.

-Dans l'objectif d'accréditer la recherche de *H. pylori* par PCR en temps réel, une collaboration avec la société Eurogentec a été mise en place. Eurogentec a produit des barrettes de PCR prêtes à l'emploi en salle blanche, délivrées avec un CQ de validation. Seul l'ADN extrait à partir des biopsies est à ajouter dans le tube réactionnel. Nous avons continué en 2019 les tests nécessaires à l'adaptation de notre PCR de détection de *H. pylori* (et des mutations associées à la résistance aux macrolides) (Oleastro M *et al.*, J Clin Microbiol 2003) avec ces réactifs. Ce nouveau conditionnement permet un gain de temps et un meilleur contrôle des réactifs afin d'accréditer plus aisément cette PCR « maison ».

Afin d'identifier *H. pylori* par PCR en temps réel, l'ancienne méthode utilisait des capillaires (onéreux) dédiés au

LightCycler (LC) 2.0, appareil de PCR en temps réel voué à disparaître. Les PCR en barrettes Eurogentec sont réalisées et analysées sur le LC480, disponible au plateau de biologie moléculaire du CHU. Afin d'adapter la PCR « maison » de détection de *H. pylori* du LC2.0 au LC480, le fluorophore LC640 a dû être modifié en ATT0647N, dont le signal est plus intense. Ce changement de fluorophore améliore la sensibilité de cette PCR.

En parallèle de la PCR de détection *H. pylori*, la société Eurogentec a contribué à la conception d'une nouvelle PCR utilisant le gène de ménage β globine en format FRET (contrôle d'extraction et d'amplification) et en barrette, permettant ainsi de réaliser les 2 PCR *H. pylori* et β globine dans un même « run ». Cela constitue un gain de temps considérable.

Chaque lot de barrettes commandé est ainsi accompagné d'un contrôle qualité dont la durée de validité est de 1 an.

Afin de valider ce transfert de méthode de PCR, 61 extraits d'ADN ont été analysés en janvier 2019. Une comparaison de méthode a été réalisée avec l'ancienne et la nouvelle méthode : 100% de concordance ont été obtenues :

Capillaires 2.0	Barrettes LC480	n=
<i>H. pylori</i> négatif	<i>H. pylori</i> négatif	25
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Sensible	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Sensible	17
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant	3
<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant/Sensible	<i>H. pylori</i> positif + Clarithromycine Résistant/Sensible	16

Toutes les PCR de détection de *H. pylori* sont réalisées par cette technologie depuis février 2019. Cette PCR a été proposée à l'accréditation au cours d'un audit interne du CNR par le groupe qualité du CHU de Bordeaux. Le dossier de validation de méthode a été finalisé en décembre 2019.

-Nous avons mis à jour notre base d'identification MALDI-TOF sur automate Bruker, avec les spectres d'espèces proches de *C. lari* notamment *C. ornithocola* (décrite dans la littérature) et *C. armoricus* (Boukerb AM *et al.*, Int J Syst Evol Microbiol. 2019). Ceci nous permet donc aujourd'hui, d'observer une discrimination fine de ces espèces. Nous enrichissons également systématiquement la base MALDI-TOF de l'automate Bruker avec les spectres d'espèces rares peu représentées dans la base commerciale afin d'optimiser nos identifications par cette technique.

-Nous avons validé les sérologies *H. pylori* sur automate Liaison XL à l'aide des réactifs LIAISON® *H. pylori* IgG Diasorin (Stillwater, MN).

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

Travaux relatifs aux infections à *Campylobacter sp*

1-Evaluation d'un test immunoenzymatique, CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™, commercialisé par Abbott

De nombreux tests rapides différents (PCR multiplex ou tests immunoenzymatiques) sont disponibles pour détecter les Campylobacters dans des échantillons de selles. Le CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™, commercialisé par Abbott, permet une détection en moins de 20 minutes. Le but de cette étude était d'évaluer de manière prospective et rétrospective les performances de ce nouveau réactif pour détecter les Campylobacters dans les selles.

Cent huit échantillons ont été analysés de manière rétrospective : 88 échantillons ont été réalisés chez des patients hospitalisés au CHU de Bordeaux et 22 ont été aimablement fournis par un laboratoire privé (Exalab, Le Haillan, France) transportés à + 4°C au CNR. La culture a été systématiquement réalisée, puis les échantillons ont été congelés à -80 ° C jusqu'à utilisation. Après décongélation, les échantillons ont été testés par le CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ rapide en suivant les instructions du fabricant et par une méthode moléculaire (PCR rBiopharm ou BD Max). En cas de divergence entre la culture sur milieu Campylosel et le test moléculaire, un test de détection ELISA (Ridascreen, R-Biopharm) était réalisé. Le test de référence était un test de référence composite : un cas positif correspondant à une culture positive et, en cas de culture négative, à l'association d'un test moléculaire positif et de l'ELISA positif.

Au total, 53 selles ont été positives et 55 négatives. Le test d'Abbott a détecté 1 échantillon positif de plus alors que la culture n'a pas détecté 5 échantillons positifs. La sensibilité du CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ était de 100% et

la spécificité de 98%. En revanche, la sensibilité de la culture était de 90% et sa spécificité de 100%. Le CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ a montré d'excellentes performances. C'est un test très facile à utiliser, ne nécessitant aucune automatisation spécifique. Son principal avantage est la rapidité à obtenir un résultat permettant si besoin une prise en charge médicale adaptée.

En parallèle à cette évaluation rétrospective, une évaluation prospective est menée depuis juillet 2019. Elle a pour but de définir l'impact du rendu d'un résultat rapide sur la prise en charge des patients. Toutes les selles provenant des services d'urgence et de post-urgence pédiatriques du CHU de Bordeaux sont testées à leur arrivée au laboratoire avec le test CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™. Les résultats du test sont communiqués aux cliniciens prescripteurs par téléphone et les modifications de prise en charge notées. Pour cette évaluation, une interne de pédiatrie effectue sa thèse de médecine. Elle récupère les données cliniques de l'année précédant celle de l'utilisation du test et comparera ces dernières à celles obtenues sur l'année au cours de laquelle le test a été utilisé (jusqu'à juillet 2020).

2- Interprétation des détections tardives de Campylobacters par PCR BDMax Enteric Bacterial Panel (Becton Dickinson)

De nombreux laboratoires de biologie s'équipent de PCR multiplex syndromiques notamment dans le cadre du diagnostic de diarrhées infectieuses. Une stratégie consiste, pour le versant bactérien de ces approches, à n'ensemencer que les géloses sélectives à la recherche du ou des pathogènes détectés par PCR syndromique. Les laboratoires utilisant cette stratégie rapportent que la culture se révèle négative pour 10 à 30% des cas.

Le CNRCH a mis en place une collaboration avec deux laboratoires participant à son réseau de surveillance, situés dans les départements 25 et 67 (CBM25, Besançon, Dr Paolini, Bio67, Strasbourg, Dr Gueudet) utilisant depuis 2015 en screening avant culture, la PCR BDMax Enteric Bacterial Panel (Becton Dickinson). Le but de cette étude était d'évaluer, en utilisant deux formats de PCR indépendants, les résultats de la détection de Campylobacter par PCR BDMax Enteric Bacterial Panel en l'absence de culture positive et de déterminer si ces résultats uniquement positifs par PCR syndromique sont des vrais positifs.

Un total de 77 échantillons, trouvés positifs pour Campylobacter sur BDMax mais négatifs par culture, a été étudié. A réception au CNR, une PCR maison pour *Campylobacter sp.* et la PCR RIDAGENE Bacterial Stool Panel (R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne) ont été réalisées. Les données obtenues à l'aide de ces deux PCR ont été évaluées par rapport au seuil du nombre de cycles (Ct) et aux valeurs d'intensité de fluorescence (FI) initialement obtenues sur l'appareil BDMax. Des valeurs de Ct et FI ont également été fournies par nos deux correspondants pour 80 cas positifs à Campylobacters par culture.

Parmi les 77 échantillons, les résultats étaient concordants pour 70 d'entre eux : 33 étaient positifs avec les deux PCR et 37 restaient négatifs. Pour les 33 échantillons double-positifs par PCR, les valeurs de Ct obtenues sur BDMax étaient inférieures à 30 dans 93,9% et les FI > 2000 pour 97% des cas. Pour les 37 échantillons double-négatifs, les valeurs Ct obtenues sur BDMax étaient <30 dans seulement 18,9%, cependant les FI étaient > 2000 pour 40,5% des cas. Les selles positives en culture avaient des valeurs Ct <30 dans 96,2% et des FI > 2000 dans 98,8%. Cette étude a été publiée dans J Clin Med en 2019 (Gueudet T *et al.*, J Clin Med 2019)

Ces résultats ont été par la suite validés fin 2019 en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie du CHU de Lyon.

Ces données nous confortent dans notre opinion qu'un Ct Campylobacter tardif (>30) sur BDMax est le signe que la culture sera probablement négative, en lien probable avec un inoculum faible. Nous proposons aux laboratoires, équipés de ce format de PCR syndromique pour détecter les Campylobacters, d'associer les détections tardives (Ct>30) à un commentaire destiné aux cliniciens. Ces cliniciens devraient alors considérer la prise en charge thérapeutique de ces cas, qui seront probablement négatifs en culture, en les analysant en fonction du contexte clinique (délai entre prélèvements et début des symptômes, prise d'antibiotiques...) ou de refaire un test.

3-Évaluation des performances de la trousse Novodiag Bacterial GE+ dans le diagnostic des infections bactériennes intestinales.

Le but de cette étude était d'établir en priorité les performances analytiques de la trousse Novodiag Bacterial GE+ (Mobidiag, Espoo, Finlande) dans le cadre du diagnostic de gastro-entérite aiguë, et secondairement d'analyser son potentiel impact sur les patients des services d'Urgences du CHU de Bordeaux.

Matériel et Méthodes

Le kit Novodiag Bacterial GE+ a été testé de manière rétrospective sur 198 selles recueillies sur une période allant d'Avril 2014 à Mars 2019 chez des patients ayant consulté aux urgences adultes et pédiatriques du CHU de Bordeaux et de 3 structures privées (Bio67, Strasbourg, Dr Gueudet ; CBM25, Besançon, Dr Paolini ; et Exalab, Bordeaux, Dr Boraud et Dr Robert) et de manière prospective sur 54 selles recueillies entre le 28 Janvier 2019 et le 03 Avril 2019 chez des patients ayant consulté aux urgences adultes et pédiatriques du CHU de Bordeaux. Toutes ces selles ont été testées au préalable en coproculture conventionnelle ou orientée, ou en PCR multiplex avec le kit BDMax Enteric Bacterial Panel et Extended Panel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis), puis mises en tube de lyse eNAT™ (Copan, Brescia, Italie) et analysées sur automate Novodiag selon les recommandations du fournisseur.

Afin de vérifier la pertinence des résultats obtenus avec cet automate, tout résultat discordant avec le résultat de référence (coproculture ou BDMax) a été vérifié :

- tout résultat positif en Novodiag concernant un *Campylobacter*, une *Salmonelle* ou une *Y. enterocolitica* a été vérifié par PCR Rida® Gene Bacterial Stool Panel (R-Biopharm AG, Darmstadt, Allemagne), et PCR *gyrA* pour *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli* du CNRCH.

- tous les résultats de *Shigella*/EIEC et ETEC discordants ont été respectivement confirmés par PCR point final sur les cibles *ipaH* et *ial*, ou *lt* et *stx*.

- tous les EAEC, EPEC et *C. difficile* ont été confirmés respectivement en PCR point final sur les cibles *aggR*, *eae/bfpA*, ou PCR Alethia ciblant le gène codant pour la toxine B de *C. difficile* (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Etats-Unis).

- tous les EHEC positifs en Novodiag ou en BDMax ont été confirmés par mise en culture sur gélose CHROMagar STEC (CHROMagar™, Springfield, Etats-Unis) après enrichissement en bouillon nutritif et PCR point final sur les cibles *stx1* et *stx2* à partir du BH ou des colonies suspectes en gélose STEC.

De la même manière, tous les résultats négatifs en Novodiag discordants avec la culture ou le BDMax ont été confirmés par PCR ou dans le cas de *Y. enterocolitica* par biotypage au CNR des Yersinioses (Institut Pasteur, Paris), le Novodiag ne détectant que celles de biotype pathogène.

Les performances analytiques ont été calculées par rapport à un résultat de référence défini par une culture positive ou, en l'absence de culture, à deux formats de PCR indépendants et concordants.

D'autre part, nous avons effectué un relevé des caractéristiques clinico-biologiques de 128 patients du recueil de selles prospectif (n= 54) et rétrospectif (n=74) du CHU de Bordeaux.

Résultats

Nous avons utilisé au total 262 cartouches de test dont 10 ont donné un résultat « Invalid » (3,8%) sur 9 échantillons différents : 8 d'entre eux ont donné des résultats conformes lors d'un deuxième passage, le 9ème (selles sanglantes) ayant nécessité une dilution supplémentaire après un deuxième échec.

Au total, nous disposons de 252 selles, dont 240 comparées à la culture et 118 à la PCR BDMax. Après confirmation des résultats discordants, la sensibilité du kit Novodiag variait de 98,98% pour *Campylobacter* à 100% pour les autres entéropathogènes majeurs. La spécificité variait de 99,02% pour les ETEC à 100%.

Le Novodiag a détecté 29 *C. jejuni*, 13 EHEC, 3 *C. coli* et 2 *Shigella*/EIEC de plus que la culture, ces résultats ayant été confirmés par deux formats de PCR indépendants. De plus, il a détecté 2 ETEC et 1 EHEC supplémentaires par rapport au BDMax, leur présence ayant été confirmée par PCR point final. D'autre part, le Novodiag a rendu un résultat négatif, confirmé par PCR point final, sur une selle détectée positive en EHEC par PCR BDMax. Les 28 EHEC détectés en PCR Novodiag ont été confirmés par PCR point final sur la culture ou échantillon primaire. Deux des 10 *Y. enterocolitica* n'ont pas été détectées par Novodiag car elles appartenaient au biotype 1a non pathogène.

Nous avons relevé sur l'ensemble de l'étude 3 discordances majeures :

- un *C. coli* positif en Novodiag, négatif en culture et non confirmé par PCR R-Biopharm et PCR *gyrA* ;

- un *C. jejuni* négatif en Novodiag, positif en PCR BDMax et confirmé en PCR R-Biopharm sur échantillon primaire et tube eNAT ;

- et un ETEC positif en Novodiag mais non confirmé en PCR en point final sur les cibles *lt* et *stx*.

De plus, sur les 18 EPEC et 11 EAEC détectés par Novodiag, 5 de chaque n'ont pas été confirmés en PCR point final sur cibles respectives *eae/bfpA* et *aggR*. Les 6 *C. difficile* détectés par Novodiag ont été confirmés par PCR Alethia.

Sur les 128 patients étudiés, 27% présentaient une coproculture et un test Novodiag négatifs. 73% avaient au moins un résultat positif avec la PCR syndromique Novodiag. Les patients du groupe positif présentaient significativement plus souvent des diarrhées (98,9% vs 68,6%) ($p < 0,001$), des douleurs abdominales (86% vs 57,1%) ($p < 0,001$) et de

la fièvre (73,1% vs 34,3%) ($p < 0,001$). Nous avons noté que 37,2% des patients du groupe négatif avaient été mis sous antibiothérapie probabiliste, contre 57% de ceux du groupe positif. Parmi les 95 patients du groupe positif, 11 d'entre eux étaient infectés par une bactérie non détectée en culture conventionnelle (8 pathovars de *E. coli*, et 3 *C. difficile* toxigènes B). Ces 11 patients présentaient un tableau clinique comparable aux autres patients du groupe positif.

Discussion

Notre étude a démontré que la trousse Novodiag® Bacterial GE+ présente d'excellentes performances analytiques quant à la détection simultanée de bactéries entéropathogènes, détectables par culture conventionnelle comme par PCR BDMax. En détectant davantage d'entéropathogènes, le Novodiag a montré une meilleure sensibilité que la culture, conformément à la littérature relative au diagnostic syndromique moléculaire. Le même constat a pu être fait vis-à-vis du BDMax avec une meilleure détection des EHEC et ETEC par le Novodiag. Ce gain de sensibilité a ainsi permis de détecter, lors de l'étude prospective, deux *C. jejuni* et deux *Shigella*/EIEC chez des patients ayant une coproculture négative et présentant une clinique évocatrice (fièvre, diarrhée, douleurs abdominales et rectorragies). De plus, le Novodiag a permis la détection isolée de pathovars de *E. coli*, ainsi que de *C. difficile* toxigènes chez des patients présentant un tableau gastro-entérique non documenté. Il existe donc une pertinence clinique à la détection de ces bactéries.

Concernant les 9 échantillons ayant donné des résultats « Invalid », 4 contenaient des traces de sang importantes, et 3 autres étaient trop chargés en selles au vu de l'opacité de la solution de lyse du tube eNAT. Les deux situations sont propices à l'inhibition de l'amplification génique. Une autre limite du kit Novodiag a été l'absence de détection d'un *C. jejuni*, positif en PCR R-Biopharm avec un Ct 31,1 sur échantillon primaire et un Ct 43,6 sur le tube eNat (avec une limite de détection à 45Ct). Ce faux négatif met en lumière la perte de sensibilité liée à la dilution en tube eNat.

Ce kit ne donne pas d'indication sur d'éventuelles résistances bactériennes ni sur la viabilité de la souche pour lesquelles la culture reste indispensable. D'autre part, l'utilisation de ce type de PCR multiplex implique la détection exclusive des cibles du panel proposé, les autres espèces du genre *Campylobacter*, les *Arcobacter*, *Aeromonas*, et *Plesiomonas* étant non recherchées. Enfin, la détection d'un *C. difficile* chez un enfant de 1 an au cours de l'étude prospective met en évidence le caractère indispensable de l'interprétation du bactériologiste avant libération du résultat, en raison du portage asymptomatique dans cette population.

Ce travail a fait l'objet du mémoire de DES de Biologie Médicale de l'interne Charly Roy, donnant équivalence au doctorat en Pharmacie. Il a été présenté sous forme de poster au congrès de la RICAI 2019 ou sous forme d'une présentation orale aux congrès de la SFM en 2019. Un article a été soumis en mai 2020.

Travaux relatifs aux infections à *Helicobacter sp*

1-Evaluation sur échantillons de selles des performances des kits commerciaux RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* (R-Biopharm).

Le diagnostic de l'infection par *H. pylori* peut être réalisé par des tests non invasifs. La détection des antigènes bactériens dans des échantillons de selles est une technique proposée par certains fournisseurs. L'objectif de cette étude était d'évaluer en rétrospectif sur échantillons de selles les performances des kits commerciaux RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* (R-Biopharm).

Une collection de 132 selles a été utilisée dans cette étude : 94 selles de patients *H. pylori* négatif (culture et PCR négative sur biopsie gastrique) et 38 de patients *H. pylori* positif (5 patients culture -/PCR+ et 33 patients culture+/PCR+). Ces selles avaient été aliquotées en plusieurs tubes stockés à -80°C. Les performances (sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), valeur prédictive négative (VPN)) ont été évaluées pour les kits RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* par rapport aux résultats des PCR effectuées sur les biopsies gastriques (Oleastro M *et al.*, J Clin Microbiol 2003). Tout résultat obtenu avec les kits RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* discordant par rapport au statut *H. pylori* attendu, a été contrôlé le jour même de la réalisation du test par la réalisation d'un deuxième test. Les tests RIDA®QUICK *Helicobacter* ont été lus à l'œil nu par 3 utilisateurs indépendants. Les tests RIDASCREEN® *Helicobacter* ont été analysés sur automate ELISA Etimax (Diasorin) selon les recommandations du fournisseur.

L'ensemble des lectures réalisées pour les tests RIDA®QUICK *Helicobacter* était concordant entre les 3 utilisateurs soit 94/94 tests négatifs et 34/38 tests positifs. Les tests RIDASCREEN® *Helicobacter* étaient négatifs dans l'ensemble des 94 selles *H. pylori* négatives et positifs pour 35/38 des selles positives. La lecture des tests RIDA®QUICK *Helicobacter* n'a pas posé de problème en pratique courante. En effet, seul 1 cas sur 34 était positif avec une faible de

faible intensité. La migration des suspensions de selles au sein de la bandelette n'a pas posé de problème technique. Les valeurs des performances des tests sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

RIDASCREEN® and RIDA®QUICK				
	POS-POS	NEG-NEG	NEG-POS	POS-NEG
Culture-POS / PCR-POS (n=33)	31	1	1	0
Culture-NEG / PCR-POS (n=5)	3	0	2	0
Culture-NEG / PCR-NEG (n=94)	0	0	94	0

	RIDASCREEN®	RIDA®QUICK
Sensibilité	92,1	89,5
Spécificité	100	100
VPP	100	100
VPN	96,9	95,9

Les kits RIDA®QUICK Helicobacter et RIDASCREEN® Helicobacter présentent des caractéristiques techniques excellentes et peuvent être intégrées dans l'arsenal des tests diagnostic de l'infection à *H. pylori*. Un article a été soumis en avril 2020.

2-Evaluation sur biopsies gastriques des performances du kit de PCR Allplex™ *H. pylori* & ClariR Assay (Seegene).

Les recommandations de l'HAS parues en avril 2019, proposent de mettre au remboursement la PCR pour la recherche de *H. pylori* dans les biopsies gastriques et des mutations associées à la résistance aux macrolides. L'objectif de cette étude était d'évaluer, en rétrospectif sur des ADN extraits de biopsies gastriques, les performances du kit de PCR Allplex™ *H. pylori* & ClariR Assay (Seegene). Ce système de PCR multiplex temps réel automatisé permet la détection de *H. pylori* et des mutations A2142G ou A2143G et A2142C responsable de la résistance à la clarithromycine.

Une collection de 110 ADN extraits de biopsies gastriques a été utilisée dans cette étude : 20 ADN de patients *H. pylori* négatifs et 90 patients *H. pylori* positifs (10 patients culture -/PCR+ et 80 patients culture+/PCR+) (38 *H. pylori* wild-type (WT) et 52 *H. pylori* mutés). La moyenne d'âge des 110 patients concernés était de 48,3 ans (+/- 18,6 ans) avec un sex ratio de 0,72. La PCR Allplex™ *H. pylori* a été réalisée sur automate CFX96™ Real-time PCR System (Bioad) et analysée à l'aide du logiciel Seegene Viewer. Les performances du kit de PCR Allplex™ *H. pylori* ont été évaluées par rapport aux résultats de la PCR *H. pylori* du CNRCH.

Les performances de la PCR Allplex™ *H. pylori* sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Concernant la détection de *H. pylori* dans les 20 échantillons attendus négatifs, 2 amplifications tardives ont été obtenues (Ct de 41 et 42,7). L'un de ces 2 échantillons était également positif à l'aide du kit Amplidiag PCR *H. pylori* Mobidiag (contexte d'antécédents d'ulcère gastrique pédiatrique) et a donc été considéré comme un vrai positif du kit Allplex™ *H. pylori*. *H. pylori* a bien été détecté dans les 90 échantillons positifs. La moyenne des Ct des cas positifs était de 26,3 Ct (+/- 3,1). Tous les cas d'infections par *H. pylori* WT ou mutés ont été correctement détectés. Le kit de PCR Allplex™ *H. pylori* permet la distinction des mutations A2142G, A2143G et A2142C dont les proportions étaient respectivement de 7,7%, 88,5% et 3,8%.

	Allplex™ <i>H. pylori</i> & ClariR Assay-Détection <i>H. pylori</i>	Allplex™ <i>H. pylori</i> & ClariR Assay-Détection des mutations ADNr 23S
Sensibilité	100	100
Spécificité	95	100
VPP	98,9	100
VPN	100	100

chiffres en %

Le kit de PCR Allplex™ *H. pylori* présente donc des caractéristiques techniques excellentes et peut être intégré dans l'arsenal des tests diagnostic de l'infection à *H. pylori*. Il présente l'avantage de différencier les principales mutations (A2142G, A2143G et A2142C) associées à la résistance aux macrolides. Ce travail a été accepté pour publication dans le journal *Helicobacter* en avril 2020.

3-Culture de *Helicobacter pylori* post détection par PCR : influence sur la performance.

La culture de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques requiert des conditions préanalytiques et analytiques délicates. Le transport doit être rapide et dans des conditions spécifiques pour conserver la viabilité de la bactérie.

L'HAS a émis un avis afin de proposer la mise au remboursement de la PCR : la culture ne serait remboursée (et donc réalisée) seulement en cas de détection par PCR d'une population présentant une mutation dans l'ADNr 23S associée à la résistance aux macrolides afin de réaliser un antibiogramme et ainsi de permettre aux cliniciens de proposer une stratégie d'éradication ciblée.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'influence d'un ensemencement différé sur la culture de *H. pylori* au profit d'une détection par PCR en première intention.

Entre fin février et fin avril 2019, toute biopsie envoyée au CNR dans des conditions préanalytiques strictes, a été broyée en bouillon nutritif selon le protocole habituel. Le broyat a été congelé immédiatement en 2 tubes, l'un pour la PCR, l'autre pour la culture sur géloses sélectives. La PCR a été réalisée selon le format de PCR du CNR. La culture n'a été réalisée en seconde intention qu'en cas de détection de *H. pylori* par PCR. Les performances de la culture sur cette période ont été comparées aux données du CNR pour les périodes 2017 et 2018 où la culture était réalisée immédiatement, en parallèle à la PCR.

Sur la période d'essai, 281 biopsies ont été reçues au CNR dont 81 étaient positives par PCR (28,8% de biopsies positives) : 59 étaient positives à la fois en culture et en PCR, 22 étaient positives seulement en PCR (27,2%). Par comparaison, en 2017 sur 973 biopsies (27,2% de biopsies positives) la culture avait sous-estimé les infections par rapport à la PCR que dans 10% des cas et en 2018, sur 1675 biopsies reçues (27,9% de biopsies positives) dans 13,3%.

La stratégie proposée par l'HAS n'autorise aucun relâchement sur les conditions préanalytiques notamment de transport des biopsies. De plus, les biologistes doivent avoir conscience qu'une mise en culture différée augmente d'un facteur 2 à 3 le risque de faux négatifs par culture. Le bénéfice-risque d'une telle stratégie méritera d'être observé par chaque laboratoire tenant compte à la fois de son activité et de son recrutement.

2.3-Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous n'avons pas été sollicités pour transférer nos techniques vers d'autres laboratoires nos techniques. Le personnel du CNR répond cependant systématiquement à toutes les demandes de conseils (mail ou téléphone) concernant le diagnostic des infections à *Campylobacters* et *Helicobacters*.

Nous avons mis à disposition sur le site du CNRCH :

- une fiche technique pour la recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques : https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2018/11/FICHE-TECHNIQUE-_-CULTURE-HELICOBACTER-PYLORI.pdf.
- une fiche concernant la culture des *Campylobacters* à partir de prélèvements de selles : <https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2019/02/Fiche-technique-Culture-des-Campylobacters-et-bacte%CC%81ries-apparente%CC%81es-PL-EB-FM-Fev-2019.pdf>.

Les biologistes du CNRCH ont également participé activement à l'élaboration d'une fiche technique pour la recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques mise en ligne début 2019 sur le site internet du Groupe d'Etude Français des *Hélicobacters* <http://www.helicobacter.fr/wp-content/uploads/2019/01/fiche-diagnostic-helicobacter-pylori-pour-le-site-internet-du-gefhn-1.pdf>.

Les souches de Contrôle Qualité (CQ) pour *C. jejuni* et *H. pylori* sont régulièrement envoyées sur demande et gratuitement aux laboratoires demandeurs.

Nous envoyons de manière ponctuelle, aux sites demandeurs, des milieux de transports pour l'envoi de biopsies gastriques destinées à la recherche de *H. pylori* en leur indiquant le protocole à suivre afin de mettre en place les

bonnes conditions préanalytiques dans leur site respectif : une fiche dédiée est accessible sur notre site internet : <https://www.cnrch.fr/wp-content/uploads/2011/03/IN-LAB-546-Fiche-technique-pour-le-conditionnement-de-l'envoi-de-biopsies-gastriques-l2.pdf>.

En 2019, nous avons répondu à 153 demandes d'envoi représentant 67 souches et 96 ADN de différentes espèces d'Epsilonprotéobactéries.

2.4-Collections de matériel biologique

Nous avons en 2019 transféré 713 souches de *Campylobacter* vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux des années 2013 à 2015.

Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- espèces autres que *C. jejuni* et *C. coli* de 2013 à 2015 ;
- C. jejuni* et *C. coli* de 2013 à 2015 issus d'hémoculture ;
- souches isolées à partir d'autres prélèvements que les selles ou les hémocultures de 2013 à 2015.

Les répartitions exactes du nombre de souches sont :

Critères	Laboratoires privés	Hôpitaux
Espèces autres que <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	201	258
<i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> issus d'hémoculture	21	90
Prélèvements autres que selle et hémoculture	9	33
Total	713	

Ce transfert a pu avoir lieu grâce à une convention passée avec le CRB du CHU de Bordeaux en 2019.

Le CNR conserve l'intégralité des isolats de *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Arcobacters*, *Hélicobacters* entérohépatiques) de 2016 à 2019 (environ 5000 souches/année). Nous disposons également de nombreuses souches de *H. pylori*. Elles ont été conservées une année sur deux jusqu'en 2015 et intégralement depuis 2015 (n=3900 environ).

Le CNR dispose d'une collection de souches type pour de nombreuses espèces du genre *Campylobacter sp* (n=14), *Arcobacter sp* (n=3) ou *Helicobacter sp* (n=18). Ces souches ou leurs ADN sont disponibles gratuitement sur demande : cf Tableau suivant.

Collection de souches de référence du CNRCH

Espèce	Sous-espèce	CCUG	ATCC	CIP	NCTC	NADC	Autres
<i>Arcobacter butzleri</i>		30485	49616	103493	12481		
<i>Arcobacter butzleri</i>		34397B					
<i>Arcobacter butzleri</i>						3257	
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>		17801	43158	104014	11885		
<i>Arcobacter skirrowii</i>		10374	51132	103588			
<i>Campylobacter coli</i>		11283	33559	70.80	11366		
<i>Campylobacter coli</i>				68.25			
<i>Campylobacter concisus</i>		13144	33237	103757	11485		
<i>Campylobacter curvus</i>		13146	35224	103747	11649		
<i>Campylobacter curvus</i>		11644					
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>fetus</i>	6823A	27374	53.96	10842		
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>fetus</i>			A169			
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>	33899	19438	68.29	10354		
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>	33902		69.45			
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>venerealis</i>			54.19			
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	<i>lawsonii</i>			104686			
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							SP3
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							03.427
<i>Campylobacter iguaniorum</i>							
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>	11284	33560	70.2	11351		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>	81.176					
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>jejuni</i>						260.94
<i>Campylobacter jejuni</i>		19506/6824	700819	107370	11168		
<i>Campylobacter jejuni</i>		10937					
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hippurate neg						D 1712
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hippurate neg						D 1713
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>doylei</i>	24567	49349	103751	11951		
<i>Campylobacter lanienae</i>				106745			
<i>Campylobacter lari</i>		23947	35221	102722	11352		
<i>Campylobacter ornithocola</i>							LMG 29815
<i>Campylobacter showae</i>				103970			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	9728	35980	103749	11528		
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	11289	33562	53.103	11367		
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.20			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.22			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			81.11			
<i>Campylobacter sputorum</i>	<i>bv fecalis</i>	12014					
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		14913	43954	103681	11541		
<i>Helicobacter anseris</i>		52421					
<i>Helicobacter bilis</i>		38995	51630	104752T			

<i>Helicobacter bizzozeroni</i>		35545		105233T		
<i>Helicobacter brantae</i>		52420				
<i>Helicobacter burdigaliensis</i>						
<i>Helicobacter caesarodunensis</i>		68986		111406		DSMZ 105791
<i>Helicobacter canadensis</i>		47163	700948		13241	
<i>Helicobacter canadensis</i>					13242	
<i>Helicobacter canis</i>			51401	104753T	12739	
<i>Helicobacter cholecystus</i>			700242	105596		
<i>Helicobacter cinaedi</i>		15433		105369		
<i>Helicobacter fennelliae</i>			35683			
<i>Helicobacter fennelliae</i>					11613	CLO 441
<i>Helicobacter hepaticus</i>			51449			
<i>Helicobacter muridarum</i>		29262	49282	104248		
<i>Helicobacter mustelae</i>		25715	43772	103759T	12198	
<i>Helicobacter nemestrinae</i>		44615		104754		
<i>Helicobacter pametensis</i>		29255	51478	104249		
<i>Helicobacter pullorum</i>		33837	51801	104787	12824	
<i>Helicobacter pullorum</i>		33838	51802		12826	
<i>Helicobacter pullorum</i>		33839				
<i>Helicobacter pullorum</i>		33840				
<i>Helicobacter pullorum</i>		33842				
<i>Helicobacter pullorum</i>					13154	
<i>Helicobacter pullorum</i>					13156	
<i>Helicobacter pullorum</i>					13157	
<i>Helicobacter pylori</i>		17874	43504	103995	11637	
<i>Helicobacter pylori</i>		18943		101260		

2.5-Activités d'expertise

Activités d'expertise concernant les Campylobacters

Notre CNR travaille avec un réseau de 167 laboratoires, 97 laboratoires privés et 70 laboratoires hospitaliers, qui participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP. Ces laboratoires nous envoient leurs souches par un système de transport organisé par le CNR. Vingt-quatre de ces correspondants dont 10 hôpitaux (8 CHU, 2 CHG) saisissent 9 souches isolées directement via un accès sécurisé et intégré au site internet du CNR (réseau Campy.Internet). Ces 24 correspondants n'envoient que la 10^{ème} souche au CNR comme contrôle de qualité. Ce système est fonctionnel depuis 2012 avec accord de Santé Publique France (SpFrance).

Chaque souche reçue est identifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et antibiogrammée selon les recommandations du CASFM puis conservée à -80°C. Les laboratoires participant au réseau Campy.Internet saisissent en ligne les données épidémiologiques à l'identique de celles demandées sur la fiche de renseignement accompagnant chaque souche. Nous exigeons qu'ils réalisent une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et un antibiogramme conforme aux recommandations du CASFM-EUCAST sur gélose MHF afin de pouvoir intégrer leurs résultats dans l'épidémiologie des infections à *Campylobacter sp.*

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de souches reçues par les réseaux Campy.COM, Campy.HOP et (ou) saisies par le réseau Campy.Internet en 2019.

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy.Internet	TOTAL
Nb.	1173	3388	3837	8398

La validation biologique est quotidienne (jours ouvrés). Aussi, le délai moyen de retour de résultat pour chaque souche est de 5 jours (sans compter le transfert du résultat papier par envoi postal).

Activités d'expertise concernant *H. pylori*

Le CNR travaille avec un réseau de correspondants du CHU de Bordeaux et extérieurs à la région bordelaise notamment 3 laboratoires privés, 5 polycliniques, 3 cliniques et 1 cabinet de gastroentérologie. Nous recevons également des prélèvements de CHU et CHG : Libourne, Hôpital Cochin, Hôpital Saint Antoine, Hôpital Armand Trousseau, Reims.

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de biopsies reçues en 2019 par type de correspondants.

	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb.	145	1602	1747
%	8,3%	91,7%	

La validation biologique est réalisée les lundi, mercredi et vendredi (jours ouvrés) afin de respecter les délais de subcultures des souches. Aussi, le délai moyen de retour de résultat pour chaque souche est de 10 jours (sans compter le transfert du résultat papier par envoi postal).

2.6-Activités de séquençage

-Le CNRCH n'a pas, en interne au CHU ou à l'université de Bordeaux, accès à une plateforme de séquençage. L'acquisition d'un appareil de séquençage haut débit est toujours au stade de projet au CHU de Bordeaux. Le CHU de Bordeaux essaie en effet de mettre en place des outils adaptés pour répondre aux besoins de séquençage moyen/haut/très haut débit dans le domaine de la santé. Le CNRCH a participé l'an dernier au dépôt d'un projet

d'équipements pour le CHU de Bordeaux et les équipes de recherche associées pour des séquenceurs de moyen/haut débit (MySeq et Next Seq) au Conseil Régional Nouvelle Aquitaine dans le cadre de son AO recherche 2018. Ce projet a été retenu. Les discussions sont en cours pour établir un calendrier et les modalités d'acquisition d'équipements. Dans ce projet est envisagé également un partenariat avec la société Integragen (Evry) (www.integragen.com) notamment pour la production de séquences à très haut débit (exome, génome complet, RNASeq en particulier). Les volumes élevés pourraient justifier l'installation d'une antenne d'Integragen à Bordeaux. En attendant la mise en place de ces projets, la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Bordeaux ne possède plus d'appareil de séquençage haut débit. La plateforme Génome-Transcriptome (INRA Bordeaux-Aquitaine, Cestas-Pierroton) est difficilement accessible en routine.

-Le CNR a recruté en décembre 2018 Mr Quentin Jehanne. Mr Jehanne s'est inscrit en thèse de Science à l'Ecole Science de la vie et de la santé en septembre 2019 sous la direction du Pr P Lehours : « Génomique comparative appliquée à l'étude des bactéries des genres *Campylobacter* et *Helicobacter* ».

-Le CNR a fait appel en 2019 aux techniques de séquençage à des fins de santé publique et épidémiologique afin notamment de réaliser des attributions de sources pour *C. jejuni* et *C. coli*, et de caractériser de probables nouvelles espèces du genre *Helicobacter* (cf projet 2020-2021).

-L'ADN des souches est extrait au CNR à partir de culots bactériens digérés à l'aide de l'extracteur "MagNA Pure 96" (Roche Diagnostics) et du kit "MagNA Pure 96 DNA and Viral NA SV Kit". Une quantification de l'ADN et une vérification de la pureté (ratios 260/280 et 260/230) sont effectuées par NanoDrop avant l'envoi.

Un dosage au Qubit et une vérification de la pureté par NanoDrop sont réalisés par les sociétés prestataires, Helixio et Integragen. Le séquençage est effectué selon le protocole "Paired-end sequencing" (Illumina) (avec les séquenceurs "NextSeq500" pour Helixio et "HiSeq4000" pour Integragen). Les librairies sont obtenues à l'aide du kit "Nextera XT DNA Library Preparation Kit" (Illumina) à partir de 1 ng d'ADN.

Après réception des séquences au CNRCH, un contrôle qualité des séquences brutes (Forward et Reverse) est effectué avec le logiciel "FastQC v0.11.3" (Babraham Institute). Un assemblage *de novo* est ensuite réalisé avec le logiciel "SPAdes v3.10.1". Cet assemblage permet d'obtenir des séquences contiguës (appelées "contigs") plus ou moins longues. A partir de cet assemblage, les contigs sont filtrés en fonction de leur «k-mer coverage» et de leur longueur pour ne garder que les contigs représentatifs et analysables en éliminant les impuretés. Cette étape est réalisée en utilisant un script interne. Les souches dont la majeure partie des contigs sont de mauvaise qualité ne sont pas utilisées pour la suite des analyses bioinformatiques et peuvent également être renvoyées à séquencer lors de futures commandes.

Les séquences conservées sont intégrées dans la base de données BIGSdb (<http://bigsdb.readthedocs.io/en/latest/>), accompagnées des métadonnées. Trois bases de données sont utilisées, selon le genre des souches : la base *Helicobacter*, la base *Campylobacter*, et la base Multispecies. Les outils implémentés dans BIGSdb permettent de typer les souches de *Campylobacter sp.* par MLST, ou encore de produire des alignements en fonction du génome core ou des gènes MLST. Un accord d'échange a été établi avec notre collaborateur Sam Sheppard de l'Université de Bath en Angleterre (<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/contacts/academics/sam-sheppard/index.html>) afin d'accéder aux bases spécifiques *Campylobacter* et *Helicobacter* et en particulier pour avoir accès aux séquences déposées notamment par le LNR *Campylobacter* à Ploufragan (<https://www.anses.fr/fr/content/campylobact%C3%A9riose-0>).

3-Activités de surveillance

Éléments clés en termes de surveillance pour l'année 2019

Le volume d'activité du CNR pour *Campylobacter sp* et *H. pylori* a continué d'augmenter. Le réseau de surveillance des *Campylobacter* a évolué en 2019 en intégrant un plus grand nombre de laboratoires notamment sur des départements non couverts en 2018. Comme initié en 2018, l'activité privée pour *H. pylori* est en forte progression pour 2019.

Les trois principales espèces de *Campylobacter sp* retrouvées chez l'homme sont *C. jejuni*, *C. coli* puis *Arcobacter butzleri*. En quatrième position on retrouve *C. fetus*. Pour la troisième année consécutive, le nombre absolu de souches de *C. jejuni* isolées de flacon d'hémoculture est plus important que *C. fetus*. On observe également une diversification des espèces invasives avec notamment quelques isolats invasifs de *A. butzleri* ce qui est nouveau. Les résistances aux antibiotiques chez *Campylobacter sp* sont stables par rapport à 2018.

Le pourcentage de résistance primaire à la clarithromycine chez *H. pylori* stagne à un niveau proche de 21% en 2019. De rares cas de résistance à l'amoxicilline, à la tétracycline et à la rifampicine ont été identifiés et caractérisés.

3.1-Description du réseau de partenaires

3.1.1-Description du réseau de partenaires *Campylobacter*

Comme indiqué précédemment, le CNR travaille avec un réseau de 97 laboratoires privés et 70 laboratoires hospitaliers qui participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP : 24 de ces correspondants dont 10 hôpitaux (8 CHU et 2 CHG) participent également au réseau Campy.Internet.

Au total, nous répertorions 8398 souches de *Campylobacter* et bactéries apparentées. La carte de France ci-dessous montre la répartition par département (Figure 1).

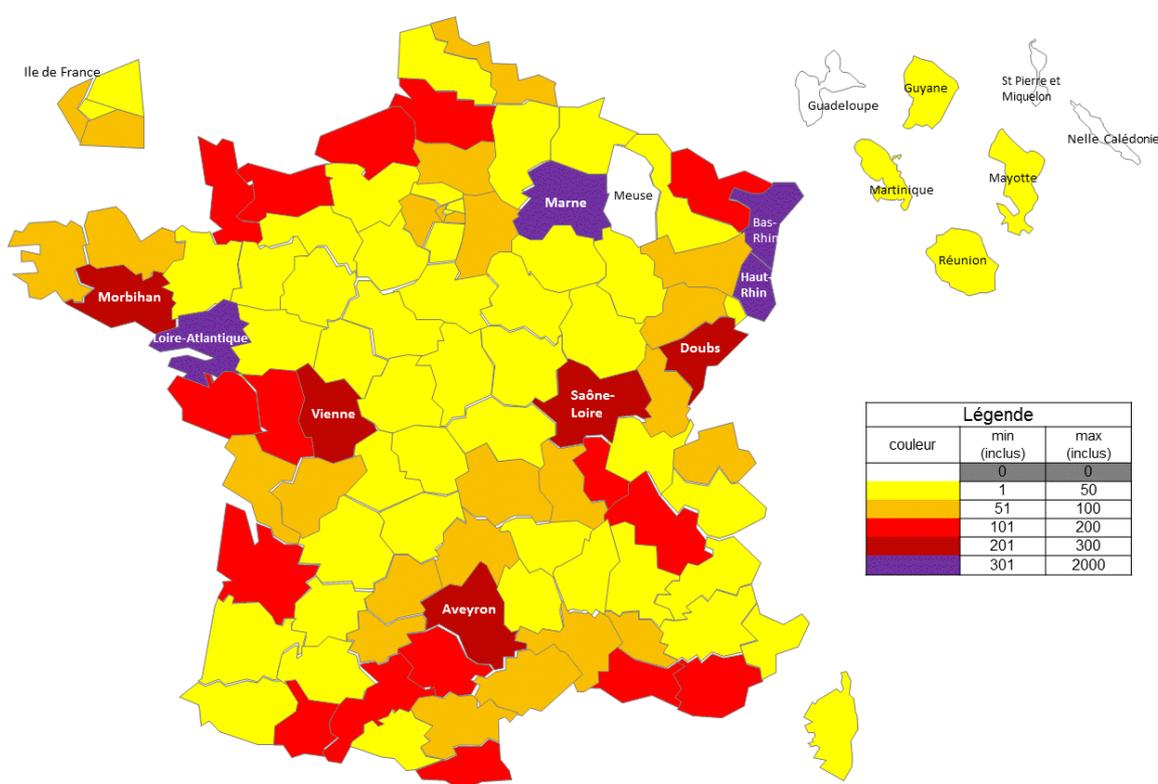


Figure 1. Répartition par département des souches de *Campylobacter* reçues au CNR en 2019 des réseaux Campy.COM, Campy.HOP ou déclarées en ligne par le réseau Campy.Internet. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de souches. Les noms des principaux départements participant au réseau sont indiqués.

-Evolutions du réseau par rapport à l'année 2018 :

Nous couvrons grâce à l'amplitude de répartition de nos correspondants toutes les régions de France dans leur définition. En 2018, 9 départements et 3 DOM-TOM n'étaient pas couverts. Pour 2019, grâce à une nouvelle campagne de sensibilisation, 1 seul département n'est pas couvert (le département de la Meuse), ainsi qu' 1 département d'outre-mer (La Guadeloupe) et 2 territoires ultramarins (Saint-Pierre-et-Miquelon et la Nouvelle-Calédonie).

Le nombre de souches reçues en 2019 viables ou non a augmenté de 4,31% par comparaison à 2018. L'augmentation constatée en 2018 de l'activité de saisie du réseau Campy.Internet n'est pas retrouvée en 2019.

Les campagnes de sensibilisation et d'information effectuées par le secrétariat et les biologistes du CNR auprès des

laboratoires privés et des hôpitaux, nous ont permis d'intégrer 14 nouveaux laboratoires privés et 7 laboratoires hospitaliers dont 2 saisissent sur Campy.Internet (CH Toulon et GHD Bourgoin-Jallieu).

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy.Internet	TOTAL
Nb. en 2018	1081	3073	3897	8051
Nb. en 2019	1173	3388	3837	8398
Evolution en %	+8,51%	+10,25%	-1,54%	+4,31%

L'activité de sérologie *C. jejuni* (par réaction de fixation du complément) a été transférée courant 2018 du laboratoire de Bactériologie hospitalier de routine vers le personnel technique du CNR. Cela a représenté 151 sérologies en 2019, dont 42,4% provenaient de correspondants extérieurs au CHU de Bordeaux (CH Le Mans, CHU Strasbourg, APHP Hôpital Tenon, APHP Hôpital Saint Antoine). La moyenne d'âge des patients était de 46,8 ans avec un sex-ratio de 1,36. Seules 7,9% étaient positives, 89,4% négatives, 2,7% interprétables (sérum anti-complémentaire).

-Participation au PHRC REBALANCE :

L'AP-HP est promoteur d'un essai clinique intitulé : « Impact de la transplantation de microbiote fécal chez des patients atteints de rectocolite hémorragique : étude randomisée et contrôlée (REBALANCE-UC) », coordonné par le Professeur Harry Sokol, gastro-entérologue à l'hôpital Saint-Antoine à Paris.

Cet essai clinique étudie l'efficacité de la transplantation de microbiote fécal chez des patients atteints de rectocolite hémorragique en rémission sous traitement conventionnel (corticothérapie).

L'AP-HP se charge pour cet essai clinique, à la fois du recrutement et du suivi des patients dans 11 centres associés différents (total de patients randomisés attendus = 126) ainsi que du recrutement et du suivi des donneurs volontaires sains dans 1 centre uniquement : le LRIPH du CRC-Est (Lieu de Recherche Impliquant la Personne Humaine du Centre de Recherche Clinique, Paris est) à l'hôpital Saint-Antoine.

En vue d'utiliser des dons de selles pour de la transplantation de microbiote fécal chez des patients, les donneurs volontaires sains participants à la recherche, sont soumis à un bilan de dépistage complet (sang et selles) selon les recommandations de l'ANSM.

Parmi les différents microorganismes recherchés, notre CNR est le centre expert pour la recherche de *Campylobacter sp.*

La technique de référence demandée par l'ANSM est la méthode de recherche par ELISA. La recherche de *Campylobacter sp* à effectuer pour chaque bilan de dépistage, est réalisée en parallèle par une méthode de PCR spécifique et par une méthode de culture à partir des échantillons de selles.

Ce protocole permet d'étudier et de faire évoluer les connaissances actuelles sur les techniques de diagnostic à utiliser pour le dépistage *Campylobacter sp* et notamment de placer la PCR dans ce contexte.

Nous avons reçu en 2019 42 demandes, correspondant à 23 donneurs, de recherche par culture-ELISA et PCR temps réel de *Campylobacter* dans les selles dans le cadre de ce protocole : seule 1 selle a été trouvée positive à *Campylobacter* et par PCR seulement. L'âge moyen des donneurs était de 23 ans.

3.1.2-Description du réseau de partenaires *Helicobacter pylori*

En 2019, le CNR a reçu 1876 prélèvements : 129 tests respiratoires provenant de 6 hôpitaux : dept 33-CHU Bordeaux (n=36) et CH Libourne (n=2), dept 75-Hôpital Cochin (n=17), Hôpital Saint Antoine (n=3) et Hôpital Armand Trousseau (n=23), dept 51-CHU Reims (n=45), autres (n=3)) et 1747 prélèvements (+4,3%) (cf tableau ci-dessous) pour recherche de *H. pylori*. Les prélèvements provenaient du CHU de Bordeaux et de 32 hôpitaux français. Nous avons reçu des prélèvements de 13 laboratoires privés, 5 polycliniques, 3 cliniques et 1 cabinet de gastroentérologie. La carte de France ci-dessous (Figure 2) montre la répartition par département des prélèvements reçus en 2019 au CNR (tests respiratoires inclus) pour recherche d'infection à *H. pylori*. Nos correspondants étaient répartis sur 28 départements en 2019 versus 30 en 2018.

Prélèvements	2018	2019
Biopsies	1663 (99,3%)	1728 (98,9%)
Souches	3 (0,2%)	12 (0,7%)
Selles	9 (0,5%)	7 (0,4%)
Autres	0 (0%)	0 (0%)
Total	1675	1747

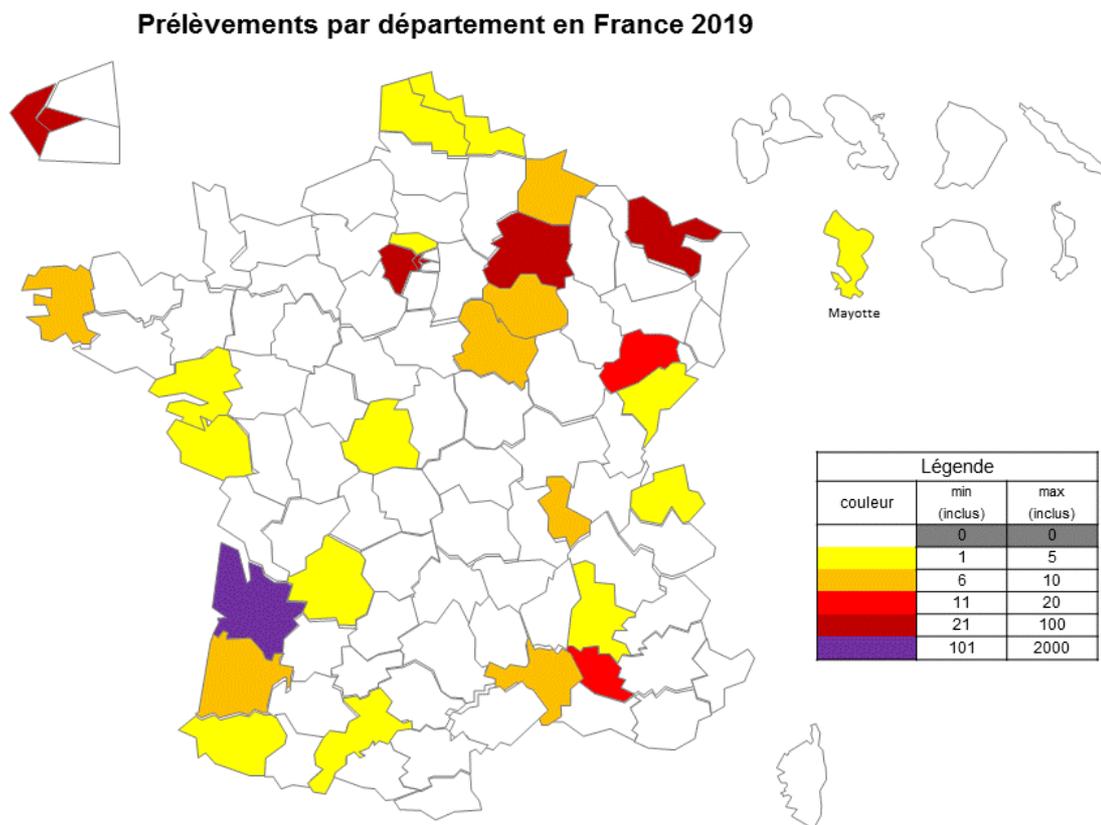


Figure 2. Répartition par département des biopsies gastriques et des tests respiratoires reçus au CNR en 2019 pour recherche d'infection à *Helicobacter pylori*. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de prélèvements (n=1876 au total).

-Evolution du réseau par rapport à l'année 2018 :

Par comparaison à 2018, notre activité concernant la recherche de *H. pylori* par culture et PCR a continué sa progression.

	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb. en 2018	205	1470	1675
Nb. en 2019	145	1602	1747
Évolution en %	-29,3%	+9%	+4,3%

Cette augmentation de notre activité est liée à celles des correspondants externes au CHU de Bordeaux qui représentent 91,8% en 2019 contre 87,8% en 2018.

Ceci est dû à deux facteurs :

-une augmentation très importante de l'activité d'endoscopie digestive de deux cliniques privées sur Bordeaux et sa périphérie (Polyclinique de Bordeaux et Clinique des Quatre Pavillons) qui nous envoient leurs biopsies par l'intermédiaire des laboratoires privés gérant leurs prélèvements.

-une diminution de l'activité d'endoscopie digestive au CHU de Bordeaux (réalisée au Centre Médico Chirurgical Magellan, hôpital Haut-Lévêque).

Nous recevons essentiellement des biopsies gastriques (98,9%), rarement des souches isolées ou des selles (respectivement 0,7% et 0,4%). Nous réalisons dans la majorité des cas des cultures associées à une PCR de détection de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance aux macrolides. Sur les selles, ou en cas de non-respect des conditions de transport des biopsies gastriques rendant impossible toute culture, la PCR seule est réalisée. La culture a parfois été réalisée seule (sans PCR associée) à cause de problèmes techniques. Ceci est stable par rapport à 2018.

Nombre d'analyses (par technique)	2018	2019
Culture + PCR	1647 (98,3%)	1732 (99,1%)
PCR seule	20 (1,2%)	9 (0,5%)
Culture seule	8 (0,5%)	6 (0,3%)
Total (Culture et/ou PCR)	1675	1747

Si l'on se base sur les résultats de la culture et/ou de la PCR, un quart environ des prélèvements sont positifs pour *H. pylori*. Ceci est stable par rapport à 2018.

Nombre d'analyses	HP positif 2018	HP positif 2019
Par culture et PCR	459/1647 (27,9%)	488/1732 (28,2%)
Par PCR seule	4/20 (20%)	3/9 (33,3%)
Par culture seule	1/8 (12,5%)	4/6 (66,7%)
Total	464/1675 (24,7%)	495/1747 (28,3%)

Le nombre de tests respiratoires reçus en 2019 est en augmentation de 12,5% *versus* 2018.

3.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *Campylobacter sp* et bactéries apparentées

Les données seront présentées de manière globale en intégrant les données des réseaux Campy.HOP, Campy.COM et Campy.Internet. Les différences notables entre ces réseaux seront notées si besoin pour chaque sous-section.

- Résultats globaux :

Nombre de souches répertoriées (viables ou non) : 8398*

Nombre de souches ayant pu être étudiées dans les locaux du CNR : 4561**

503 souches/4561 (11,03%) n'ont pas donné de subcultures soit 4058 souches viables. Cette proportion est en légère augmentation par rapport à 2018 (8,9%).

*(3837 saisies en ligne pour le réseau Campy.Internet), **dont 46 double populations (mélange de souches d'antibiogrammes différents ou d'espèces différentes)

- Répartition par espèce et par nature de prélèvements :

Cette répartition est basée sur 7895 isolats (viables et en incluant les doubles populations).

Les trois principales espèces répertoriées sont *C. jejuni* (83,4%), *C. coli* (13,6%) et *Arcobacter butzleri* (1,1%). *C. fetus* arrive en 4^{ème} position en 2019 (1,0%) (Tableau 1 et Tableau 2). *C. jejuni* et *C. coli* sont majoritairement isolés de selles : 98,9% et 99% respectivement. *C. jejuni* dépasse pour la troisième année consécutive en nombre absolu *C. fetus* comme première espèce isolée de flacons d'hémocultures même si cela ne concerne que 1% des isolats de *C. jejuni* versus 59,3% des *C. fetus*. *A. butzleri* est majoritairement isolé de selles (97,6%). Les isolats de *C. lari* et *C. upsaliensis* sont rares, majoritairement isolés de selles (respectivement 100% et 83,3%). *C. upsaliensis* a été isolé dans 16,7% des cas d'hémoculture. Huit *Helicobacter sp* (*H. pullorum*, 2 *H. cinaedi*, 1 *H. canadensis*) sont répertoriés en 2019. Nous observons également en 2019 une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 25 espèces rares ou non identifiées : 5 *C. ureolyticus*, 5 *C. curvus*, 4 *C. hyointestinalis*, 4 *C. rectus*, 3 *Campylobacters sp* (en provenance du réseau Campy.Internet), 1 *C. concisus*, 1 *C. ornithocola*, 1 *C. gracilis* et 1 *C. armoricus*.

La proportion de *C. fetus* diffère en fonction des réseaux : elle est de 3,03% pour le réseau Campy.HOP alors qu'elle n'est que de 0,34% pour le réseau Campy.COM.

La proportion de souches invasives de *C. jejuni* est également plus importante au sein du réseau Campy.HOP, 2,57%, contre 0,23% pour Campy.COM.

Lorsque l'information était disponible, nous avons relevé 54 discordances (contre 18 cas seulement en 2018) entre l'identification fournie par le correspondant et celle du CNRCH obtenue par MALDI-TOF Bruker. Tous ces cas ont été signalés sur le compte rendu de résultats et sont pour la plupart des discordances liées à l'utilisation d'automate d'identification en milieu liquide automatisé type Vitek-2 (bioMérieux). Les rares discordances réelles entre l'identification obtenue par MALDI-TOF Bruker au CNRCH et MALDI-TOF Vitek-MS (bioMérieux) seront investiguées en 2020 par séquençage des génomes correspondants (cf projet 2020).

Discordances	54
<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	38
<i>C. jejuni</i> / <i>C. fetus</i>	3
<i>C. jejuni</i> / <i>A. butzleri</i>	2
<i>C. fetus</i> / <i>C. coli</i>	1
<i>C. coli</i> / <i>A. butzleri</i>	9
<i>C. coli</i> / <i>C. upsaliensis</i>	1

- Répartition mensuelle des souches isolées :

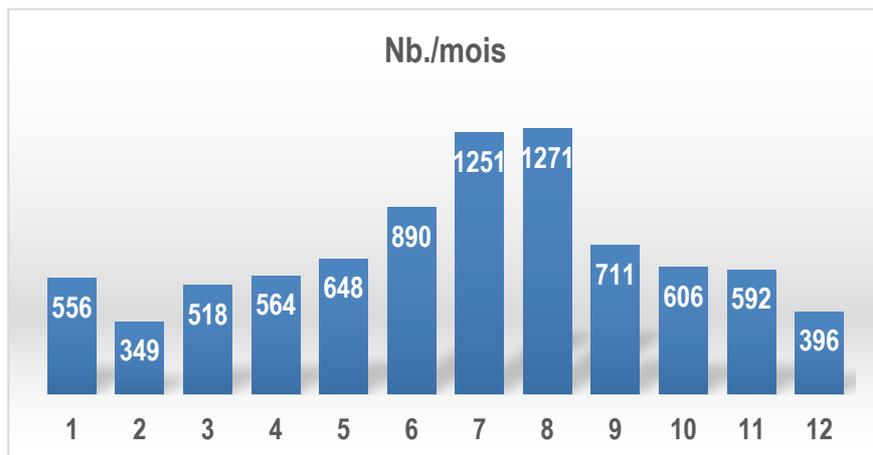
Tableau 1 : Répartition par espèce et par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2019. Huit *Helicobacter sp* (5 *H. pullorum*, 2 *H. cinaedi*, 1 *H. canadensis*) sont répertoriées en 2019. Nous observons également en 2019 une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 25 espèces rares ou non identifiées : 5 *C. ureolyticus*, 5 *C. curvus*, 4 *C. hyointestinalis*, 4 *C. rectus*, 3 *Campylobacter sp* (en provenance du réseau Campy.Internet) ,1 *C. concisus*, 1 *C. ornithocola*, 1 *C. gracilis*, 1 *C. armoricus*.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sang	65	10	48	0	2	0	0	5	2	132
Selles	6515	1063	25	17	10	81	8	13	6	7738
Biopsie	3	1	1	0	0	0	0	0	0	5
Abcès & pus	0	0	0	0	0	1	0	6	0	7
Liquide	4	0	4	0	0	1	0	0	0	9
Autres	0	0	3	0	0	0	0	1	0	4
Total	6587	1074	81	17	12	83	8	25	8	7895
%	83,4	13,6	1,0	0,2	0,2	1,1	0,1	0,3	0,1	100,0

Tableau 2 : Répartition en pourcentage des espèces par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2019.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Moy %
Sang	1,0	0,9	59,3	0,0	16,7	0,0	0,0	20,0	25,0	1,7
Selles	98,9	99,0	30,9	100,0	83,3	97,6	100,0	52,0	75,0	98,0
Biopsie	0,0	0,1	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Abcès & pus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	24,0	0,0	0,1
Liquide	0,1	0,0	4,9	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1
Autres	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,1

Le graphique ci-dessous indique le nombre de souches répertoriées au cours de l'année 2019 pour l'ensemble des réseaux.



Ces données confirment la saisonnalité habituelle des infections à Campylobacters. Même si nous recevons des souches tout au long de l'année, les mois de Mai à Septembre regroupent 57,1% des souches répertoriées en 2019.

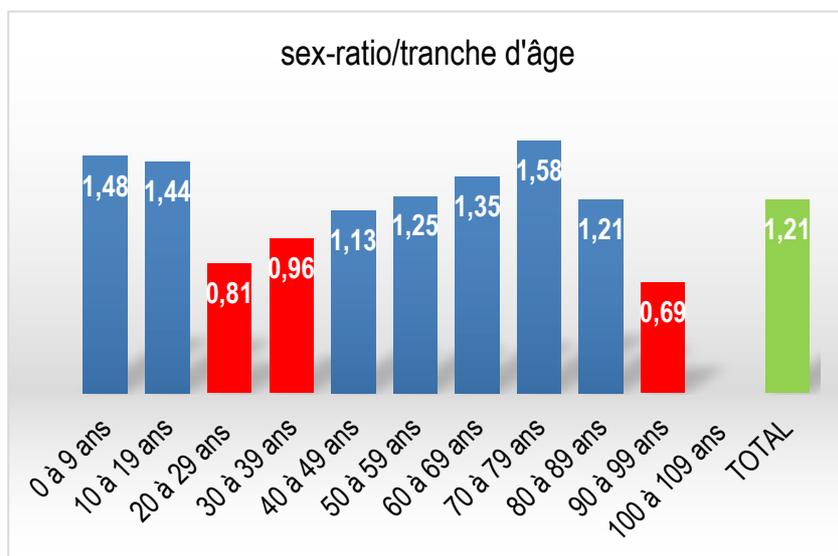
- Répartition par sexe :

Les chiffres ci-dessous tiennent compte des 8352 souches répertoriées viables.

Sexe féminin	3783	45,29%
Sexe masculin	4569	54,71%

La prédominance masculine est toujours marquée (sex-ratio H/F : 1,21 en moyenne).

Cette répartition est valable pour de nombreuses tranches d'âge sauf pour les 20-29 ans, 30-39 ans et 90-99 ans. Ceci témoigne notamment de l'exposition plus fréquente des femmes lorsqu'elles sont en âge d'avoir des enfants.



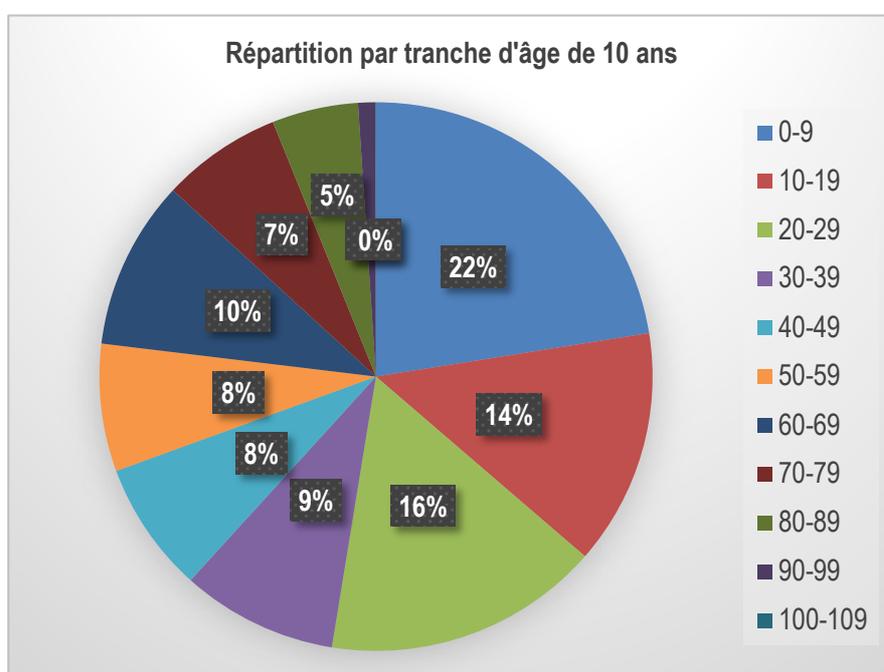
- Répartition par âge :

Catégories d'âges :

	COM	%	HOP	%	TOTAL	%
Adultes, ≥ 15 ans	4725	73,2	1297	66,7	6023	71,7
Enfants, < 15 ans et ≥ 1 an	1627	35,2	535	27,5	2163	25,7
Nourrissons < 12 mois et ≥ 1 mois	82	1,3	98	5,0	180	2,2
Nouveaux nés < 1 mois	17	0,3	15	0,8	32	0,4
Total (Nb.)	6451		1945		8398	

Les infections à *Campylobacter* touchent toutes les tranches d'âge avec 28,2% de cas pédiatriques (< 15 ans). La proportion de nourrissons (< 12 mois) est plus importante au sein du réseau Campy.HOP (5,05% versus 1,28%).

Tranches d'âges :



La tranche d'âge 0-29 ans représente 51,79% des infections à *Campylobacter sp.*

La répartition en pourcentage par tranches d'âge et au sein des deux réseaux est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109
Total (%)	21,86	13,69	16,24	10,03	7,64	7,78	9,14	7,42	5,08	1,11	0,01
Campy .COM	20,43	13,73	16,75	11,03	8,47	8,28	9,33	6,85	4,27	0,86	-
Campy .HOP	<u>26,58</u>	13,55	14,53	6,75	4,89	6,13	9,14	<u>9,33</u>	<u>7,73</u>	<u>1,96</u>	<u>0,05</u>

La proportion de cas âgés (supérieurs à 70 ans) est plus élevée au sein du réseau Campy.HOP, et comme évoqué ci-dessus la proportion de cas pédiatriques (0-9 ans) également (données grisées dans le tableau ci-dessus).

- **Répartition en fonction du type de malade** : Les données présentées ci-dessous concernent le réseau Campy.HOP, Campy.COM et Campy.Internet (soit 8352 cas).

Hospitalisation	n=2012	24,1%
Consultation	n=5356	64,1%
Non précisé	n=984	11,8%

- **Voyage à l'étranger** : Une notion de voyage à l'étranger a été renseignée (Oui/Non) dans 3975 cas sur 8352 cas. Le pays, ou la région du monde, a été précisé dans 406 cas. Les principales régions concernées étaient l'Europe, l'Afrique et l'Asie (cf tableau ci-dessous).

Régions du monde	Nombre de cas	Détails
Europe	143	dont Espagne (36), Portugal (17), Italie (21)
Afrique	124	dont Afrique du Nord (97)
Asie	42	
Caraïbe	20	
Proche et Moyen Orient	21	
Inde Indonésie	15	
Amérique du Sud et Centrale	15	
Amérique du Nord	11	
Océanie	5	
Iles de l'océan indien	9	
Autres	1	
TOTAL	406	

- **Contexte épidémique** :

Cas isolés	4737	56,72%
Cas groupés	192	2,30%
Non précisé	3423	40,98%

*147 cas familiaux (76,56%), 18 cas en collectivités (9,38%), 27 non renseignés (14,06%).

Les infections à *Campylobacters* et bactéries apparentées sont donc principalement des cas isolés (lorsque l'information est disponible). Les cas groupés sont essentiellement familiaux, 61% d'entre eux surviennent entre mai et septembre. En 2019, 9 cas groupés (8 à *C. jejuni*, 1 à *C. coli*) ayant concernés de 2 à 3 malades (8 cas familiaux, 1 cas de TIAC) ont été confirmés par RAPD.

- **Origine supposée de la contamination** : L'origine alimentaire supposée de la contamination était précisée dans 198 cas sur 8352, 2,37% contre 1,9% l'an dernier, (161 *C. jejuni*, 35 *C. coli*, 1 *A. cryaerophilus*, 1 *C. fetus*) et provenait majoritairement de la viande (29,2% dont 18,2% de la volaille) et des plats préparés en restauration (19,2%). Pour 9 des 17 cas (52,9%) d'infections à *C. lari* (cf Tableau 1), espèce classiquement retrouvée dans le tube digestif des oiseaux côtiers (mouettes, sternes, etc...), le code postal du laboratoire expéditeur correspond effectivement à un département côtier laissant supposer une contamination possible *via* ces fientes d'oiseaux.

3.2.2-Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections à *H. pylori*

-Répartition par classe d'âge et sex-ratio des patients positifs à *H. pylori* (culture et/ou PCR)

Nb. patients (<i>H. pylori</i> positifs)	0-9 ans	10-19 ans	20-29 ans	30-39 ans	40-49 ans	50-59 ans	60-69 ans	70-79 ans	80-89 ans	90-99 ans	Total
Hommes	5	4	13	40	47	38	32	20	5	0	204
Femmes	4	17	19	50	59	64	46	18	8	2	287
Total	9	21	32	90	106	102	78	38	13	2	491
sex-ratio H/F	1,25	0,24	0,68	0,80	0,80	0,60	0,70	1,11	0,62	/	0,71

La moyenne d'âge des cas positifs est de 48,5 ans. Cependant, la majorité des cas positifs (74,1%) a entre 30 et 69 ans, majoritairement des femmes dans la quasi intégralité des tranches d'âge.

-Pour les 129 tests respiratoires reçus en 2019, le sex-ratio H/F (tous résultats confondus) était de 1,13 et la moyenne d'âge de 41,6 ans.

-Corrélation Culture et PCR

La culture de *H. pylori* est réalisée sur gélose sélective *H. pylori* préparée au CNR et sur gélose commerciale Pylori (bioMérieux). La PCR est réalisée selon la technique publiée en 2003 (Oleastro M *et al.*, J Clin Microbiol). Nous avons fait évoluer notre PCR maison et utilisons depuis mars 2019 des barrettes préparées par Eurogentec et prêtes à l'emploi comme indiqué plus haut.

La concordance entre culture et PCR est montrée ci-dessous pour 2018 et 2019.

Culture	PCR	Nombre d'analyses 2018	Nombre d'analyses 2019
+	+	398/1647 (24,2%)	415/1732 (24,0%)
-	+	61/1647 (3,7%)	73/1732 (4,2%)
-	-	1188/1647 (72,1%)	1244/1732 (71,8%)

La culture de *H. pylori* a sous-estimé 15% des infections par rapport à la PCR (*versus* 13,3% en 2018). Ce résultat témoigne de l'intérêt de contrôler les conditions analytiques et préanalytiques. Nous préconisons en effet les transports internes et externes au CHU de Bordeaux en milieu de transport (Portagerm Pylori, bioMérieux) de manière systématique.

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

3.3.1-Surveillance de la résistance des Campylobacters et bactéries apparentées aux anti-infectieux

Tous les antibiogrammes ont été réalisés selon les recommandations du CA-SFM : milieu MH-F 5% sang de mouton, inoculum 0,5 McF, écouvillonnage, incubation à 35°C en atmosphère microaérobie en jarre (génération d'atmosphère à l'aide d'un Anoxomat (Smart)). La lecture à 24h (ou 48h) a été effectuée à l'aide de l'automate SIRScan (société I2A) puis vérification visuelle des diamètres lus à la caméra. La majorité des antibiogrammes est réalisée par la méthode de diffusion en disque (société BioRad). Des déterminations de CMI par Etest peuvent être réalisées si besoin. Lors de la validation, toute discordance avec le résultat signalé par le correspondant est vérifiée et si besoin indiquée

sur le compte rendu final.

Un CQ est effectué à chaque changement de lot de gélose MH-F. Une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb. Un biologiste vérifie systématiquement les valeurs lues.

Les pourcentages de résistance signalés (Tableaux 3-8) tiennent compte des valeurs de diamètres critiques ou concentrations critiques telles que définies dans le CA-SFM 2019. Nous indiquons les résultats obtenus pour les principales espèces identifiées en 2019 : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. lari* et *Campylobacter sp.* Les distributions de diamètres pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* sont présentées dans les Figures 3 et 4. Pour *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* (Tableaux 3-8) nous présentons seulement les résultats pour l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ciprofloxacine et la gentamicine. Les valeurs utilisées sont celles des Entérobactéries (cf CA-SFM 2019). En l'absence de « cut-offs » épidémiologiques adaptés pour catégoriser l'érythromycine et la tétracycline, ces données ne sont pas présentées dans ce rapport. Les distributions de diamètres d'inhibition pour *Arcobacter sp* sont présentées Figure 5.

Les valeurs obtenues pour les réseaux Campy.COM et Campy.HOP (en incluant pour chacun les données Campy.Internet) sont affichées ainsi que l'estimation générale de résistance pour chaque molécule testée. Dans ce calcul, seules sont considérées les valeurs des souches reçues viables au CNR ou renseignées pour les deux réseaux. La présentation des deux réseaux simultanément permet de comparer les pourcentages de résistance entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP.

La résistance à l'ampicilline reste stable pour *C. jejuni* (32,3%) et *C. coli* (27,2%) : comme par le passé, la résistance est plus élevée chez *C. jejuni*. *C. fetus* reste très sensible. Ceci est conforme aux années précédentes, tout comme la quasi absence de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique excepté chez les bactéries du genre *Arcobacter*.

La résistance à la ciprofloxacine dépasse 50% pour *C. jejuni* et approche les 62% pour *C. coli*. Il n'y a pas de différence entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP. La résistance de *C. fetus* à la ciprofloxacine augmente en 2019 soit 27,2% versus 24% en 2018 et 20% en 2017.

La résistance à l'érythromycine reste à un niveau inférieur à 1% pour *C. jejuni*, *C. coli* étant comme par le passé plus résistant mais en 2018 et 2017 à un niveau inférieur à 10% (7,3% en 2019). Les souches de *C. coli* du réseau Campy.HOP sont plus résistantes (6,8%) que celles du réseau Campy.COM (7,4%)

La résistance à la tétracycline reste à un niveau très élevé notamment pour *C. coli* (75,6%) et semble stagner pour *C. jejuni* (46,3%).

La résistance à la gentamicine reste anecdotique pour *Campylobacter sp* mais peut être rencontrée pour *C. jejuni* (0,3%), *C. coli* (1,3%) et *C. lari* (11,8%).

-Tendances évolutives sur une période de 33 ans (Figure 6)

La résistance de *C. coli* à la ciprofloxacine semble s'être stabilisée depuis 2009.

La résistance à la tétracycline semble se stabiliser depuis 2012 pour les 2 principales espèces.

La résistance à l'ampicilline s'est stabilisée depuis 2009.

Aucune évolution notable n'est identifiable pour la résistance à l'érythromycine qui reste sous les 10% pour *C. coli* depuis 2015.

Tableau 3. Résistance à l'ampicilline chez *Campylobacter sp*, *Arcobacter sp* et *Helicobacter sp*

Ampicilline										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	3340	592	21	1	2	17	3	6	1	3983
Intermédiaire	168	25	0	0	2	1	1	1	0	198
Résistant	1555	237	1	11	2	29	1	1	1	1838
Total	5063	854	22	12	6	47	5	8	2	6019
Résistance en %	30,7	27,8	4,5	91,7	33,3	61,7	20,0	12,5	50,0	30,5
Non testé C.COM	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	862	151	54	4	4	13	0	13	6	1107
Intermédiaire	43	7	1	0	2	1	0	1	0	55
Résistant	553	53	3	1	0	21	2	2	0	635
Total	1458	211	58	5	6	35	2	16	6	1797
Résistance en %	37,90	25,1	5,2	20,0	0	60,0	100,0	12,5	0,0	35,3
Non testé C.HOP	64	8	0	1	0	0	1	1	0	75
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	4202	743	75	5	6	30	3	19	7	5090
Intermédiaire	211	32	1	0	4	2	1	2	0	253
Résistant	2108	290	4	12	2	50	3	3	1	2473
Total	6521	1065	80	17	12	82	7	24	8	7816
Résistance en %	32,3	27,2	5,0	70,6	16,7	61	42,9	12,5	12,5	31,6
Non testé TOTAL	66	9	1	1	0	0	1	1	0	79

Tableau 4. Résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique chez *Campylobacter sp*, *Arcobacter sp* et *Helicobacter sp*

Amoxicilline-clav										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	5040	849	22	12	6	26	4	8	6	5973
Intermédiaire	3	4	0	0	0	0	0	0	0	7
Résistant	0	0	0	0	0	22	1	0	0	23
Total	5043	853	22	12	6	48	5	8	6	6003
Résistance en %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,8	20,0	0,0	0,0	0,4
Non testé C.COM	22	2	0	0	0	0	0	0	0	24
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	1519	217	58	5	6	21	2	15	2	1845
Intermédiaire	2	1	1	0	0	1	1	0	0	6
Résistant	0	0	0	0	0	13	0	0	0	13
Total	1521	218	59	5	6	35	3	15	2	1864
Résistance en %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,1	0,0	0,0	0,0	0,7
Non testé C.HOP	1	1	0	0	0	0	0	2	0	4
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	6559	1066	80	17	12	47	6	23	8	7818
Intermédiaire	5	5	1	0	0	1	1	0	0	13
Résistant	0	0	0	0	0	35	1	0	0	36
Total	6564	1071	81	17	12	83	8	23	8	7867
Résistance en %	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,2	12,5	0,0	0,0	0,5
Non testé TOTAL	23	3	0	0	0	0	0	2	0	28

Tableau 5. Résistance à la ciprofloxacine chez *Campylobacter sp*, *Arcobacter sp* et *Helicobacter sp*

Ciprofloxacine										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	2136	325	17	3	6	41	4	6	0	2538
Résistant	2921	530	5	2	0	7	1	2	1	3469
TOTAL	5057	855	22	5	6	48	5	8	1	6007
Résistance en %	57,8	62,0	22,7	40,0	0,0	14,6	20,0	25,0	100,0	57,7
Non testé C.COM	8	0	0		0	0	0	0	1	9
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	572	88	42	0	5	25	2	12	4	750
Résistant	950	131	17	12	1	10	1	4	2	1128
TOTAL	1522	219	59	12	6	35	3	16	6	1878
Résistance en %	62,4	59,8	28,8	100,0	16,7	28,6	33,3	0,0	33,3	60,1
Non testé C.HOP	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	2708	413	59	3	11	66	6	18	4	3288
Résistant	3871	661	22	14	1	17	2	6	3	4597
TOTAL	6579	1074	81	17	12	83	8	24	7	7885
Résistance en %	58,8	61,5	27,2	82,4	8,3	20,5	25,0	25,0	42,9	58,3
Non testé TOTAL	8	0	0	0	0	0	0	1	1	10

Tableau 6. Résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter sp* et *Helicobacter sp*

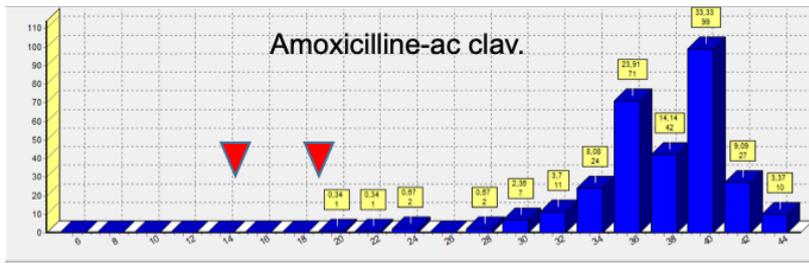
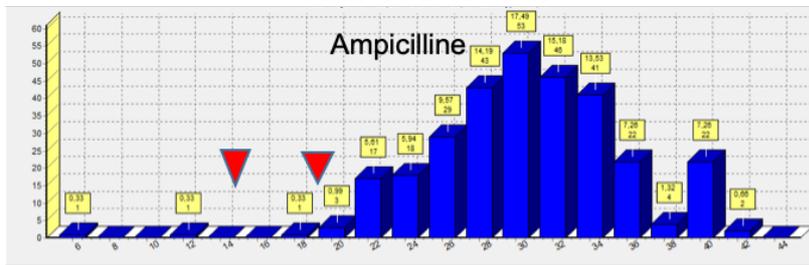
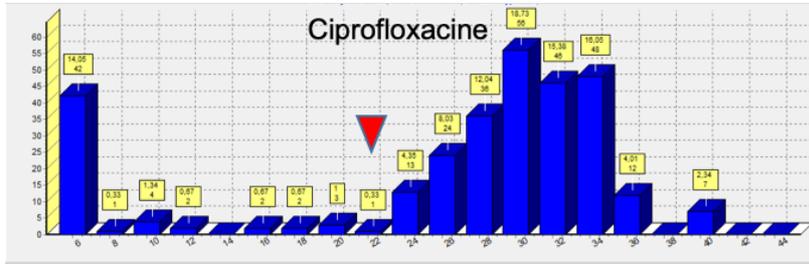
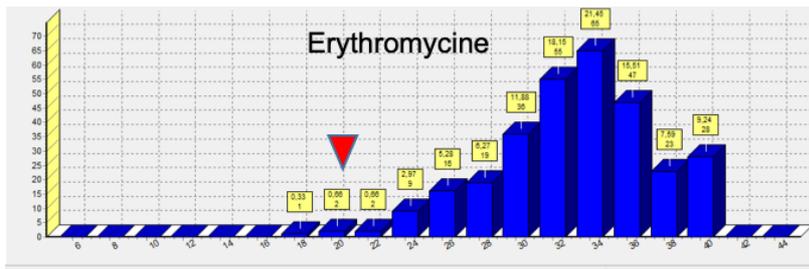
Erythromycine										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	5036	792	22	12	6			7	0	5867
Résistant	26	63	0	0	0			1	0	98
TOTAL	5062	855	22	12	6			8	0	5965
Résistance en %	0,5	7,4	0,0	0,0	0,0	non testé	non testé	12,5	non testé	1,6
Non testé C.COM	3	0	0	0	0	48	5	0	2	58
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	1513	204	57	5	6			14	0	1799
Résistant	8	15	2	0	0			2	0	27
TOTAL	1521	219	59	5	6			16	0	1826
Résistance en %	0,5	6,8	3,4	0,0	0,0	non testé	non testé	12,5	non testé	1,5
Non testé C.HOP	1	0	0	0	0	35	3	1	6	46
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	6549	996	79	17	12			21	0	7666
Résistant	34	78	2	0	0			3	0	125
TOTAL	6583	1074	81	17	12			24	0	7791
Résistance en %	0,5	7,3	2,5	0,0	0,0	non testé	non testé	12,5	non testé	1,6
Non testé TOTAL	4	0	0	0	0	83	8	1	8	104

Tableau 7. Résistance à la tétracycline chez *Campylobacter sp*, et *Helicobacter sp*

Tétracycline										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	2749	217	50	8	6			7	0	3037
Résistant	2305	637	9	4	0			1	0	2956
TOTAL	5054	854	59	12	6			8	0	5993
Résistance en %	45,6	74,6	15,3	33,3	0,0	non testé	non testé	12,5	non testé	49,3
Non testé C.COM	10	1	0	0	0	48	5	0	2	66
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	780	45	18	5	6			13	0	867
Résistant	741	174	4	0	0			3	0	922
TOTAL	1521	219	22	5	6			16	0	1789
Résistance en %	48,7	79,5	18,2	0,0	0,0	non testé	non testé	18,8	non testé	51,5
Non testé C.HOP	2	0	0	0	0	35	3	1	6	47
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	3529	262	68	13	12			20	0	3904
Résistant	3046	811	13	4	0			4	0	3878
TOTAL	6575	1073	81	17	12			24	0	7782
Résistance en %	46,3	75,6	16,0	23,5	0,0	non testé	non testé	16,7	non testé	49,8
Non testé TOTAL	12	1	0	0	0	83	8	1	8	113

Tableau 8. Résistance à la gentamicine chez *Campylobacter sp*, *Arcobacter sp* et *Helicobacter sp*

Gentamicine										
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	4441	759	21	10	6	48	5	8	2	5300
Résistant	11	12	0	2	0	0	0	0	0	25
TOTAL	4452	771	21	12	6	48	5	8	2	5325
Résistance en %	0,2	1,6	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
Non testé C.COM	613	76	1	0	0	0	0	0	0	690
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	1434	209	56	5	6	35	3	12	5	1765
Résistant	4	1	0	0	0	0	0	3	1	9
TOTAL	1438	210	56	5	6	35	3	15	6	1774
Résistance en %	0,3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	16,7	0,7
Non testé C.HOP	84	17	3	0	0	0	0	2	0	106
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Campylobacter sp</i>	<i>Helicobacter sp</i>	Total
Sensible	5875	968	77	15	12	83	8	20	7	7065
Résistant	15	13	0	2	0	0	0	3	1	34
TOTAL	5890	981	77	17	12	83	8	23	8	7099
Résistance en %	0,3	1,3	0,0	11,8	0,0	0,0	0,0	13,0	12,5	0,5
Non testé TOTAL	697	93	4	0	0	0	0	2	0	796



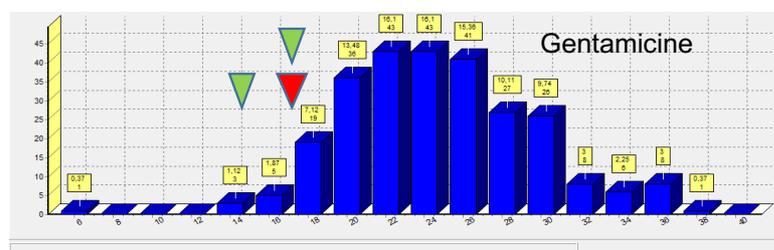
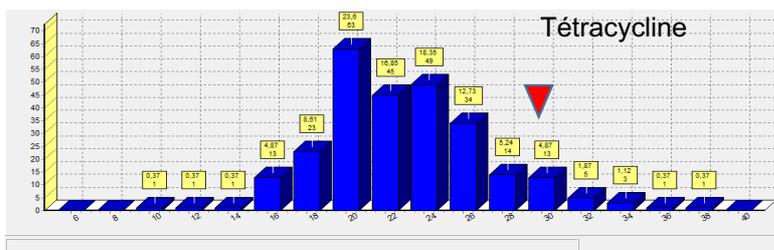
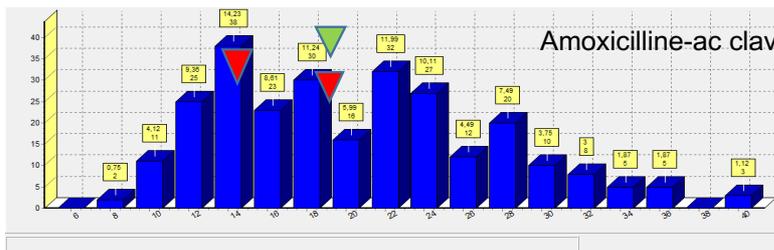
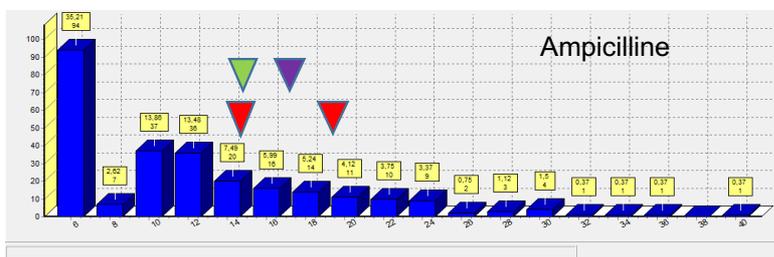
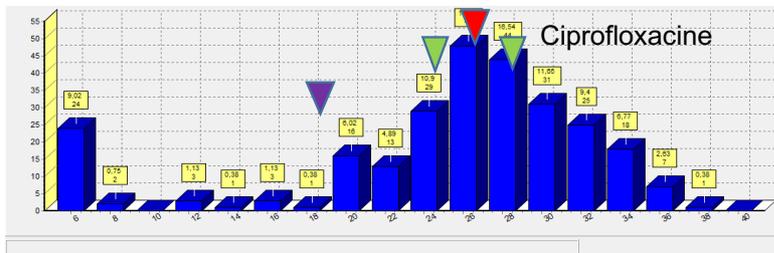


Figure 5. Distribution des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode des disques sur une série de 267 souches de *Arcobacter sp* isolées entre le 01/01/2015 et le 31/12/2019. La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque diamètre mesuré. La flèche rouge indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule des Campylobacters selon le CA-SFM 2019. La flèche verte indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule concernée des Entérobactéries selon le CA-SFM 2019. En bleu les cut-off que nous proposons pour interpréter la ciprofloxacine et l'ampicilline. Données issues de la base du SIRWeb.

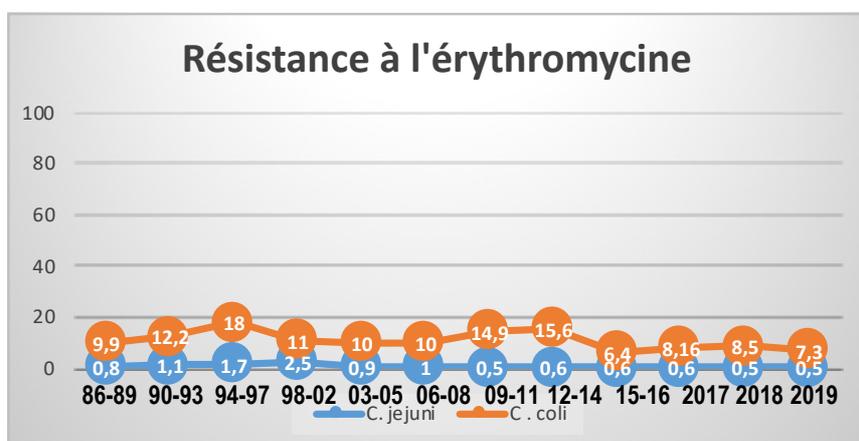
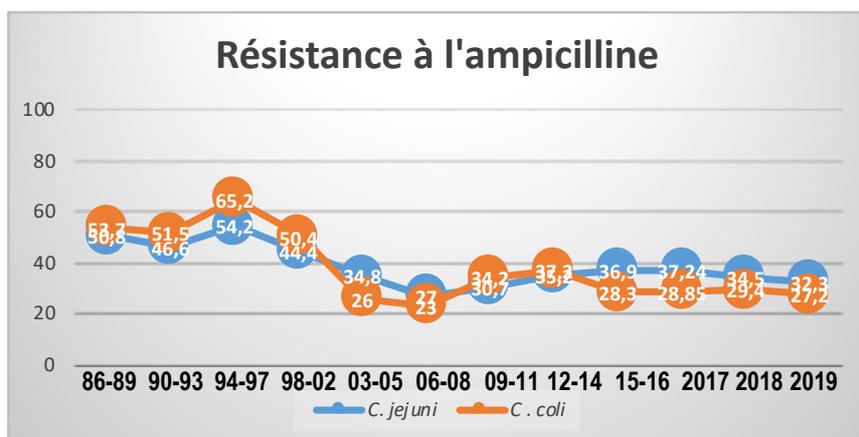
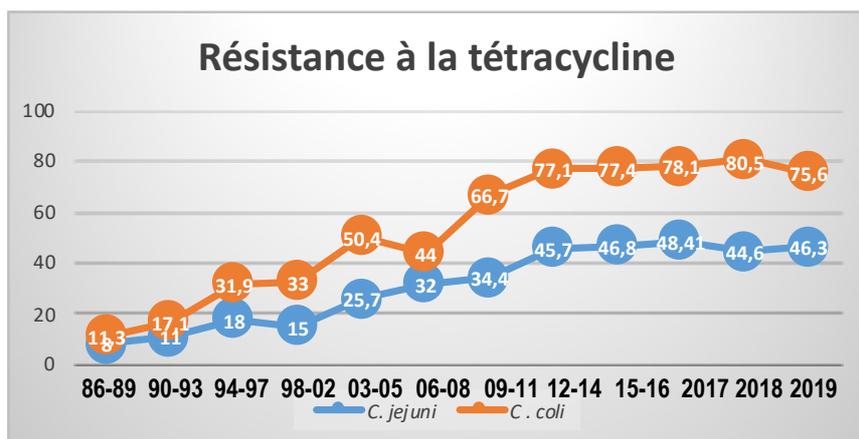
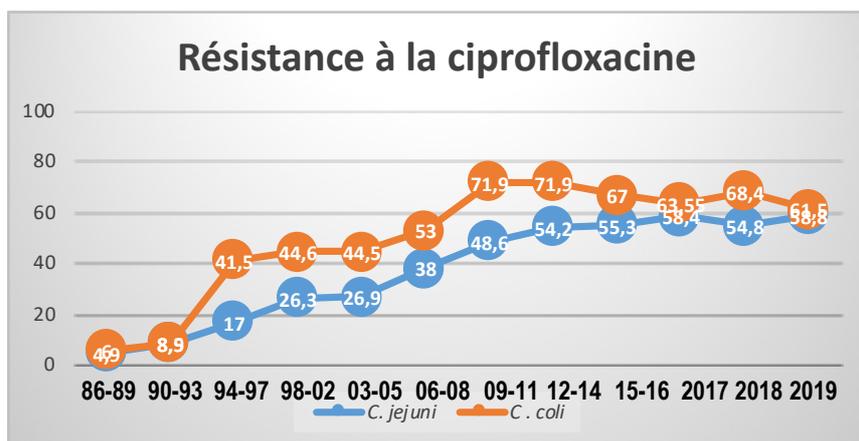


Figure 6 : Evolution de la résistance en France aux antibiotiques chez *C. jejuni* et *C. coli* sur une période de 33 ans. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

3.3.2-Surveillance de la résistance de *H. pylori* aux anti-infectieux

Tous les antibiogrammes ont été réalisés par Etest selon les recommandations du CA-SFM. Les milieux utilisés étaient pour 2019 soit le milieu MH-10% sang de mouton (préparé au CNR) soit la gélose Schaedler vit K1 (bioMérieux), avec un inoculum 3 McF, inondation, incubation à 35°C en atmosphère microaérobie dans une enceinte (Ruskin concept+). La lecture à 48h (ou 72h) est effectuée à l'œil nu par un technicien, puis contrôlée par un biologiste. Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode du Etest.

Un CQ est effectué à chaque changement de lot de gélose, une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb et dans un classeur d'archivage au CNRCH. Un biologiste vérifie systématiquement les valeurs lues.

La résistance globale de *H. pylori* estimée à partir des antibiogrammes est récapitulée dans le tableau ci-dessous. En 2019, sur les 416 souches de *H. pylori* détectées par culture, une seule n'a pas pu être testée à cause d'une subculture négative.

Molécule	2018 (Nb. et %R)	2019 (Nb. et %R)
Amoxicilline	8/398 (2%)	5/415 (1,2%)
Clarithromycine	133/398 (33,4%)	134/415 (32,3%)
Lévofloxacine	76/398 (19,1%)	86/415 (20,7%)
Métronidazole	241/398 (60,6%)	223/415 (53,7%)
Rifampicine	5/398 (1,3%)	7/415 (1,7%)
Tétracycline	0/398	2/415* (0,5%)

*1 souche présentant dans l'ADNr16S un codon GTA en position 926_928 associé à une CMI = 4 mg/L (cf ci-après), 1 souche avec un codon GGA associé à une CMI = 1,5 mg/L.

Conformément aux années passées, la résistance à l'amoxicilline, rifampicine et tétracycline est rare chez *H. pylori*. La résistance à la clarithromycine conditionne soit l'utilisation de cette molécule dans la stratégie thérapeutique soit les chances de succès thérapeutiques en cas de traitement empirique. Le tableau ci-dessous compare les résultats obtenus par Etest et ceux obtenus par PCR de détection des mutations associées à la résistance aux macrolides et ce pour 411 des 416 cultures positives (1 souche a été perdue après subculture, 4 souches où la PCR n'a pas été réalisée).

Phénotype clarithromycine	Génotype clarithromycine	2018 Nb. (%)	2019 Nb. (%)
Sensible	WT	253/397 (63,7%)	269/411 (65,5%)
	A2142-43G	0/397 (0%)	2/411 (0,5%)
	A2142-43G + WT	11/397 (2,8%)	9/411 (2,2%)
	A2142C + WT	1/397 (0,3%)	0/411 (0%)
Résistant	WT	2/397 (0,5%)	1/411 (0,2%)
	A2142-43G	95/397 (23,9%)	10/411 (25,3%)
	A2142C	0/397 (0%)	1/411 (0,2%)
	A2142-43G + WT	35/397 (8,8%)	25/411 (6,1%)

Les discordances sont rares entre phénotype et génotype : 0,7% uniquement de discordance majeure due à deux cas interprétés Sensible *in vitro* mais de génotype A2142-43G par PCR et un cas interprété Résistant *in vitro* mais de génotype WT par PCR.

Pour 9 cas, seule la population sensible a été retrouvée sur l'antibiogramme alors que la PCR a détecté la présence

d'une double population A2142-43G + WT. Ceci pourrait être interprété comme une discordance mineure (2,2%). Dans 25 cas, c'est la population résistante qui a été vue par culture alors que la PCR détectait une double population A2142-43G + WT. L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt en routine de coupler culture (avec antibiogramme) et PCR.

La résistance à la clarithromycine déterminée par PCR s'établit comme ceci.

Génotype	Nombre de patients (par génotype) en 2018 et %	Nombre de patients (par génotype) en 2019 et %
WT	296/463 (63,5%)	317/491 (64,6%)
A2142-43G	117/463 (25,3%)	130/491 (26,5%)
A2142C	0/463 (0%)	1/491 (0,2%)
A2142-3G + WT	51/463 (11%)	43/491 (8,8%)
A2142C + WT	1/463 (0,2%)	0/491 (0%)
Total Résistants Clarithromycine par PCR	169/463 (36,5%)	174/491 (35,4%)

Comme par le passé, la mutation A2142-43G est la plus fréquente. La proportion de double population (WT+R) baisse en 2019 *versus* 2018 (8,8% *versus* 11,2%). La mutation A2142C reste anecdotique en France.

De par la diminution importante de l'activité *H. pylori* du CHU (biopsies pour lesquelles nous pouvons récupérer les données cliniques et histologiques) nous avons mis en place courant 2018 une fiche de renseignements pour les correspondants extérieurs au CHU devant accompagner les biopsies gastriques envoyées au CNRCH. Grâce aux données collectées, nous pouvons estimer pour 2019 la résistance primaire aux antibiotiques pour les souches isolées de biopsies gastriques en routine au CNRCH.

Sur 491 biopsies positives, nous avons pu analyser 408 fiches de renseignements cliniques : 314 patients étaient naïfs (77%) de tout traitement d'éradication, 94 (23%) étaient en échec d'au moins un traitement.

Le pourcentage de résistance primaire aux macrolides était de 22,4% *versus* 58,5% en secondaire. Ces chiffres sont proches de ceux obtenus dans le protocole de surveillance PHARE du CNR (cf paragraphe 3.5).

Les pourcentages de résistance aux autres molécules ont été établis en nous basant sur la sensibilité *in vitro* (343 souches).

Antibiotique	Résistance primaire	Résistance secondaire
Clarithromycine	71/314 (22,4%)	55/94 (58,5%)
Lévofloxacine	43/263 (16,3%)	24/80 (30%)
Métronidazole	109/263 (41,4%)	59/80 (73,7%)
Tétracycline	1/263* (0,38%)	0/80 (0%)
Rifampicine	2/263 (0,76%)	3/80 (3,7%)
Amoxicilline	2/263 (0,76%)	0/80 (0%)

*présence du codon GTA en position 926_928 associé à une CMI = 4 mg/L. Ce codon n'avait jamais été décrit dans la littérature.

Nous disposons des renseignements cliniques associés à 163 patients détectés *H. pylori* positifs.

Pathologies	N (%)
Gastrite	76/163 (46,6%)
Epigastralgies	29/163 (17,8%)
Reflux gastro-oesophagien	11/163 (6,7%)
Dyspepsie	9/163 (5,5%)
Ulcère	6/163 (3,7%)
Carence martiale	6/163 (3,7%)
ATCD Cancer gastrique	4/163 (2,4%)
Douleurs abdominales	4/163 (2,4%)
Chirurgie bariatrique	3/163 (1,8%)
Oesophagite	3/163 (1,8%)
Lymphome de type MALT	1/163 (0,6%)
Autres	11/163 (6,7%)

Les données présentées ci-après montrent la répartition des CMI pour 1112 souches de *H. pylori* et intègrent celles de 2019 (Figure 7). Les « cut-offs » épidémiologiques utilisés pour interpréter les antibiogrammes de *H. pylori* semblent toujours adaptés. L'utilisation de la gélose Schaedler vit K1 n'a pas influencé la répartition des CMI.

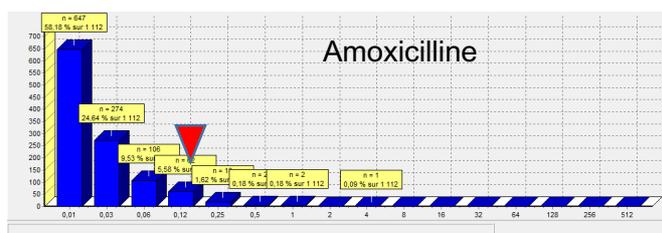
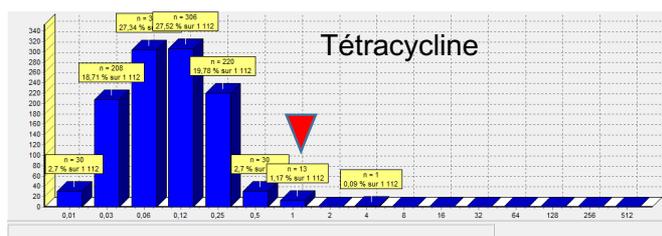
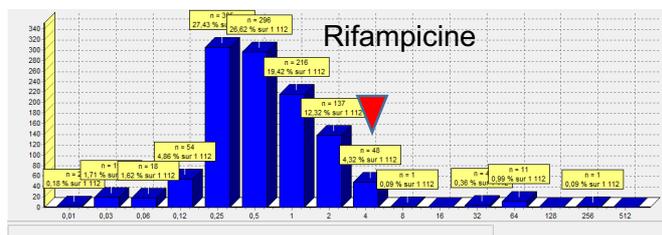
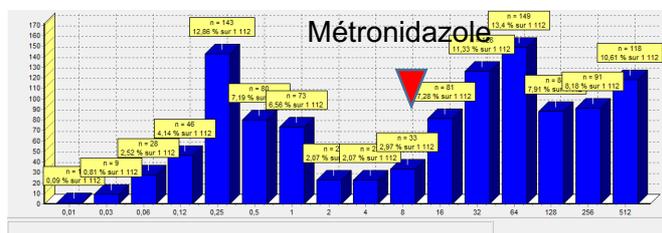
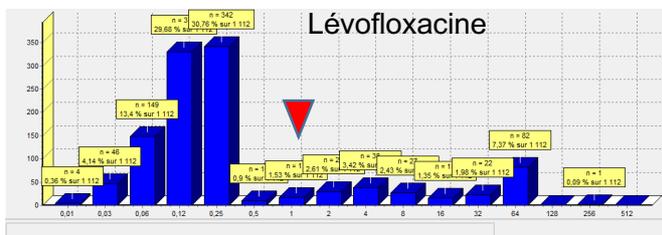
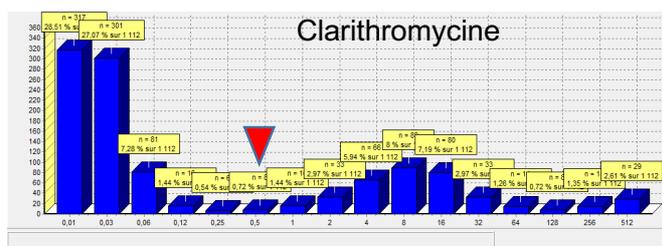


Figure 7. Distribution des CMI obtenues par la méthode du Etest sur une série de 1112 souches de *H. pylori* isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2019.
 La hauteur des histogrammes est proportionnelle au nombre de souches pour chaque CMI lue. La flèche rouge indique le «cut-off» épidémiologique d'interprétation pour chaque molécule selon le CA-SFM 2019. Données issues de la base du SIRWeb.

3.4.-Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Nous avons transmis, à la demande de Santé Publique France, nos bilans 2018 et 2019 des réseaux Campy.HOP, Campy.COM et Campy.Internet.

Les résultats de la surveillance ont été transmis par l'intermédiaire de l'ANSP au réseau Européen Enter-net après chaque trimestre.

3.5.-Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

-Etude PHARE.

L'étude PHARE avait pour but d'apprécier la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques sur un échantillon représentatif des souches françaises. Elle a été menée en 2014, 2016 et 2018. Les résultats préliminaires de la troisième phase ont été rapportés dans le bilan des activités de 2018. La fin des inclusions s'est terminée fin février 2019. Puis une vérification des données saisies a permis d'éliminer celles qui n'étaient pas en accord avec le protocole, et de rédiger le rapport final.

La troisième phase de l'étude a donc permis le recrutement de 951 patients adultes par 62 médecins, dont l'essentiel (78,6%) n'avaient jamais reçu de traitement d'éradication. Le nombre total de patients *H. pylori* positifs par culture était de 359 (37,7%) dont 244 n'avaient jamais reçu de traitement d'éradication.

Les résistances primaires observées ont été :

-clarithromycine	51	(20,9%)
-lévofloxacine	43	(17,6%)
-métronidazole	143	(58,6%)
-1 cas de résistance à la rifampicine		
-et aucun à l'amoxicilline et à la tétracycline		

Sept patients supplémentaires ont été trouvés positifs par PCR seule dont 4 parmi les non traités.

Les résistances pour les cas ayant déjà reçu un traitement d'éradication ont été :

-clarithromycine	63	(57,3%)
-lévofloxacine	25	(22,7%)
-métronidazole	96	(87,3%)
-1 cas de résistance à la rifampicine		
-et aucun à l'amoxicilline et à la tétracycline.		

Il est à noter qu'aucun patient en échec du traitement par Pylera (sur 73) n'a développé de résistance à la tétracycline.

Cette étude menée sur 5 ans montre une stabilisation de la résistance primaire à la clarithromycine (22,2%, 20,3% et 20,9% respectivement en 2014, 2016 et 2018). Elle montre également, au-dessus des valeurs permettant une utilisation sans test préalable, une augmentation de la résistance au métronidazole de 45,9% à 58,6% et une fluctuation de la résistance à la lévofloxacine (15,4%, 14,7% et 17,6% respectivement).

L'absence de résistance à l'amoxicilline et à la rifampicine est rassurante.

Les résultats ont été présentés au congrès de la RICAI en décembre 2019 et à la Journée du GEFH 2020. Ils ont été sélectionnés pour être présentés oralement aux Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et Oncologie Digestive 2020. Un résumé a été soumis aux Journées Nationales d'Infectiologie. Une publication est aussi prévue pour 2020.

-Protocole européen de surveillance de la résistance de *H. pylori* aux antibiotiques.

Cette étude avait pour but d'apprécier l'évolution de la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* dans la plupart des pays Européens. Elle a été menée en 1998, 2008 et 2018. Les résultats préliminaires de 2018 ont été rapportés dans le rapport des activités de 2018.

L'année 2019 a été consacrée à la vérification des données. D'abord en vérifiant l'absence de traitement d'éradication de *H. pylori* préalable, ce qui était un critère d'inclusion. Ceci a exclu 148 patients. Par ailleurs, un échantillon de 10% des souches pris au hasard, a été reçu et testé à nouveau pour vérification, incluant une PCR en temps réel pour la résistance à la clarithromycine, ainsi que par Etest toutes les souches supposées résistantes à l'amoxicilline et à la tétracycline. Les résultats de ce contrôle ont été satisfaisants. Les erreurs correspondaient en partie à des erreurs de transcription ou à des double populations pour la clarithromycine (mutant + souche sauvage) dont l'une seulement avait été détectée à l'antibiogramme. Quelques cas de résistance à l'amoxicilline ont été confirmés mais avec des CMI proches du seuil.

Les résultats finaux portent sur 1234 patients adultes inclus par 24 centres dans 18 pays.

Les taux de résistance obtenus avec les valeurs extrêmes sont les suivants :

-clarithromycine	21,3%	(5 - 36,9%)
-lévofloxacine	16%	(0 - 29,4%)
-métronidazole	39,1%	(6,1 - 67,5%)
-rifampicine	2%	(0 - 3,9%)
-amoxicilline	0,4%	(0 - 1,7%)
-tétracycline	0	(0)

L'évolution de la résistance durant ces 20 dernières années est significative pour la clarithromycine (9,9%, 17,5% et 21,3% pour 1998, 2008 et 2018 respectivement) ($p < 0,001$) et le métronidazole (33,1%, 34,9% et 39,1% respectivement) ($p < 0,01$). Ces résultats ont été présentés oralement au Congrès de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group et à l'United European Gastroenterology Week en 2019. Ils ont été sélectionnés pour l'European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases en 2020. Ils sont en attente de décision pour la Digestive Disease Week Américaine.

Il est prévu pour cette année 2020 de réaliser une étude multivariée sur les facteurs de risque de la résistance aux principaux antibiotiques ainsi qu'une corrélation entre résistance et consommation d'antibiotiques dans les différents pays Européens afin de conforter la publication finale.

-Surveillance des mutations présentes dans le gène *rpoB* associées à la résistance aux rifamycines chez *H. pylori*.

En 2019, le gène *rpoB* de 7 souches de *H. pylori* isolées au CNRCH ayant une CMI à la rifampicine supérieure à 4mg/L a été séquencé afin de déterminer les mutations responsables de cette résistance.

Souche	CMI rifampicine (mg/L)	Mutation <i>rpoB</i>	Commentaires
5104	>32	pas de mutation + L547F	double population
5118	>32	D530N	
5237	>32	D530N	
5249	>32	D530N	
5259	8	T588N	non décrite
5349	>32	Q527H	non décrite
5496	>32	T539A	non décrite

Les mutations les plus significatives sont celles présentes au niveau de l'acide aminé 530 (3 souches) : substitution d'un D par N. Une double population a été détectée par séquençage, avec une population sensible et résistante (mutation L547F).

Ces mutations sont connues et décrites (Heep M, *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jun;44(6):1713-5).

Pour 3 souches, des mutations non décrites –T588N, Q527H et T539A- ont été identifiées. Il est donc intéressant de continuer à surveiller les mutations responsables de la résistance à la rifampicine et à l'avenir, de tenter de démontrer par transformation bactérienne que ces nouvelles mutations sont bien associées à la résistance aux rifamycines.

-Evaluation des mutations associées à la résistance à l'amoxicilline chez *H. pylori*.

En 2018, 5 souches de *H. pylori* présentaient une CMI à l'amoxicilline supérieure à 0,125 mg/L, c'est-à-dire catégorisées résistantes : 0,19 mg/L (n=3), 0,75 mg/L (n=1) et 1,5 mg/L (n=1). Deux souches dont la CMI était de 0,125 mg/L ont également été étudiées.

Le gène *pbp1*, codant pour la « penicillin-binding protein », est connu pour être responsable de la résistance à l'amoxicilline, mais les mutations en cause sont nombreuses et mal déterminées. Les mutations présentes dans le gène *pbp1* de ces 7 souches ont donc été recherchées afin de vérifier le statut résistant et de faire un état des lieux des mutations.

Plusieurs mutations, considérées comme responsables, ont été décrites dans la littérature (Rimbara *et al.*, Microbiol. Immunol., 2007).

Ces mutations ont été retrouvées mais non représentées chez toutes les souches amoxicilline-R isolées au CNR :

- la mutation S414R a été retrouvée uniquement chez la souche avec une CMI à 0,75 mg/L
- la mutation S543R a été retrouvée chez 4 souches avec CMI à 0,125 ; 0,19 et 0,75 mg/L

- la mutation N562Y a été retrouvée chez 4 souches avec CMI à 0,125 ; 0,19 et 1,5 mg/L
- la mutation T593A/S a été retrouvée chez 6 souches avec CMI à 0,125 ; 0,19 ; 0,75 et 1,5 mg/L
- la mutation G595S a été retrouvée chez 4 souches avec CMI à 0,125 ; 0,19 et 1,5 mg/L

D'autres mutations non décrites ont été identifiées. L'insertion des deux acides aminés KD en 465 (non décrit) a été retrouvée uniquement chez une des souches avec une CMI à 0,19 mg/L. La mutation non décrite V469M/A a été retrouvée chez 4 souches avec CMI à 0,125 ; 0,19 ; 0,75 et 1,5 mg/L.

Les niveaux de CMI semblent être influencés par le nombre de mutations retrouvées au sein de *pbp1*. Au vu de la difficulté pour déterminer les mutations responsables de la résistance de *H. pylori* à l'amoxicilline, le génome d'une dizaine de souches amoxicilline R va être séquencé en 2020 pour tenter d'identifier d'autres supports génétiques de cette résistance.

Ces résultats sont à approfondir dans les années à venir pour d'autres souches amoxicilline-R.

-Collaboration avec IFREMER pour la caractérisation d'une nouvelle espèce du genre *Campylobacter* : *Campylobacter armoricus*.

Au cours d'une étude sur la prévalence et la diversité de *Campylobacter spp.* dans une zone de cueillette de mollusques et d'élevage en Bretagne, neuf isolats de *Campylobacter* uréase positif ont été identifiés comme appartenant au groupe *Campylobacter lari* par MALDI-TOF mais inclus dans un groupe distinct du genre *Campylobacter sp* de par la séquence du gène *atpA* déterminée après séquençage du génome entier. Cette position phylogénétique a été confirmée par l'analyse de la phylogénie des loci *ARNr 16S*, *rpoB* et *hsp60*. L'identité moyenne des nucléotides entre la souche représentative CA656T et la souche type du taxon le plus étroitement apparenté, *C. ornithocola* WBE38T et *C. lari* Slaughter Beach, était de 88,6%. Ces résultats suggèrent que les 9 isolats correspondent bien à une nouvelle espèce du genre *Campylobacter*.

Les souches de cette nouvelle espèce sont de forme spiralée, à Gram négatif, strictement microaérobies, non motiles. Elles ne forment pas de spores et présentent des activités de catalase, d'oxydase et d'uréase, sans réduction des nitrates.

Le CNRCH a finalisé en 2019 la caractérisation (biochimique, phénotypique, MALDI-TOF, microscopie électronique) de cette nouvelle espèce, la description de la séquence complète de son génome et de son annotation. Celui-ci fait 1 588 860 pb, a une teneur en G+C de 28,5% et code pour 1588 gènes, dont 38 sont des ARNt. Sur la base des caractéristiques rapportées ici, nous proposons la création d'une nouvelle espèce bactérienne, *Campylobacter armoricus sp. nov.*, et la souche CA656T comme souche type. Nous avons en particulier affiné les arbres basés sur les spectres obtenus par MALDI-TOF.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec :

¹ Ifremer, RBE-SG2M-LSEM, Laboratoire Santé Environnement Microbiologie, Plouzané, France ;

² Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Environmental Research and Innovation Department, Esch-sur-Alzette, Luxembourg ;

³ US Department of Agriculture, Produce Safety and Microbiology Research Unit, Agricultural Research Service, Albany, California, USA ;

⁴ Laboratoire de Médecine Vétérinaire (LMVE), Veterinary Services Administration, Dudelange, Luxembourg ;

⁵ Laboratoire National de Santé (LNS), Epidemiology and Microbial Genomics Unit, Dudelange, Luxembourg.

Un article scientifique a été publié en 2019 : Boukerb AM, Penny C, Serghine J, Walczak C, Cauchie HM, Miller WG, Losch S, Ragimbeau C, Mossong J, Mégraud F, Lehours P, Bénéjat L, Gourmelon M. Int J Syst Evol Microbiol. 2019 Dec;69(12):3969-3979. doi: 10.1099/ijsem.0.003836.

Nous avons intégré les profils protéiques de cette nouvelle espèce dans notre base MALDI-TOF (Bruker) ce qui nous permet d'identifier dorénavant cette nouvelle espèce sans confusion avec *C. lari* ou *C. ornithocola*. En 2019, 1 souche *C. armoricus* a été envoyée au CNR par un laboratoire de Loire Atlantique (44).

-Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* de produits d'origine naturelle sur *H. pylori* : Projet avec le laboratoire Solstarpharma

Dans ce projet, le laboratoire Solstarpharma (<https://www.solstarpharma.com/>) nous a proposé de tester *in vivo* une molécule naturelle, nommée artémisinine, encapsulée dans de l'amidon pour la rendre soluble, en parallèle à un extrait naturel de plante nommé NACINN.

L'artémisinine est actuellement largement utilisée dans le monde comme l'un des médicaments contre le paludisme. Les grandes études cliniques et les méta-analyses n'ont montré aucun effet secondaire grave chez l'homme. Des

recherches ont montré que, dans le passé, des thés médicinaux chinois contenant de l'artémisinine naturelle d'origine végétale étaient utilisés pour traiter diverses infections (par exemple comme antiparasitaires). Le composé NACINN est extrait de cannelle, il est approuvé par la FDA.

Les expériences menées avec des souris C57BL/6 infectées à 6 semaines de vie par la souche *H. pylori* premSS1 ont démontré :

-que l'amoxicilline utilisée comme témoin d'éradication n'était efficace chez la souris qu'en association avec un Inhibiteur de la pompe à proton (IPP) ;

-que les composés ARTE et NACINN permettaient de diminuer d'un log la charge bactérienne à condition également d'être administrés en association avec un IPP.

Les résultats étaient identiques en culture quantitative et PCR quantitative.

En conclusion, ces molécules naturelles pourraient être utilisées en complément des traitements antibiotiques.

Les conséquences de leur utilisation sur la composition du microbiote intestinal mériteraient d'être étudiées.

Projet avec le laboratoire Neteos

Le laboratoire Neteos possède une expertise dans le domaine des huiles essentielles, des terpénoïdes, des phénylpropanoïdes et de leurs dérivés (ou analogues). La société possède un savoir-faire et une expertise en matière d'expérimentation microbiologique *in vitro* et *in vivo* sur les composés cités ainsi que d'une façon générale sur les composés hydrophobes. La Société a développé et breveté un portefeuille de technologie en médecine humaine avec une nouvelle classe d'antibiotiques et de potentialisateur d'antibiotiques.

Le CNRCH a testé en 2019 l'efficacité d'un composé dénommé CIN pour éradiquer *H. pylori* dans un modèle animal de souris C57BL/6 infectées par la souche *H. pylori* premSS1, utilisée seule ou en association avec l'amoxicilline et/ou un IPP.

Comme pour le projet Solstarpharma ci-dessus, l'amoxicilline en combinaison avec un IPP confirme son activité. Le composé CIN102 en association avec IPP confirme son activité. La prolongation de la durée de traitement de 7 à 14 jours n'améliore pas l'efficacité du composé CIN102. L'association du CIN102 avec de l'amoxicilline n'a pas d'effet significatif.

-Évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* d'autres molécules à activité anti-*H. pylori* :

La résistance aux antibiotiques est une cause majeure des échecs croissants des thérapies d'éradication actuelles contre *H. pylori*. Dans ce scénario, la réutilisation des médicaments pourrait être une stratégie valable pour accélérer la mise au point de nouveaux agents antimicrobiens. Certains médicaments antihypertenseurs de classe dihydropyridine (DHP) ont la capacité d'inhiber un régulateur de réponse de *H. pylori*, HsrA, essentiel pour cette bactérie. Nous avons participé à un travail collaboratif (Dr Ángel Lanás, Aragon Institute for Health Research (IIS Aragón). Zaragoza, Spain) qui avait pour but de démontrer à la fois *in vitro* et *in vivo* les activités antimicrobiennes des traitements DHP contre *H. pylori*. Six médicaments de classe DHP incluant la nifédipine, la nifédipine, la nifédipine, la nimodipine, la nitrendipine et la lercanidipine, ont inhibé de manière notable l'activité de liaison à l'ADN de la HsrA. Ces médicaments ont montré des activités bactéricides puissantes contre les souches de *H. pylori* résistantes au métronidazole et à la clarithromycine, avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'ordre de 4 à 32 mg/L. Les traitements oraux avec 100 mg/kg/jour de formulations commercialisées de nimodipine ou de nitrendipine en association avec l'oméprazole, ont réduit de manière significative la colonisation gastrique de *H. pylori* chez la souris (évaluation par culture quantitative et qRT-PCR). Ces résultats suggèrent donc que ces composés pourraient constituer une nouvelle solution thérapeutique pour le traitement des infections à *H. pylori* résistantes aux antibiotiques.

Ce travail a été publié dans *Pharmaceutics* en 2019.

-Collaboration avec l'Institute of Medical Microbiology, University of Zurich (Dr K Wagner), afin d'évaluer les performances d'une stratégie NGS comparée aux techniques moléculaires classiques pour la détection des facteurs de virulence de *H. pylori*.

La détermination de la présence des différents facteurs de virulence de *H. pylori* repose sur l'amplification, suivie parfois d'un séquençage, des principaux facteurs de virulence (*cagPAI*, *vacA*, *oipA*, *hopZ*, etc...). Ceci peut se révéler long et sujet à interprétation. Le séquençage du génome entier (WGS) est récemment apparu comme un outil de diagnostic permettant de prédire de manière fiable non seulement la pharmaco-résistance des bactéries pathogènes mais aussi leur arsenal complet de gènes de virulence.

L'objectif de cette étude était double : premièrement, caractériser la diversité génétique des souches de *H. pylori* isolées de 41 patients atteints de gastrite non atrophique en Suisse. Et deuxièmement, évaluer la prévalence ainsi que la variation de séquence des facteurs de virulence de *H. pylori* (*cagA*, *vacA*, *iceA* et *dupA*) et des gènes

codant pour les protéines de la membrane externe (OMPs; *babA*, *babB*, *sabA*, *sabB*, *hopZ*, *hopQ* et *oipA*) dans leur ensemble par séquençage du génome (WGS) à l'aide d'une plateforme Illumina MiSeq.

Le WGS a identifié une grande diversité génétique dans les souches *H. pylori* analysées. La plupart des isolats de *H. pylori* a été attribuée à hpEurope (95,0%, 39/41) et les autres (5,0%, 2/41) à hpEastAsia, sous-population hspEAsia. L'analyse des facteurs de virulence a révélé que 43,9% des souches étaient *cagA*-positives, et l'allèle *vacA* s1 a été détecté dans 56,0% des isolats. La présence de *cagA* s'est avérée être significativement associée ($p < 0,001$) à la présence de *vacA* s1, *babA2* et à l'allèle 1 de *hopQ* ainsi qu'à l'expression de *oipA*.

Une approche WGS peut être utilisée pour une caractérisation rapide et détaillée des déterminants de la virulence chez *H. pylori*, fournissant des informations précieuses sur la capacité pathogène de la bactérie. Cela pourrait à terme conduire à un niveau plus élevé de traitement personnalisé et de prise en charge des patients souffrant d'infections associées à *H. pylori*.

Ce travail a été publié en juillet 2019 dans J Clin Med.

4-Alerte

Comme indiqué précédemment, les cas groupés sont rares pour les infections à Campylobacters. Nous signalons par email tout événement à notre correspondant Santé Publique France. Notre correspondant à Santé Publique France nous contacte également en fonction des éléments récupérés auprès des ARS.

En mai 2019 à Breuil-le-sec (dept, Oise), une épidémie d'origine hydrique est survenue et a été gérée par la Cellule Hauts-de-France. Quelques coprocultures avaient été réalisées au moment de l'épidémie et étaient positives pour *C. jejuni*. Aucune souche n'est parvenue au CNR.

En août 2019, le CNR a été contacté par SpFrance suite à une alerte émanant d'un médecin généraliste du département 54, signalant un nombre anormalement élevé de cas d'infections à *C. jejuni*. Ce signal a été traité par le CNR : en l'absence de laboratoires partenaires dans ce département, les activités des laboratoires des départements voisins ont été analysées. Aucun département n'a enregistré d'augmentation notable pendant le mois d'août par rapport à l'année précédente. Un pic saisonnier d'infections à Campylobacters est tout à fait habituel. Un rappel de ce type a été effectué auprès du médecin généraliste à l'origine de l'alerte.

En septembre 2019, dans le cadre d'une épidémie d'origine hydrique à Nantua (dépt. Ain), le CNR a été consulté suite à 2 prélèvements positifs en PCR syndromique pour *Campylobacter spp* en LABM. Malheureusement aucun de ces laboratoires n'ont conservé les souches ou effectué de mise en culture.

Notre système de saisie Campy.Internet et les requêtes réalisées sur le système informatique du laboratoire, nous permettent à la demande de vérifier tout phénomène inhabituel qui serait transmis immédiatement à Santé Publique France. Ces tâches sont depuis janvier 2018 dévolues au secrétariat du CNR.

Aucun événement majeur n'a été noté en 2019.

5-Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1.-Conseil et expertise aux professionnels de santé

-Liste des enseignements et des formations aux professionnels de santé

	P Lehours	F Mégraud	E Bessède
Journée scientifique des correspondants du CNRCH (septembre 2019)	Organisation-Intervenant	Intervenant	Intervenant
DIU de maladies infectieuses : cours sur les infections à Campylobacters et cours sur <i>H. pylori</i> (janvier 2019)	Intervenant	-	-

-Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

-Maya SARIEDDINE – Licence 3, Université de Bordeaux – 1 mois : réalisation d'antibiogrammes et PCRs sur souches de *H. pylori* dans étude européenne ;

-Hugo REYNAUD – BTS Bio analyses et contrôles au lycée Raoul Dautry Limoges – 1 mois + 2 mois et demi : validation des méthodes de l'identification par spectrométrie de masse MALDI TOF ;

-Carla ROCHE – BTS Bio analyses et contrôles au lycée Raoul Dautry Limoges – 2 mois et demi : validation des méthodes sur la PCR de détection de *H. pylori*.

-Accueil pendant 4 jours en novembre 2019 d'une technicienne du laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse pour une mise à niveau des compétences sur le diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

-Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Les biologistes du CNRCH ont rédigé en 2019 deux chapitres l'un sur *Helicobacter pylori* :

-J Raymond, P Lehours. *Helicobacter pylori* : notions fondamentales et épidémiologiques. EMC -Gastro-Entérologie 2019. Article 9-000-B-60.

-Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori*. In: Kuipers, EJ (ed.) Encyclopedia of Gastroenterology, 2nd edition. vol. 3, pp. 12-23. Oxford: Academic Press. Publié en 2020.

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

La diffusion des activités du CNR se fait non seulement par notre participation active aux congrès de microbiologie (spécialisés ou généralistes) et de gastroentérologie mais également via notre site internet (www.cnrch.fr) où le rapport annuel du CNR est disponible. Les modifications de la feuille de demande sont annoncées, la feuille est téléchargeable. Un extrait des recommandations du CA-SFM est accessible. La liste des publications les plus récentes est affichée également.

-Rétro-information aux partenaires

Chaque partenaire nous ayant informé ou sollicité pour une problématique apportant une lumière nouvelle sur le traitement ou le diagnostic des infections liées à notre CNR est remercié ou bien associé aux communications et publications (congrès ou articles).

Une journée des « correspondants » du CNR a été organisée à Paris (locaux de l'ANSIEM) en septembre 2019. Nous avons prévu les 25 et 26 mars 2020 sur Bordeaux respectivement des Travaux Pratiques sur Campylobacters et Hélicobacters et des conférences d'actualisation. Nous avons dû annuler ces journées à cause de l'épidémie du Coronavirus. Ces journées seront organisées gratuitement au deuxième semestre 2020 par l'équipe du CNR. Cette information sera diffusée par mail à tous les correspondants du CNR, aux membres du groupe AZAY, du colBVH et par le biais du syndicat des Jeunes Biologistes Médicaux. Ces journées ont été également annoncées sur notre site internet.

-Information/formation des professionnels de santé

Comme précédemment évoqué, notre site internet (www.cnrch.fr) est mis à jour le plus régulièrement possible. Une annexe décrivant les modalités d'accès et de fréquentation de notre site est intégrée à la fin de ce rapport.

-Les principales mises à jour du site internet en 2019 sont listées ci-dessous

-Mise à jour de la feuille de renseignements pour *Helicobacter pylori*.

-Mise à jour des modalités de transport des biopsies pour *Helicobacter pylori*.

-Mise en ligne d'une fiche technique sur la culture des Campylobacters et bactéries apparentées.

-Mise en ligne du bon de demande (renseignements et modalités de transport) :

-pour l'envoi au CNR d'une souche de *H. pylori* ;

-pour l'envoi au CNR d'une sérologie *Campylobacter jejuni* ;

-pour l'envoi au CNR d'un test respiratoire à l'urée marquée.

-Réorganisation des onglets du site internet avec création du catalogue des actes dans un onglet spécifique : « analyses réalisées et envois au CNR ».

Nous avons également mis fin à l'anonymisation des souches de Campylobacters envoyées au CNR. Une nouvelle feuille de renseignements Campylobacter a été mise en ligne et diffusée.

-Activités de conseil aux professionnels de santé

Des appels téléphoniques ainsi que des courriels nous arrivent régulièrement, principalement pour des conseils thérapeutiques en cas d'infection systémique et de situations particulières. Une réponse est systématiquement donnée.

Un bilan 2019 des mails et appels téléphoniques a été réalisé par le secrétaire du CNR recruté début 2018. Les données sont présentées ci-dessous. L'activité de contacts thérapeutiques est stable en 2019 et en augmentation pour les conseils techniques notamment pour *H. pylori*.

Nb. et nature des contacts	Modalités	Détails
----------------------------	-----------	---------

105 contacts pour des conseils thérapeutiques	contacts téléphoniques (n=67)	75 pour <i>H. pylori</i>
	contacts email (n=38)	20 pour <i>Campylobacter sp</i> 10 pour <i>Arcobacter sp</i> ou autres
86 contacts pour des conseils techniques	contacts téléphoniques (n=52)	29 pour <i>H. pylori</i>
	contacts email (n=34)	14 contacts pour des problèmes de CQ pour <i>C. jejuni</i>

Les emails sont adressés soit directement aux biologistes du CNR soit *via* le système messagerie intégrée au site internet. Dans ce dernier cas, les biologistes du CNR (P Lehours, F Mégraud, E Bessède) ainsi que le secrétariat du CNR sont tous destinataires. P Lehours répond en priorité et en cas d'absence les directeurs adjoints répondent. Nous répondons à nos messages en général en moins de 24h ouvrées.

Si une problématique nécessite discussions ou consensus entre les biologistes, elle peut être abordée en petit comité ou bien lors de la réunion du CNR.

Depuis janvier 2018, le secrétariat du CNR centralise toutes les réponses et s'assure que toutes les questions ont été résolues.

Les appels téléphoniques sont transmis immédiatement à un des biologistes du CNR, en cas d'absence l'appel est noté dans un classeur spécifique et un mail est envoyé par notre personnel aux biologistes pour les prévenir.

Un planning de présence des biologistes est affiché et actualisé mensuellement par le secrétariat du CNR.

5.2.-Conseil et expertise aux autorités sanitaires

-Sollicitation par le CA-SFM pour proposer des valeurs d'interprétation en diamètres et/ou CMI pour l'interprétation des bactéries du genre *Campylobacter* (et apparentées) et *H. pylori*.

-Transmission à l'ECDC *via* Santé Publique France des résistances aux antibiotiques chez les Campylobacters.

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

Nous avons été sollicités en juin 2019 par le club SIR (réunissant les utilisateurs d'automate SIRScan, I2A) pour participer à la réunion annuelle des utilisateurs du système SIR (réseau REUSSIR) pour une intervention sur Campylobacter- Helicobacter-Bactéries apparentées : identification, antibiogramme, actualités sur les résistances.

Cette journée a été suivie le vendredi 21 juin par la réunion annuelle ColBVH dont une session dédiée aux infections digestives. Emilie Bessède est intervenue lors de ces 2 journées.

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 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

1-Bilan pour les souches de *C. jejuni* :

C. jejuni est la cause la plus courante de gastro-entérite bactérienne dans le monde. Principalement isolé des échantillons de selles, *C. jejuni* peut devenir invasif et se retrouver dans le sang d'individus infectés. *C. jejuni* appartient au microbiote commensal d'un certain nombre d'hôtes notamment animaux. L'infection par cette bactérie peut parfois être attribuée à l'exposition à un réservoir spécifique.

En 2018, 126 nouvelles souches de *C. jejuni*, isolées entre 2015 et 2018, avaient été séquencées et analysées en 2019 : 50 nouvelles souches invasives et 76 souches non-invasives (parmi lesquelles 22 estimées selon les fiches de renseignements comme provenant de produits de la mer).

Année	<i>C. jejuni</i> invasifs	<i>C. jejuni</i> non invasifs
2009	-	39
2011	17	-
2012	18	-
2013	33	-
2014	35	-
2015	33	78 +5
2016	37	26 +6
2017	45	56
2018	5	9
Total	223	219

Tableau. Total des souches séquencées pour le projet *C. jejuni* invasifs / non invasifs. 50 souches invasives de 2017 à 2018 ont été ajoutées à l'étude et 76 souches non invasives de 2015 à 2018. Les séquençages ont été réalisés par la société Integragen, via la technologie Illumina (HiSeq4000).

Les réservoirs à l'origine des souches ont été déterminés à l'aide des données publiées par Thépault A *et al.*, (Thépault A. <https://doi.org/10.1128/AEM.03085-16>, LNR Ploufragan). Il s'agit de 15 marqueurs génétiques qui, combinés au logiciel d'analyses statistiques STRUCTURE et à 583 souches d'entraînement (issues de la base de données PubMLST, <http://zoo-dalmore.zoo.ox.ac.uk/>), permettent de discriminer les souches provenant des volailles, ruminants et de l'environnement.

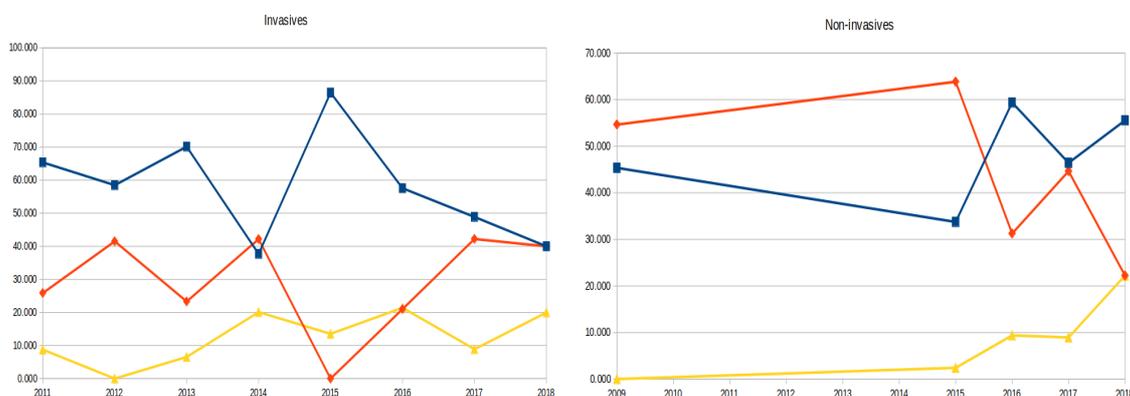


Figure 8 : Evolution entre 2009 et 2018 des proportions de souches invasives et non invasives de *C. jejuni* suivant 3 différents réservoirs. En bleu la population « volailles », en orange la population « ruminants » et en jaune la population « environnement ». (en abscisse : années et en ordonnées : pourcentage des souches)

Concernant les souches invasives, la tendance affichée depuis 2015 d'une baisse des souches issues de la volaille et d'une hausse des souches issues des ruminants s'accroît. En 2018 les proportions pour ces deux populations sont égales. Chez les souches non invasives, une nette hausse des souches provenant de volailles est observée ainsi qu'une très nette baisse des souches provenant de ruminants. Pour les souches de l'environnement, le taux reste assez stable (aux alentours de 20%) qu'elles soient invasives ou non invasives.

2- Projet-attribution de sources pour *C. coli* :

Le projet 2019 pour *C. coli* a consisté en la détermination de marqueurs génomiques discriminants les différentes espèces sources, à savoir : les volailles, ruminants (bœufs, vaches) et porcs afin d'établir un profil des réservoirs à l'origine des contaminations par ce pathogène en France.

Sélection des souches : Elles ont été isolées entre 2015 et 2017 et proviennent des réseaux Campy.COM et Campy.HOP avec en particulier un nombre équivalent de souches sensibles et de souches résistantes aux antibiotiques ; un nombre de souches provenant de patients masculins équivalent à celui provenant de patients féminins ; une moyenne d'âge des patients aux alentours de 37 ans (dans chaque population, sensible et résistante). Le séquençage Illumina (HiSeq4000) par la société Integragen a été choisi pour le WGS.

Bilan séquençage : Les fichiers de données NGS brutes obtenus de la société Integragen (séquences Forward et Reverse) ont été traités par notre ingénieur en bioinformatique. La filtration des séquences en fonction de leur qualité a été réalisée puis les génomes ont été assemblés à l'aide de l'outil SPAdes. L'assemblage de ces 96 premiers génomes de *C. coli* à partir de données NGS a permis d'obtenir des fichiers d'une taille globale de 1,69 Mpb, composés en moyenne de 40 contigs (taille moyenne : 47kpb) ; un GC% de 31 ; en moyenne 1900 gènes annotés/génome. Parmi ces 96 génomes, seulement 7 assemblages ont donné des résultats non exploitables, avec de très nombreux contigs de petites tailles et une faible couverture.

Après assemblage des génomes de *C. coli* issus de données NGS, la détermination des marqueurs a été réalisée de deux manières. D'une part, via l'annotation des génomes, en comparant les différentes versions d'un même gène parmi les individus, différents profils peuvent être dressés. D'autre part, par un génotypage, via la détermination de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) en alignant les souches sur une référence, des mutations peuvent être déterminées, pouvant être représentatives d'une population donnée. La robustesse de ces marqueurs (allèle ou SNP) a été établie par l'utilisation d'outils statistiques, tel le logiciel Structure (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>).

La détermination des marqueurs spécifiques aux différents réservoirs de *C. coli* a été effectuée à l'aide de 750 génomes provenant de différentes études (génomes provenant du projet américain NARMS et de la base de données PubMLST). Ces génomes ont été alignés sur des souches de *C. coli* de référence afin d'identifier les potentielles mutations en utilisant les outils "samtools" et "bwa". Au total, 130 SNPs ont été déterminés, contenus principalement dans les séquences de protéines membranaires ou impliquées dans le déplacement de la bactérie. Via le logiciel "STRUCTURE", une analyse statistique permettant d'estimer la "puissance discriminative" des marqueurs a apporté des résultats concluants (Figure 9).

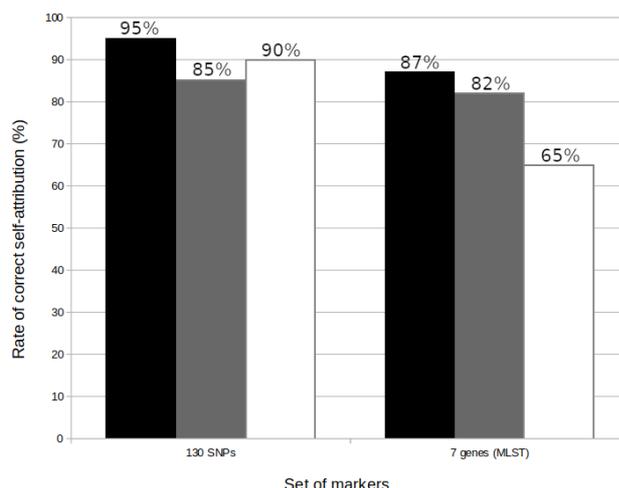


Figure 9 : Capacité d'attribution en % des 130 mutations par comparaison aux marqueurs MLST (Multi Locus Sequence Typing, méthode impliquant 7 gènes provenant de *C. jejuni*, couramment utilisés pour structurer le genre *Campylobacter*). En noir, la capacité d'attribution pour le réservoir « volailles », en gris la capacité d'attribution pour le réservoir « ruminants » et en blanc pour le réservoir « porcs ».

Afin de déterminer la principale source de contamination en France de *C. coli*, plusieurs souches cliniques de 2015 à 2017 ont été isolées au CNRCH en 2018. Un total de 150 souches a été séquencé par la société Integragen. A partir de l'étude des génomes, deux d'entre elles ont été identifiées comme *C. jejuni*. Un génome était de mauvaise qualité. Ces génomes ont donc été retirés de l'étude. Les 130 mutations pour chaque souche ont été extraites des séquences et une analyse statistique d'attribution de source a été effectuée (logiciel STRUCTURE) (Figure 10).

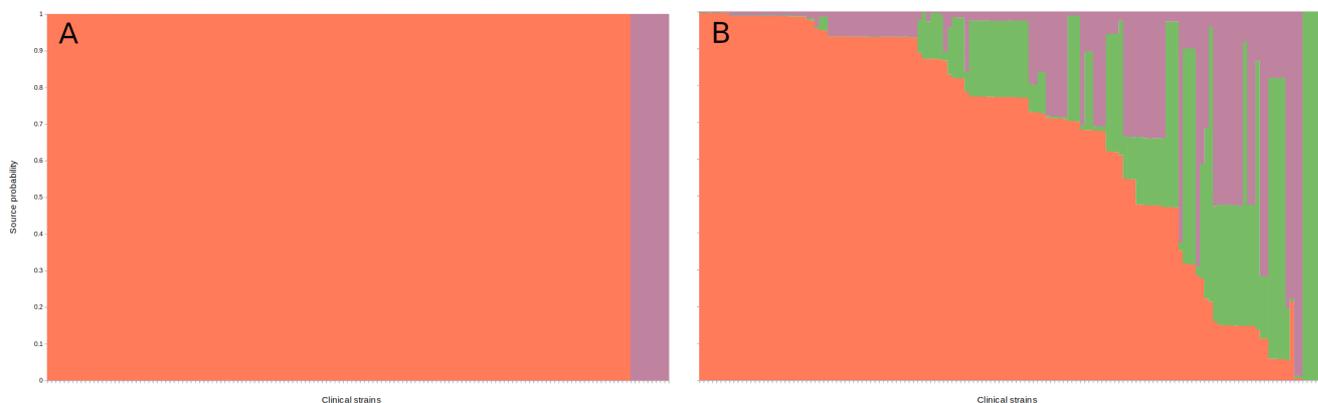


Figure 10 : Probabilités d'attribution des 147 souches cliniques de *C. coli* en utilisant les 130 mutations (A) par comparaison aux probabilités d'attribution en utilisant les marqueurs MLST (B). En orange le taux d'attribution pour le réservoir « volailles », en vert le taux d'attribution pour le réservoir « ruminants » et en violet pour le réservoir « porcs ». En ordonnée scores de 0 à 1 ; en abscisse 147 *C. coli*. Plus le score d'attribution à une source est élevé, plus la barre colorée correspondante est grande.

En utilisant les SNPs identifiés par nos méthodes bioinformatiques, 138 souches (94%) ont été attribuées aux volailles, 9 aux porcs (6%) et aucune aux ruminants. Par comparaison, en utilisant la MLST, 89 souches ont été attribuées aux volailles (60,5%), 13 aux ruminants (9%), 6 aux porcs (4%) et 39 souches n'ont donné aucun résultat significatif. En effet, l'utilisation de marqueurs spécifiques à *C. jejuni* (MLST) a apporté des résultats variables tandis que pour les mutations spécifiques à *C. coli*, chacune des probabilités d'attribution s'élève à 100%.

En conclusion, la consommation de viande de volaille a été déterminée comme étant le principal facteur de contamination par *C. coli* en France, de 2015 à 2017. Ce réservoir a donc une très grande importance dans les infections intestinales bactériennes aux *Campylobacters*, autant pour *C. jejuni* que pour *C. coli*.

3-Bilan des séquençages de 3 génomes de *Helicobacter* sp :

Le genre *Helicobacter* de la famille des *Helicobacteraceae* regroupe 42 espèces validées (33 avec des séquences génomiques complètes). De nouvelles espèces sont fréquemment proposées. Le CNRCH reçoit parfois de ses correspondants des isolats suspectés d'appartenir à de nouvelles espèces du genre *Helicobacter*. Nous présentons ici trois isolats que nous avons caractérisés récemment et dont l'ADN a été séquencé.

L'étude initiée en 2018 sur 3 potentielles nouvelles souches du genre *Helicobacter* a été finalisée en 2019, avec un article publié dans *Frontiers* (Berthenet E, *et al.*, "Whole-Genome Sequencing and Bioinformatics as Pertinent Tools to Support *Helicobacteraceae* Taxonomy, Based on Three Strains Suspected to Belong to Novel *Helicobacter* Species." *Frontiers in Microbiology* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02820>).

Pour rappel, trois isolats suspects ont été séquencés (Illumina NextSeq500) :

- CNRCH 2005/566H, isolé dans les selles d'une patiente âgée de 60 ans présentant un carcinome hépatocellulaire et une gastro-entérite.
- 48519 isolé à l'hôpital Cochin.
- Cn23e, isolé dans une biopsie gastrique chez un chien souffrant de gastrite chronique.

Afin de solidifier les résultats biochimiques et *in vivo*, une étude bioinformatique approfondie par comparaison avec 38 autres génomes (d'espèces du genre *Helicobacter*) a été effectuée.

Tableau : Deux meilleurs scores d'Average Nucleotide Identity (ANI) and in silico DNA–DNA Hybridization (DDH) pour chacune des trois souches (CNRCH 2005/566H, 48519 et Cn23e). Scores calculés par comparaison avec 38 espèces du genre *Helicobacter* différentes.

Query genome	Reference genome	ANI	Formula 1			Formula 2			Formula 3			G+C difference	
			DDH	Model C.I.	Distance Prob. DDH ≥ 70%	DDH	Model C.I.	Distance Prob. DDH ≥ 70%	DDH	Model C.I.	Distance Prob. DDH > = 70%		
CNRCH 2005/566H	<i>H. valvidiensis</i> WBE14	84.97	34.20	[30.9–37.8%]	0.4559 0.36	30.50	[28.1–33%]	0.1394 0.13	32.40	[29.4–35.4%]	0.5318	0.01	1.69
CNRCH 2005/566H	<i>H. canadensis</i> MIT 98-5491	76.86	13.90	[11.1–17.3%]	0.9264 0	20.50	[18.3–22.9%]	0.2141 0	14.20	[11.8–17%]	0.9421	0	0.19
48519	<i>H. cinaedi</i> PAGU611	89.71	47.4000	[44–50.8%]	0.3268 7.92	40.40	[37.9–42.9%]	0.0981 3	45.60	[42.6–48.7]	0.3929	0.83	0.39
48519	<i>H. cinaedi</i> ATCC BAA-847	89.70	45.60	[42.2–49%]	0.3418 5.63	40.50	[38.1–43.1]	0.0976 3.11	44.10	[41.1–47.1%]	0.4060	0.53	0.68
Cn23e	<i>H. felis</i> ATCC 49179	97.40	88.00	[84.5–90.8%]	0.0915 96.51	75.20	[72.2–78%]	0.0292 85.97	88.70	[85.8–91%]	0.1181	99.21	0.41
Cn23e	<i>H. cynogastricus</i> strain 329937_4	86.29	30.50	[27.2–34.1%]	0.5051 0.11	35.50	[33.1–38%]	0.1160 0.78	30.10	[27.2–33.2%]	0.5625	0	0.84

ANI analyses were performed using FastANI 1.1 tool (see section "Materials and Methods"). The DDH value were calculated using Genome-to-Genome Distance Calculator (v. 2.1; <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) with the three formulas: formula: 1 (HSP length/total length); formula: 2 (identities/HSP length); formula: 3 (identities/total length). HSP, high-scoring segment pairs.

Avec un score d'ANI supérieur au seuil minimum de 95% (confirmant une identité entre deux souches) et un score DDH très élevé, l'isolat Cn23e a bien été identifié comme appartenant à l'espèce *H. felis*. Les deux meilleurs scores d'ANI et de DDH pour les deux autres souches sont en revanche non significatifs. Pour autant, des scores importants entre l'isolat 48519 et *H. cinaedi* et entre l'isolat 2005/566H et *H. valvidiensis* démontrent une certaine proximité entre ces espèces. L'étude du gène de la sous-unité A de la gyrase confirme en effet cette similarité nucléotidique (Figure 11).

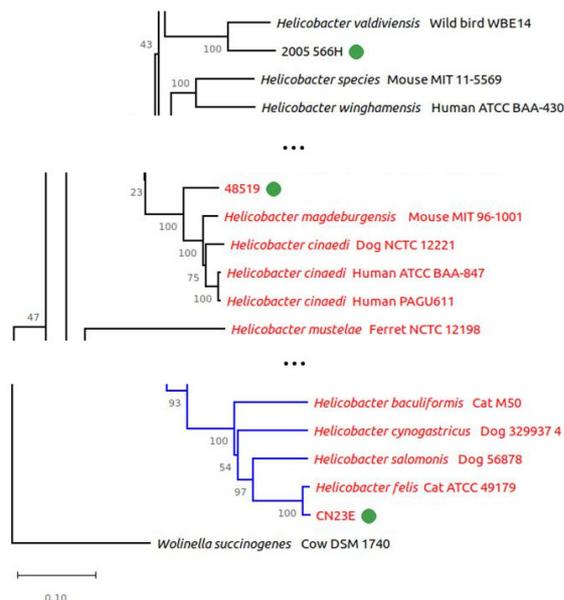


Figure 11 : Arbre phylogénétique comparant le gène *gyrA* de 72 espèces avec les 3 isolats d'intérêt. Figure complète dans la publication <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02820>.

Une forte identité entre les gènes de la *gyrA* de Cn23e et *H. felis* a été observée, confirmant une fois de plus l'appartenance de la souche d'intérêt à cette espèce. La souche 48519 possède également une haute similarité dans la séquence du gène avec les souches de l'espèce *H. cinaedi* sans pour autant être incluse dans le clade de celle-ci. Enfin, l'étude du gène de la *gyrA* a également montré la proximité entre l'isolat 2005/566H et l'espèce *H. valdiviensis*. Les différentes analyses génomiques effectuées ont permis d'apporter des résultats solides dans l'étude de ces isolats. Ainsi, deux nouvelles espèces du genre *Helicobacter* ont pu être proposées : *Helicobacter labetoulli* sp. pour la souche 48519 et *Helicobacter burdigaliensis* sp. pour la souche 2005/566h.

6.2.-Liste des publications et communications de l'année 2019, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Les noms des membres du CNR sont surlignés en gris.

-Publications

Publications internationales

- 1-Lauener FN, Imkamp F, Lehours P, Buissonnière A, Bénéjat L, Zbinden R, Keller PM, Wagner K. Genetic Determinants and Prediction of Antibiotic Resistance Phenotypes in *Helicobacter pylori*. J Clin Med. 2019 Jan 7;8(1). pii: E53. doi: 10.3390/jcm8010053. PMID: 30621024
- 2-E Berthenet, A Thépault, M Chemaly, K Rivoal, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, E Bessède, Francis Mégraud, SK Sheppard, P Lehours. Source attribution of *Campylobacter jejuni* shows variable importance of chicken and ruminants reservoirs in non-invasive and invasive French clinical isolates. Sci Rep. 2019 May 30;9(1):8098. doi: 10.1038/s41598-019-44454-2.
- 3-Imkamp F, Lauener FN, Pohl D, Lehours P, Vale FF, Jehanne Q, Zbinden R, Keller PM, Wagner K. Rapid characterization of virulence determinants in *Helicobacter pylori* isolated from non-atrophic gastritis patients by next generation sequencing. J Clin Med 2019. Jul 12;8(7). pii: E1030. doi: 10.3390/jcm8071030.
- 4-K Yahara, P Lehours, FF Vale. Analysis of genetic recombination and the pan-genome of a highly recombinogenic bacteriophage species. Microb Genomics 2019 Jul 16. doi: 10.1099/mgen.0.000282. [Epub ahead of print]
- 5-Contreras M, Bénéjat L, Mujica H, Peña J, García-Amado MA, Michelangeli F, Lehours P. Real-Time PCR detection of a 16S rRNA single mutation of *Helicobacter pylori* isolates associated with reduced susceptibility and resistance to tetracycline in the gastroesophageal mucosa of individual hosts. J Med Microbiol 2019 Jul 31
- 6-Boukerb AM, Penny C, Serghine J, Walczak C, Cauchie HM, Miller WG, Losch S, Ragimbeau C, Mossong J, Mégraud F, Lehours P, Bénéjat L, Gourmelon M. *Campylobacter armoricus* sp. nov., a novel member of the *Campylobacter lari* group isolated from surface water and stools from humans with enteric infection. Int J Syst Evol Microbiol. 2019 Nov 12. doi: 10.1099/ijsem.0.003836. [Epub ahead of print]
- 7-Albaret G, Sifré E, Floch P, Laye S, Aubert A, Dubus P, Azzi-Martin L, Giese A, Salles N, Mégraud F, Varon C,

- Lehours P, Roubaud-Baudron C. Alzheimer's Disease and *Helicobacter pylori* Infection: Inflammation from Stomach to Brain? *J Alzheimers Dis*. 2019 Dec 16. doi: 10.3233/JAD-190496. [Epub ahead of print]
- 8-Berthenet E, Bénégat L, Ménard A, Varon C, Lacomme S, Gontier E, Raymond J, Boussaba O, Toulza O, Ducournau A, Buissonnière A, Giese A, Mégraud F, Bessède E, Jehanne Q, Lehours P. Whole-Genome Sequencing and Bioinformatics as Pertinent Tools to Support *Helicobacteraceae* Taxonomy, Based on Three Strains Suspected to Belong to Novel *Helicobacter* Species. *Front Microbiol*. 2019 Dec 6;10:2820. doi: 10.3389/fmicb.2019.02820. eCollection 2019.
- 9-Gueudet T, Paolini MC, Buissonnière A, Trens A, Roussée JM, Lefranc M, Bénégat L, Ducournau A, Mégraud F, Bessède E and Lehours P. How to interpret a positive *Campylobacter* PCR result using the BD MAXTM system in the absence of positive culture? *J Clin Med* 2019. Dec 3;8(12). pii: E2138. doi: 10.3390/jcm8122138.
- 10-González A, Casado J, Chueca E, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Espinosa Angarica V, Bénégat L, Guignard J, Giese A, Sancho J, Lehours P, Lanás Á. Repurposing Dihydropyridines for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Pharmaceutics*. 2019 Dec 15;11(12). pii: E681. doi: 10.3390/pharmaceutics11120681.1:

-Publication du Pr F Mégraud

- 11- McNicholl AG, Bordin DS, Lucendo A, Fadeenko G, Fernandez MC, Voynovan I, Zakharova NV, Sarsenbaeva AS, Bujanda L, Perez-Aisa Á, Vologzhanina L, Zaytsev O, Ilchishina T, Coba C, Lasala JP, Alekseenko S, Modolell I, Molina-Infante J, Ruiz-Zorrilla Lopez R, Alonso-Galan H, Moreno NF, Hinojosa J, Santaella I, Varela P, Gonzalez-Cordero PL, Barrio J, Dominguez-Jimenez JL, Nuñez O, Alcedo J, Nyssen OP, Caldas M, Donday MG, Shvets O, Mégraud F, O'Morain C, Gisbert JP. Combination of Bismuth and Standard Triple Therapy Eradicates *Helicobacter pylori* Infection in More than 90% of Patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jan;18(1):89-98. doi: 10.1016/j.cgh.2019.03.048. Epub 2019 Apr 10. PubMed PMID: 30978536.
- 12-Buzás GM, Nyssen OP, Mégraud F, O'Morain C, Gisbert JP. [Pan-European Registry on *Helicobacter pylori* management. Results from Ferencváros, Budapest, 2013-2019]. *Orv Hetil*. 2019 Nov;160(47):1856-1863. doi: 10.1556/650.2019.31553. Hungarian. PubMed PMID: 31736344.
- 13-McNicholl AG, O'Morain CA, Mégraud F, Gisbert JP; As Scientific Committee of the Hp-Eureg on Behalf of the National Coordinators. Protocol of the European Registry on the management of *Helicobacter pylori* infection (Hp-EuReg). *Helicobacter*. 2019 Oct;24(5):e12630. doi: 10.1111/hel.12630. Epub 2019 Jul 8. PubMed PMID: 31282060.
- 14-Guiard E, Lelievre B, Rouyer M, Zerbib F, Diquet B, Mégraud F, Tison F, Bignon E, Lassalle R, Droz-Perroteau C, Moore N, Blin P. Bismuth Concentrations in Patients Treated in Real-Life Practice with a Bismuth Subcitrate-Metronidazole-Tetracycline Preparation: The SAPHARY Study. *Drug Saf*. 2019 Aug;42(8):993-1003. doi: 10.1007/s40264-019-00821-6. PubMed PMID: 31069703.
- 15-Mégraud F, Gemilyan M. UEG Activity Grant used to implement guidelines in Armenia. *United European Gastroenterol J*. 2019 Aug;7(7):987. doi: 10.1177/2050640619864879. Epub 2019 Jul 31. PubMed PMID: 31428425; PubMed Central PMCID: PMC6683634.
- 16- Delchier JC, Bastuji-Garin S, Raymond J, Mégraud F, Amiot A, Cambau E, Burucoa C; HELICOSTIC Study Group. Efficacy of a tailored PCR-guided triple therapy in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Med Mal Infect*. 2019 Jun 27. pii: S0399-077X(18)30185-9. doi: 10.1016/j.medmal.2019.06.001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31257067.
- 17- Gemilyan M, Hakobyan G, Bénégat L, Allushi B, Melik-Nubaryan D, Mangoyan H, Laur A, Daguerre E, Grigoryan E, Mégraud F. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance profile in Armenia. *Gut Pathog*. 2019 Jun 8;11:28. doi: 10.1186/s13099-019-0310-0. eCollection 2019. PubMed PMID: 31182977; PubMed Central PMCID: PMC6555938.
- 18-Roubaud-Baudron C, Mégraud F, Salles N, Dartigues JF, Letenneur L. Detecting both current and prior *Helicobacter pylori* infection is important to assess its impact on dementia. *Alzheimers Dement*. 2019 May;15(5):721-722. doi: 10.1016/j.jalz.2018.12.020. Epub 2019 Mar 8. PubMed PMID: 30853466.
- 19-Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M, Leja M, Esposito G, Garrido M, Kikuste I, Mégraud F, Matysiak-Budnik T, Annibale B, Dumonceau JM, Barros R, Fléjou JF, Carneiro F, van Hooft JE, Kuipers EJ, Dinis-Ribeiro M. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019. *Endoscopy*. 2019 Apr;51(4):365-388. doi: 10.1055/a-0859-1883. Epub 2019 Mar 6. PubMed PMID: 30841008.
- 20-Dion J, Malphettes M, Bénégat L, Mégraud F, Wargnier A, Boutboul D, Galicier L, Le Moing V, Giraud P, Jaccard A, Nove-Josserand R, Fieschi C, Oksenhendler E, Gérard L; DEFI study group. *Campylobacter* infection in adult patients with primary antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019 Mar;7(3):1038-1041.e4. doi: 10.1016/j.jaip.2018.06.014. Epub 2018 Jul 6. PubMed PMID: 29981862.

Publications didactiques

1-Lehours P, Ferrero RL. *Helicobacter*. Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter* 2019 Sep;24 Suppl 1:e12644. doi: 10.1111/hel.12644. Review.

2-14-Makristathis A, Hirschl AM, Mégraud F, Bessède E. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019 Sep;24 Suppl 1:e12641. doi: 10.1111/hel.12641. Review. PubMed PMID: 31486244.

-Liste des publications de formation

1-F. Mégraud, E. Bessède, P. Lehours. Diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* au laboratoire. EMC -Biologie médicale 2018;1-6 [Article 90-05-0190-A]."

2-F Mégraud, P Lehours. *Helicobacter pylori*. Encyclopedia of Gastroenterology-2nd edition. 2019.

5-J. Raymond, P. Lehours. *Helicobacter pylori* : notions fondamentales et épidémiologiques. EMC - Gastro-entérologie 2019;1-9 [Article 9-000-B-60]

-Communications nationales

Oraux

-E Berthenet, A Ménard, C Varon, S Lacomme, E Gontier, J Raymond, F Mégraud, B Ouahiba, A Ducournau, A Buissonnière, L Bénéjat, A Giese, E Bessède, P Lehours. Etude de trois souches suspectées d'appartenir à une nouvelle espèce du genre *Helicobacter*. Congrès annuel du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Paris, 25 janvier 2019.

-C Alix, A Buissonnière, L Bénéjat, A Ducournau, E Bessède, P Lehours, F Mégraud. Surveillance de la résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques en France en 2018 et évolution durant les 5 dernières années. Congrès annuel du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Paris, 25 janvier 2019.

-C Roy, P Lehours, D Robert, D Boraud, A Buissonnière, L Bruhl, A Ducournau, F Mégraud, E Bessède. Évaluation des performances du kit Novodiag Bacterial GE+ dans le diagnostic des infections bactériennes intestinales. 15^{ème} congrès national de la SFM-MICROBES, 30 septembre-2 octobre 2019, Cité des sciences et de l'industrie, Paris.

-A Buissonnière, E Bessède, L Bénéjat, F Mégraud, P Lehours. Evaluation sur échantillons de selles des performances des kits commerciaux RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* (R-Biopharm). Journée du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Paris. 23-24 janvier 2020.

-Bénéjat L, F Mégraud, E Bessède, P Lehours. Culture de *Helicobacter pylori* post détection par PCR : influence sur la performance. Journée du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Paris. 23-24janvier 2020.

-Q Jehanne, L Bénéjat, E Bessède, F Mégraud, P Lehours. Evaluation sur biopsies gastriques des performances du kit de PCR Allplex™ *H. pylori* & ClariR Assay (Seegene). Journée du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Paris. 23-24janvier 2020.

Posters

-Q Jehanne, L Bénéjat, E Bessède, A Ducournau, A Buissonnière, F Mégraud, P Lehours. *Arcobacter butzleri* et mécanismes de résistance aux antibiotiques. 15^{ème} congrès national de la SFM-MICROBES, 30 septembre-2 octobre 2019, Cité des sciences et de l'industrie, Paris

-Bénéjat L, F Mégraud, E Bessède, P Lehours. Culture de *Helicobacter pylori* post détection par PCR : influence sur la performance. 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

-Q Jehanne, L Bénéjat, E Bessède, A Ducournau, A Buissonnière, F Mégraud, P Lehours. *Arcobacter butzleri* et mécanismes de résistance aux antibiotiques. 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

-A Buissonnière, LBénéjat, E Bessède, F Mégraud, P Lehours. Evaluation sur échantillons de selles des performances des kits commerciaux RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* (R-Biopharm). 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

-C Roy, L Bénéjat, A Ducourau, A Buissonnière, E Bessède, D Boraud, D Robert, T Gueudet, P Lehours. Évaluation des performances du kit Novodiag Bacterial GE+ dans le diagnostic des infections bactériennes intestinales. 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

-F. Mégraud, C. Alix, L. Bénéjat, A. Ducournau, E. Bessède, P Lehours. Surveillance de la résistance de *Helicobacter pylori* aux antibiotiques et évolution durant les 5 dernières années. 39^{ème} RICAI, 16-17 décembre 2019, Paris.

-Communications internationales

Oraux

- Y. Glupczynski, D. Huang, M. Hoebeke, C. Alix, L. Bénéjat, P. Lehours, F. Mégraud and the *H. pylori* AST working group. European survey of *Helicobacter pylori* primary resistance to antibiotics – Evolution over the last 20 years. 32nd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. Innsbruck, Autriche. 5-8 septembre 2019.
- F. Mégraud, D. Huang, M. Hoebeke, C. Alix, L. Bénéjat, P. Lehours, Y. Glupczynski. European survey of *Helicobacter pylori* primary resistance to antibiotics – Evolution over the last 20 years. United European Gastro Week 2019. Barcelone, Espagne. 19-23 octobre 2019.
- Y. Glupczynski, D. Huang, M. Hoebeke, C. Alix, L. Bénéjat, P. Lehours, F. Mégraud and the *H. pylori* AST working group. European survey of *Helicobacter pylori* primary resistance to antibiotics – Evolution over the last 20 years. United European Gastro Week 2019. Barcelone, Espagne. 19-23 octobre 2019.
- A.G. McNicholl, S. Prast-Nielsen, L.P. Andersen, J.C. Machado, M. Leja, T. Alarcon, A. Gasbarrini, F. Mégraud, C. O'Morain, L. Engstrand, J.P. Gisbert. Study of the impact of *Helicobacter pylori* eradication treatments on the intestinal microbiota. United European Gastro Week 2019. Barcelone, Espagne. 19-23 octobre 2019.

Posters

- P. Fresia, E. Berthenet, F. Díaz-Viraqué, S. Forster, I. Ferres, A. Buissonnière, A. Ducournau, E. Bessède, F. Mégraud, P. Lehours, G. Iraola. Clinical lineages of *Sutterella wadsworthensis* are pathobionts in the human intestinal microbiota. 29th ECCMID, Amsterdam, NL, 2019. (P0504).
- F. Lauener, F. Imkamp, P. Lehours, A. Buissonnière, L. Bénéjat, R. Zbinden, P. Keller, K. Wagner. Genetic determinants and prediction of antibiotic resistance phenotypes in *Helicobacter pylori*. 29th ECCMID, Amsterdam, NL, 2019. (P0828).
- T. Gueudet, M. Paolini, A. Buissonnière, A. Trens, J. Roussée, L. Bénéjat, A. Ducournau, E. Bessède, F. Mégraud, P. Lehours. How to interpret a *Campylobacter*- positive PCR result in the absence of positive culture in a syndromic approach? 29th ECCMID, Amsterdam, NL, 2019. (P1538).
- E. Berthenet, A. Thepault, K. Rivoal, M. Chemaly, A. Ducournau, A. Buissonnière, L. Bénéjat, E. Bessède, F. Mégraud, S. Sheppard, P. Lehours. Source attribution of *Campylobacter jejuni* shows variations in the importance of chicken and ruminant reservoirs in non-invasive and invasive French clinical isolates. 29th ECCMID, Amsterdam, NL, 2019. (P1594).
- E. Berthenet, A. Thepault, K. Rivoal, M. Chemaly, A. Ducournau, A. Buissonnière, L. Bénéjat, E. Bessède, F. Mégraud, S. Sheppard, P. Lehours. Source attribution of *Campylobacter jejuni* in non-invasive and invasive French clinical isolates. 20th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Belfast, 8 – 11 septembre 2019.
- T. Gueudet, M. Paolini, A. Buissonnière, A. Trens, J. Roussée, L. Bénéjat, A. Ducournau, E. Bessède, F. Mégraud, P. Lehours. Interpretation of positive Campylobacter PCR on BDMax. 20th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Belfast, 8 – 11 septembre 2019.
- E Bessède, P Lehours. Evaluation of the CAMPYLOBACTER QUIK CHECK to detect *Campylobacter* in stool samples. ECCMID, 18 – 21 April 2020, Paris, France.
- Q Jehanne, L Bénéjat, E Bessède, F Mégraud, P Lehours. Evaluation of the Allplex *H. pylori* and ClariR Assay PCR kit on gastric biopsies. ECCMID, 18 – 21 April 2020, Paris, France.
- A Buissonnière, L Bénéjat, E Bessède, F Mégraud, P Lehours. Evaluation of the RIDA QUICK Helicobacter and RIDASCREEN Helicobacter kits on stool samples for *Helicobacter pylori* diagnosis. ECCMID, 18 – 21 April 2020, Paris, France.
- C Roy, L Bénéjat, A Ducournau, A Buissonnière, E Bessède, D Boraud, D Robert, T Gueudet, P Lehours. Evaluation of the Novodiag Bacterial GE+ kit for the diagnosis of intestinal bacterial infections
- K Villageois-Tran, N Argy, L Noel, C Pauc, T Montagne, P Lehours, L Bénéjat, A Ducournau, AS Le Guern, S Lefevre, S Miladinovic, S Houzé, B Visseaux, L Armand-Lefèvre. Prospective evaluation of three rapid multiplex PCR assays for the detection of gastrointestinal pathogens from stool samples. ECCMID, 18 – 21 April 2020, Paris, France.

Les communications ayant un lien avec une activité recherche à cheval entre le CNR et l'équipe INSERM U1053 « Infection à *Helicobacter* : inflammation et cancer » sont indiquées ci-dessous.

-Communications nationales

Oraux

- W. He, L. Azzi Martin, C. Alix-, M. Mergni, P. Lehours, P. Dubus, A. Ménard. Étude de l'autophagie induite en réponse à la génotoxine CDT. Congrès annuel du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Paris, 25 janvier 2019.
- Courtois S, Bodineau C, Mégraud F, Lehours P, Varon C, Duran V, Bessède E ; Etude du rôle de l'autophagie induite par *Helicobacter pylori* dans l'induction de l'EMT et l'émergence de cellules souches cancéreuses. Congrès annuel du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, Paris, 25 janvier 2019.
- R Enaud, K Hooks, A Barre, T Barnetche, C Hubert, M Massot, T Bazin, H Clouzeau, S Bui, M Fayon, P Berger, P Lehours, C Bébéar, M Nikolski, T Lamireau, L Delhaes, T Schaefferbeke. Dysbiose et inflammation intestinale précoces chez les enfants atteints de mucoviscidose. JFHOD 2019. CO38.
- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Etude de l'expression et du rôle de TAZ dans le processus métastatique du cancer gastrique. Journée scientifique de La Ligue Contre le Cancer, La Rochelle, 14 mars 2019.
- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced in response to *Helicobacter pylori* infection. Journée BrightDays du SIRIC BRIO, Bordeaux, mars 2019.
- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced in response to *Helicobacter pylori* infection. Journée de l'Ecole Doctorale des sciences de la vie et de la santé, Bordeaux, mai 2019. Prix de la meilleure communication orale.
- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced in response to *Helicobacter pylori* infection. Séminaire du réseau Hote-Pathogène de Bordeaux, 21 mai 2019.
- Tiffon C., Molina-Castro S., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced by *Helicobacter pylori* infection. Journée recherche de La Ligue contre le Cancer, Limoges, 14 novembre 2019.
- Seeneevassen L., Giraud J., Molina-Castro S.E., Tiffon C., Martin O., Boeuf H., Staedel C., Mégraud F., Lehours P., Dubus P., Varon C. Role of leukemia inhibitory factor (LIF) on the tumorigenic properties of cancer stem cells in gastric carcinoma. Congrès du canceropôle GSO, Arcachon, 20-22 novembre 2019.
- Blosse A, Peru S, Levy M, Marteyn B, Floch P, Sifré E, Giese A, Carlotti M, Azzi Martin L, Dubus P, Mégraud F, Ruskone Fourmestreaux A, Fabiani B, Copie-Bergman C, Cyrielle R, Hahne M, Huard B, Lehours P. Lymphomagenèse gastrique MALT induite par une infection à *Helicobacter sp* : réponse inflammatoire et rôle potentiel des polynucléaires éosinophiles. Journée du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Paris. 23-24janvier 2020.

Posters

- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced in response to *Helicobacter pylori* infection. Journée BrightDays du SIRIC BRIO, Bordeaux, mars 2019.
- Tiffon C., Molina-Castro S.E., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. The Hippo kinase LATS2 controls *Helicobacter pylori*-induced epithelial-mesenchymal transition and intestinal metaplasia in gastric mucosa. Congrès du canceropôle GSO, Arcachon, 20-22 novembre 2019.
- Seeneevassen L., Giraud J., Molina-Castro S.E., Tiffon C., Martin O., Boeuf H., Staedel C., Mégraud F., Lehours P., Dubus P., Varon C. Role of leukemia inhibitory factor (LIF) on the tumorigenic properties of cancer stem cells in gastric carcinoma. Congrès du canceropôle GSO, Arcachon, 20-22 novembre 2019.

-Communications internationales

Oraux

- L. Seeneevassen, J. Giraud, S. Molina-Castro, C. Tiffon, C. Staedel, O. Martin, F. Mégraud, P. Lehours, H. Boeuf, P. Dubus, C. Varon. Role of Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) on the tumorigenic properties of Cancer Stem Cells in gastric adenocarcinoma. 32nd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. Innsbruck, Autriche. 5-8 septembre 2019.
- L. Azzi-Martin, W. He, C. Péré-Védrenne, V. Korolik, C. Alix, M. Prochazkova-Carlotti, J.L. Morel, E. Le Roux-Goglin, P. Lehours, M. Djavaheiri-Mergny, C. Grosset, C. Varon, P. Dubus, A. Ménard. "Bacterial genotoxin, CDT and colibactin, induce the formation of transient messenger-rich ribonucleoprotein nuclear invaginations in surviving cells" The impact of bacterial infections on human cancer. EMBO workshop 26 – 29 October 2019 - Berlin, Germany

-Seeneevassen L., Giraud J., Molina-Castro S.E., Tiffon C., Martin O., Boeuf H., Staedel C., Mégraud F., Lehours P., Dubus P., Varon C. Role of leukemia inhibitory factor (LIF) on the tumorigenic properties of cancer stem cells in gastric carcinoma. 27th United European Gastroenterology Week, Barcelone, 19-23 octobre 2019. 32nd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. Innsbruck, Autriche. 5-8 septembre 2019.

Posters

-R. Enaud, K. Hooks, A. Barré, T. Barnetche, C. Hubert, M. Massot, T. Bazin, H. Clouzeau, S. Bui, M. Fayon, P. Berger, P. Lehours, C. Bébéar, M. Nikolski, T. Lamireau, L. Delhaes. Early microbiota disturbances and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis ; 29th ECCMID, Amsterdam, NL, 2019. (P0615).

-S. Molina-Castro, C. Tiffon, J. Giraud, H. Boeuf, E. Sifre, A. Giese, G. Belleannée, P. Lehours, E. Bessède, F. Mégraud, P. Dubus, C. Staedel, C. Varon. LATS2 controls gastric epithelial integrity by restricting epithelial-mesenchymal transition and intestinal metaplasia induced by *Helicobacter pylori* infection 32nd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. Innsbruck, Autriche. 5-8 septembre 2019.

-Tiffon C., Molina-Castro S., Giraud J., Peru S., Lehours P., Dubus P., Mégraud F., Staedel C., Varon C. Study of the Hippo/TAZ pathway in gastric carcinogenesis induced by *Helicobacter pylori* infection. 27th United European Gastroenterology Week, Barcelone, 19-23 octobre 2019.

-Conférences sur invitations des membres du CNRCH

-P Lehours

-CIET/Institut Pasteur Joint Symposium-Current Challenges on Infectious Diseases in Central America. « Gastric carcinogenesis and *Helicobacter pylori* infection: an imbalance of the gastric microbiota with potentially dramatic consequences ». 21 février 2019 (San José, Costa Rica)

-Gastric carcinogenesis and *Helicobacter pylori* infection. Conférence données à l'occasion des 20 ans de l'association des gastroentérologistes du Costa Rica (22 février 2019, San José, Costa Rica)

-United European Gastroenterology week. Symposium *H. pylori*: The bug has not gone away. Amsterdam, 10-14 Octobre 2020

Chairman/modérateurs lors de congrès nationaux :

-15^{ème} congrès national de la SFM-MICROBES, 30 septembre-2 octobre 2019, Cité des sciences et de l'industrie, Paris : Session « Campy fait de la résistance ».

-Congrès du Syndicat des Jeunes Biologistes Médicaux-BioMedJ. 5-6 Mars 2020, Paris. Modérateur de la session « Microbiote intestinal : quelles pathologies pour quels examens biologiques ».

-F Mégraud

-27^{ème} Réunion du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Paris. 24-25 janvier 2019. Modérateur.

-Central European Gastroenterology Meeting & Post-Graduate Course de l'EAGEN. Timisoara, Roumanie. 15-16 février 2019. Conférence.

-27th Annual Meeting of the Korean College of Helicobacter & Upper GI Research. Busan, Corée. 8-9 mars 2019. 2 conférences.

-XXth Albanian Congress of Gastro-Entero-Hepatology. Tirana, Albanie. 29 mars 2019. Conférence.

-50th Digestive Disease Week. San Diego, CA, USA. 18-21 mai 2019. Conférence.

-Conférence de l'Israeli Society for Clinical Laboratory Science. Petah Tikva, Israël. 12 juin 2019. Conférence.

-32nd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. Innsbruck, Autriche. 5-8 septembre 2019. Conférence.

-Journée du Centre National de Référence des Campylobacters et Helicobacters. Paris. 17 septembre 2019. Conférence.

-Taiwanese Digestive Disease Week & 10th Asian Pacific Topic Conference on *H. pylori*. Kaohsiung, Taïwan. 28-29 septembre 2019. Conférence.

-United European Gastro Week 2019. Barcelone, Espagne. 19-23 octobre 2019. Conférence.

-21st European Bridging Meeting in Gastroenterology. Varsovie, Pologne. 15-16 novembre 2019. Conférence.

+ 10 conférences de DPC : Toulouse, Pau, Paris Bercy, La Teste, Tarbes, Limoges, Bergerac, Rennes, Nantes, Paris Bichat.

-E Bessède

-20 juin 2019, Club SIR (réunissant les utilisateurs d'automate SIRScan, I2A : réunion annuelle des utilisateurs du système SIR (réseau REUSSIR) pour une intervention sur *Campylobacter-Helicobacter*-Bactéries apparentées :

identification, antibiogramme, actualités sur les résistances.
- 21 juin 2019, réunion annuelle ColBVH-session dédiée aux infections digestives.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1.-Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Le CNR *Campylobacter* et *Helicobacter* s'est engagé à assurer les missions définies par le décret no 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles. Il nous est en outre particulièrement demandé d'assurer les missions suivantes :

Pour *Campylobacter sp*

Expertise

- en développant et en améliorant les techniques de typage moléculaire ;
- en participant à la standardisation des méthodes diagnostiques et de typage par l'implication dans un réseau d'expertise et de surveillance internationale ;
- en identifiant et en typant les souches ;
- en testant la sensibilité des souches de *Campylobacters* et *Helicobacters* aux antibiotiques, en lien avec le CNR des résistances aux antibiotiques ;
- en contribuant au suivi de l'évolution de la résistance aux antibiotiques ;
- en contribuant à l'élaboration de recommandations concernant les techniques d'isolement et de typage ;
- en contribuant à la formation du personnel des laboratoires de biologie médicale de ville et hospitaliers ;
- en collaborant avec les organismes nationaux compétents dans le domaine de *Campylobacter* chez l'animal, et notamment le LNR *Campylobacter*.

Conseil

- aux biologistes et cliniciens.

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

- en constituant et maintenant un réseau de laboratoires permettant de fournir pour chaque espèce, des données sur l'évolution et les caractéristiques des cas ;
- en contribuant à l'investigation de cas groupés par l'identification et la comparaison des souches isolées chez l'homme et dans le véhicule suspecté à l'origine des cas groupés ;
- en collaborant aux réseaux de surveillance internationaux et en particulier européens notamment dans le cadre de l'application de la directive zoonoses 2003/99/CE.

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 d'un nouveau phénotype de résistance, etc.

Pour *Helicobacter pylori*

Expertise

- en identifiant et en caractérisant les souches, notamment en terme de résistance aux antibiotiques ;
- en développant, évaluant et/ou aidant à la diffusion des techniques diagnostiques.

Conseil

- aux biologistes et cliniciens.

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

- en surveillant la résistance aux antibiotiques des souches.

Contribution à l'alerte

1.2.-Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

La responsabilité scientifique du CNR Campylobacters et Hélicobacters est portée par le Pr Philippe Lehours. La gestion administrative du CNR est effectuée par le CHU de Bordeaux (pôle de Biologie et Pathologie, Mr David Karle). Notre CNR assure l'ensemble des missions citées ci-dessus sans laboratoire associé.

Organigramme 2017-2021 actualisé au 1^{er} avril 2020

Fonction	Nom	Qualification	Statut
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH
Responsable adjoint	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Emérite, vacataire
Responsable adjoint	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Ingénieur hospitalier	Lucie Bénéjat	M2	CDD
Ingénieur hospitalier	Quentin Jehanne	Master bio-info	CDD
Technicienne	Astrid Ducournau	BTS	CDD
Technicienne	Chloé Domingues Martins	BTS	CDD
Technicienne qualité	Mélanie Lecoœur	BTS	CDI (40%)
Technicienne	X (pool des techniciens du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin)	BTS	CDI
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDD (60%)

Personnel recruté en 2019.

Courant 2020, un technicien a été recruté à 50% pour participer à la préparation des milieux de culture spécifiques à l'activité du CNRCH.

1.3.-Locaux et équipements

Les locaux principaux du CNR (Laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin) sont composés de deux pièces techniques principales et du bureau du Pr F Mégraud (Figure 12), soit une surface totale proche de 70 m² dont les 2/3 sont destinées aux activités techniques.

S'y ajoutent une pièce contenant 6 congélateurs à -80°C à la disposition du CNR, l'utilisation de la laverie, de la pièce de préparation des milieux et l'accès à de nombreuses plateformes techniques, de l'hôpital (spectrométrie de masse MALDI-TOF, SIRscan, PCR en temps réel, séquençage) mais aussi de l'Université (protéomique, imagerie, animalerie A2). Les locaux de l'équipe 2 de l'U1053 UMR BaRITOn, à laquelle ce CNR est adossé, sont également utilisés par le personnel du Centre. Ils sont situés sur le site de l'Université (site de Carreire, Bat 2B, RDC, Zone Nord) à moins de 100 mètres du laboratoire hospitalier principal.

Les principaux équipements au niveau du laboratoire principal du CNR sont constitués de :

- une enceinte microaérobique Concept-M400 (Ruskinn Technology Ltd.) remplacée en 2017 ;
- un appareil Anoxomat (MART) et des jarres adaptées ;
- un automate d'extraction d'ADN Arrow (NorDiag) ;
- un PSM (Gelaine) ;

- un microscope équipé d'une caméra (Olympus)
- une étuve à 35°C ;
- un réfrigérateur-congélateur ;
- cinq ordinateurs connectés aux SIL et au réseau du CHU de Bordeaux ;
- un photocopieur/imprimante/scan/fax acheté en 2018 ;
- 6 congélateurs à -80°C (New Brunswick Scientific) avec deux systèmes de surveillance de la température :

Waranet-Solution relié à un ordinateur dédié, et Sirius géré par le CHU de Bordeaux.

Au niveau du laboratoire INSERM U1053, nous disposons de 3 thermocycleurs (2 thermocycleurs Eppendorf 25 puits, 1 thermocycleur Eppendorf de 96 puits), d'un spectromètre de masse isotopique pour l'analyse des tests respiratoires à l'urée marquée au ¹³C, d'un lecteur multifonction (dosages acides nucléiques en microplaque, lecteur de plaque type ELISA). Nous avons accès à la plateforme de biologie moléculaire du CHU et à celle de la FR Transbiomed (Université de Bordeaux) pour réaliser nos PCR en temps réel.

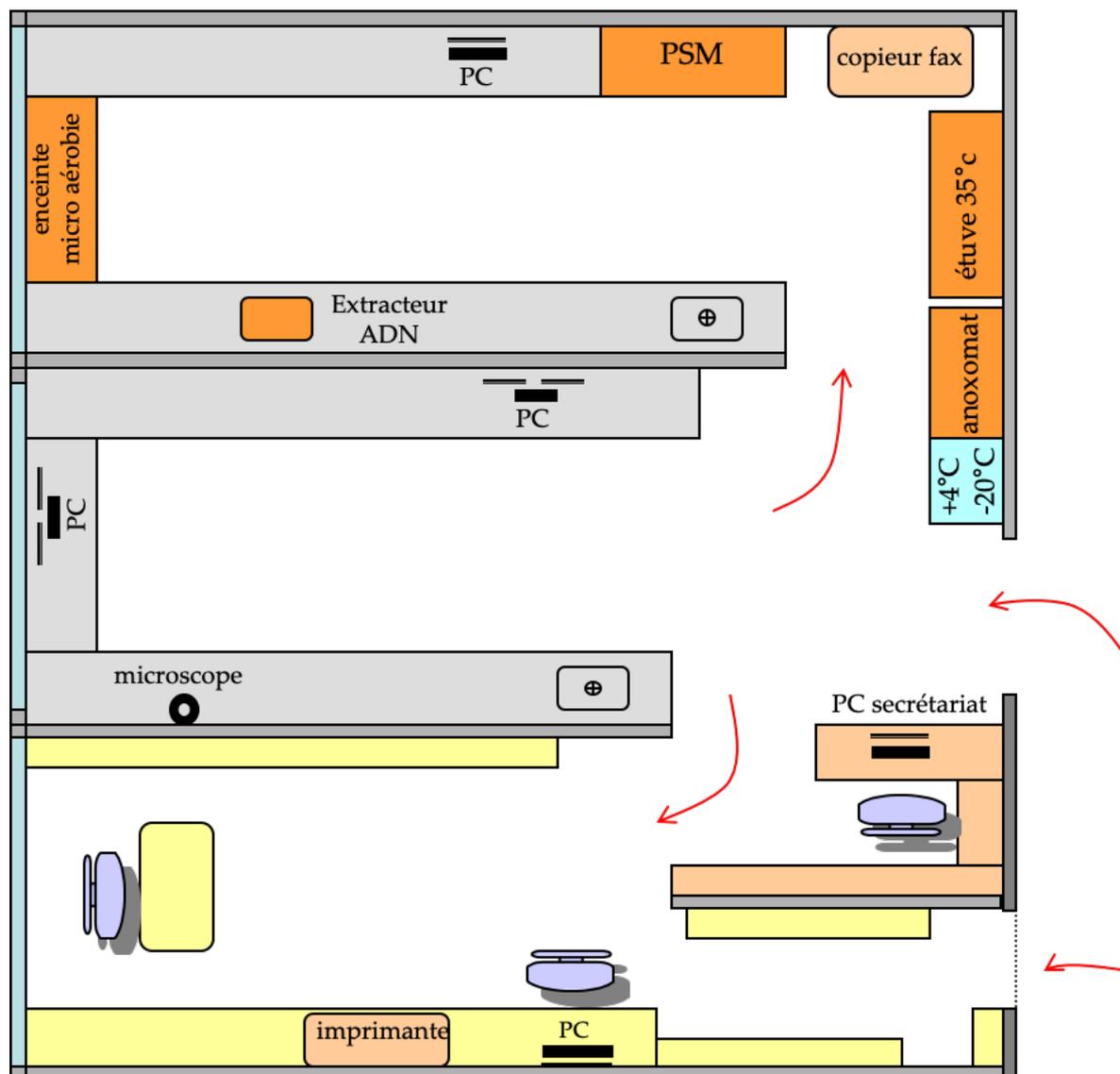


Figure 12 : Plan simplifié des locaux du CNRCH.

1.4.-Collections de matériel biologique

Nous avons en 2019 transféré 713 souches de *Campylobacter* vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux des années 2013 à 2015.

Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants :

- espèces autres que *C. jejuni* et *C. coli* de 2013 à 2015 ;
- C. jejuni* et *C. coli* de 2013 à 2015 issus d'hémoculture ;

-souches isolées à partir d'autres prélèvements que les selles ou les hémocultures de 2013 à 2015.
Ce transfert a pu avoir lieu grâce à une convention passée avec le CRB du CHU de Bordeaux en 2019. L'objectif étant de sanctuariser nos collections et de disposer en permanence de l'intégralité de notre collection afin de répondre aux demandes de collaborateurs nationaux (notamment le LNR *Campylobacter* de Ploufragan) et internationaux.

Le CNR conserve l'intégralité des isolats de *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Arcobacters*, *Helicobacters* entérohépatiques) de 2016 à 2019 (environ 5000 souches/année). Nous disposons également de nombreuses souches de *H. pylori*. Elles ont été conservées une année sur deux jusqu'en 2015 et intégralement depuis 2015 (n=3900 environ).

Le CNR dispose d'une collection de souches type pour de nombreuses espèces du genre *Campylobacter sp* (n=14), *Arcobacter sp* (n=3) ou *Helicobacter sp* (n=18). Ces souches ou leurs ADN sont disponibles gratuitement sur demande.

1.5.-Démarche qualité du laboratoire

Le CNRCH fait partie du Pôle de Biologie et Pathologie et a initié fin 2008 une demande d'accréditation COFRAC ISO 15189.

Le recrutement d'une technicienne qualité en 2018 a permis au CNR de rentrer concrètement dans la démarche d'accréditation de ses activités.

-Audit interne 2019

Un audit interne au CHU de Bordeaux a été réalisé le 15 octobre 2019 sur la technique suivante : détection de *Helicobacter pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel.

Cet audit interne a permis de vérifier l'efficacité du système de management de la qualité au sein du CNR.

Afin de préparer au mieux cet audit, nous avons :

- remis à jour l'organigramme fonctionnel et créé la matrice des compétences des biologistes, des techniciens de laboratoire et des ingénieurs ;

- mis à jour les fiches de fonction décrivant les responsabilités, les autorités et les tâches de l'ensemble du personnel ;

- mis à jour la matrice des compétences dont découlent des fiches de postes par paillasse où sont indiquées les qualifications du personnel par poste. Ces qualifications reflètent la formation, l'expérience et les compétences nécessaires pour les tâches à réaliser ;

- créé les fiches de poste et de tutorat afin d'assurer la formation au poste de travail sous supervision d'un sénior ;

- rédigé des documents décrivant les processus Pré-analytique, Analytique et Post-analytique. Ils ont été intégrés au site web Sharepoint du CHU de Bordeaux pour y être gérés et consultés par l'ensemble du personnel du CNR ;

- finalisé en 2019 les habilitations de l'ensemble du personnel du CNR.

Un dossier de validation de méthode « Détection de *Helicobacter pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel » a été finalisé et est en attente d'envoi au COFRAC.

Au cours de cet audit interne, 19 écarts ont été relevés et tous ont été solutionnés au 31/12/2019.

-Contrôles de qualité internes (CQI)

Le CNRCH a mis en place un mode opératoire sur la gestion des CQI qui décrit l'ensemble des étapes de réalisation des contrôles de qualité internes relatifs :

- aux milieux préparés.

- aux antibiogrammes solides par diffusion en milieu gélosé et à la détermination de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique par la technique des bandelettes imprégnées. Ces contrôles se font à l'aide de souches de référence et selon la même procédure de réalisation des antibiogrammes et CMI que les souches cliniques (même processus et même acteurs).

- à la détection de *Helicobacter pylori* par PCR en temps réel.

Des documents qui s'appliquent à ce mode opératoire ont été mis à jour comme par exemple les instructions sur la préparation des milieux de culture, des fiches de traçabilité sur les contrôles des milieux (stérilité et activité microbiologiques) et des fiches de suivi pour les antibiogrammes des *Campylobacters* et *Helicobacters*.

-Contrôles de qualité externes (CQE)

Nous avons organisé en 2019 un contrôle de qualité de type RING-test pour le diagnostic de *H. pylori* avec le laboratoire de référence pour la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* du CHU NAMUR-Belgique (Y. Glupczynski), au Portugal (M. Oleastro), en Allemagne (Pr S Suerbaum), en Angleterre (Dr G Godbole). Nous avons également inclus dans ce RING-test le laboratoire Biomnis de Lyon (Dr X Naudot).

Nous avons participé à l'EEQ Européen organisé par le Statens Serum Institute, Danemark pour les Campylobacters. Nous avons participé en septembre 2019 à un EEQ du Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) pour les PCR *H. pylori*.

-Programme qualité pour 2020

Le CNRCH a fait sa demande d'extension le 4 octobre 2019 pour la détection de *Helicobacter pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel. Le CNRCH est en attente de l'audit d'extension par le COFRAC.

La priorité en 2020 sera donnée, pour le premier semestre, au dossier de validation de méthode en vue de l'accréditation de la culture de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques et des antibiogrammes. Le deuxième semestre sera consacré à l'accréditation de la culture, l'identification et les antibiogrammes des Campylobacters.

Dans le cadre des échanges qualités, un échange inter laboratoires va être mis en place pour les tests respiratoires à l'urée marquée au carbone 13 (Eurofins Biomnis, Cerba, CRNH Lyon).

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1.-Liste des techniques de référence

Les éléments surlignés en gris correspondent à ceux que nous souhaitons accréditer dès que possible.

Pour *Campylobacters* et bactéries apparentées (Arcobacters), les techniques disponibles sont :

- culture, identification standard (Gram, catalase, oxydase, etc...) et par galerie Api Campy ;
- identification au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF (E. Bessède *et al.* 2011).
- antibiogramme standard par diffusion et détermination des CMI par Etest ou par dilution en milieu gélosé ;
- PCR standard pour *C. jejuni* et *C. coli* ;
- PCR en temps réel pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus* ciblant le gène *gyrA* ainsi que pour *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* ;
- séquençage de l'ARNr 16S pour identification ;
- PCR en temps réel pour la recherche des mutations à l'origine de la résistance des *Campylobacters* aux macrolides à partir de souches ou de selles ;
- étude de marqueurs épidémiologiques de typage par RAPD, par MLST ou par séquençage de génome (NGS) ;
- recherche d'antigènes de *Campylobacter sp* dans des prélèvements de selles : tests immunochromatographiques rapides ou test ELISA ;
- sérologie *Campylobacter jejuni* par réaction de fixation du complément.

Pour *H. pylori*, les techniques disponibles sont :

- culture sur milieu gélosé et identification phénotypique standard ;
- PCR en temps réel basée sur le gène de l'ARNr 23S pour détecter *H. pylori* et les mutations à l'origine de la résistance à la clarithromycine selon la technologie développée au laboratoire (Oleastro M *et al.* 2003). La détection de ces mutations est également disponible si besoin, à l'aide de PCR temps réel commerciales ;
- antibiogramme de *H. pylori* ;
- PCR en point final (puis séquençage) de détection des mutations associées aux résistances aux fluoroquinolones (QRDR du gène *gyrA*), amoxicilline (*pbp1*) et rifamycines (*rpoB*) ;
- détection par PCR en temps réel des mutations au niveau de la boucle V de l'ADNr 16S associées aux résistances à la tétracycline ;
- PCR en point final de détection des principaux facteurs de virulence de *H. pylori* (*cagA*, génotypes de *vacA*, etc..) ;
- PCR en point final puis séquençage de l'ADNr 16S pour le genre *Helicobacter*, idem pour les gènes *gyrA* et *hsp60* dans un but phylogénétique ;
- spectrométrie de masse isotopique pour déterminer le ratio ¹³C/¹²C dans l'air expiré lors du test respiratoire à l'urée marquée au ¹³C ;
- sérologie par chimioluminescence (LIAISON® *H. pylori* IgG, commercialisé par Diasorin) et Immunoblot (Helicoblot 2-1, Genelabs, Singapour).
- recherche d'antigènes de *H. pylori* dans des prélèvements de selles : tests immunochromatographiques rapides ou test ELISA.

2.2.-Liste des techniques recommandées par le CNR

- Techniques recommandées pour la recherche d'infection à *Campylobacter sp*

La détection des *Campylobacter sp* fait partie des bactéries à rechercher systématiquement au cours des diarrhées infectieuses de plus de 48h au même titre que la détection de Salmonelles car la fréquence des *Campylobacter*, à l'origine d'infection intestinale, excède celles des Salmonelles dans notre pays.

Elle est donc indiquée notamment dans le cas de diarrhée aiguë sévère (hémorragique, syndrome dysentérique) ou rebelle (persistant plus de trois jours), aux âges extrêmes de la vie, en cas de terrain fragile, au retour d'un voyage en pays tropical et en cas de toxi-infection alimentaire collective.

La recherche des *Campylobacter sp* est le plus souvent réalisée à partir de selles ou d'hémocultures. D'autres prélèvements peuvent éventuellement permettre la culture de ces bactéries (liquides biologiques, biopsies) de manière fortuite ou orientée par l'examen microscopique.

Méthodes directes

-Coproculture :

Du fait de la fragilité des *Campylobacter sp*, les selles doivent être acheminées en moins de 2h au laboratoire ou conservées dans un milieu de transport de type Cary-Blair modifié avec de l'agar à une température comprise entre + 2°C et + 8°C.

La culture est effectuée sur un milieu riche, sélectif qui absorbe les radicaux oxygénés libres toxiques : milieu au sang (Skirrow, Butzler, par exemple) ou au charbon (Karmali, par exemple). Des milieux commerciaux existent, chromogènes ou non.

Bien que les *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni* et *C. coli* notamment) aient une température optimale de culture à 42°C, il est recommandé d'incuber les boîtes à environ 35°C. Ceci est extrêmement important car, d'une part, cette température n'a pas de conséquence négative sur la culture de *C. jejuni* et *C. coli* (les 2 principales espèces isolées) et, d'autre part, elle permet la culture de *C. fetus*, de *Arcobacter sp* et d'autres espèces de *Campylobacter sp* plus rares.

L'incubation est réalisée impérativement en atmosphère microaérobie (en sachet, en jarre, en enceinte dédiée) et les géloses doivent être incubées immédiatement après ensemencement. Les cultures sont observées après 24h, 48h et 72h d'incubation.

Les colonies de *Campylobacter* sont petites, lisses, luisantes, souvent étalées ou en nappe. L'identification au niveau du genre peut être faite sur la morphologie incurvée ou spiralée au microscope et sur la présence d'une oxydase.

L'identification au niveau de l'espèce a été historiquement réalisée à l'aide de tests phénotypiques simples (hydrolyse de l'hippurate pour *C. jejuni* par exemple). Cependant, ces tests ont perdu de leur intérêt depuis la généralisation de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est particulièrement performante pour l'identification des *Campylobacter*. Cette méthode permet d'identifier des genres et espèces difficilement accessibles par les tests d'identification conventionnels, notamment : *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, les *Campylobacter* «anaérobies» (*Campylobacter ureolyticus* notamment), les *Arcobacter* et les *Helicobacter* entérohépatiques dont pour certains la pathogénie est proche des *Campylobacter* (notamment *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter cinaedi*). L'identification systématique par spectrométrie de masse (méthode rapide et peu coûteuse) de plusieurs colonies (y compris d'aspect atypique) poussant sur les milieux sélectifs, augmente le taux de détection.

-Recherche dans les selles par méthode moléculaire ou immunoenzymatique :

Des tests ELISA et des tests immunoenzymatiques rapides sont maintenant commercialisés pour la détection de *Campylobacter sp* dans les selles. Les tests ELISA disponibles sur le marché ont une bonne concordance avec la PCR en temps réel. Ces tests sont plus sensibles que la culture tout en ayant une bonne spécificité. Leur inconvénient est d'être limité à la seule recherche de *C. jejuni* et *C. coli* et non aux autres *Campylobacter sp* et bactéries apparentées. Aussi, les tests ELISA commercialisés ont été recommandés pour la recherche de *Campylobacter sp* lors des tests réalisés en vue d'une transplantation fécale. Les tests rapides immunoenzymatiques ont également une bonne sensibilité et spécificité (5 à 20% de tests isolément positifs par rapport à la culture). Ils pourraient être utilisés en routine comme tests de dépistage avant culture. Cependant, ces tests sont à réserver à des populations cibles à forte prévalence potentielle d'infection à *Campylobacter* : diarrhées communautaires aiguës fébriles.

La recherche par amplification génique est maintenant commercialisée dans des trousseaux multiplexés permettant la détection de nombreux entéropathogènes dont *C. jejuni* et *C. coli*. Ce type d'approche commence à être réalisé en routine dans certains laboratoires équipés notamment d'appareil de PCR multiplex syndromiques. L'extraction de l'ADN ne pose en général pas de problème car la charge bactérienne en *Campylobacter spp.* est importante, à condition d'utiliser un kit d'extraction adapté à l'élimination d'inhibiteurs de PCR souvent présents dans les selles. La PCR en temps réel est plus sensible que la culture et permet d'obtenir des résultats rapides. Les tests multiplexés permettent maintenant une stratégie de tri rapide des selles positives. Une interprétation clinico-biologique des résultats peut être réalisée après évaluation des performances de ces tests avec celle de la culture. Aucun test à ce jour n'inclut cependant la détection de *C. fetus* et des *Arcobacter*.

-Hémocultures et autres prélèvements :

L'utilisation de flacons d'hémoculture utilisant des systèmes de détection automatiques de la croissance bactérienne a permis d'améliorer la détection des bactériémies à *Campylobacter sp*. Les flacons dont l'examen microscopique évoque la morphologie de *Campylobacter spp.* doivent être repiqués en atmosphère microaérobie.

En dehors des épisodes digestifs, les infections systémiques à *Campylobacter sp* surviennent surtout chez les personnes âgées ou fragiles. Elles sont à l'origine d'une mortalité importante (15%) notamment celles à *C. fetus*.

Méthode indirecte

Le sérodiagnostic n'a d'intérêt qu'en cas de pathologie post-infectieuse de type arthrite ou syndrome de Guillain-Barré. Il peut se faire par ELISA (dosage des IgG et IgM) ou par réaction de fixation du complément (des tests commerciaux sont disponibles).

Antibiogramme des Campylobacters

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les critères proposés par le CA-SFM et harmonisés en fonction des critères proposés par l'EUCAST (CA-SFM/EUCAST 2018) :

-milieu MH-F : Mueller-Hinton + 5% sang de cheval défibriné et 20 mg/L de β -NAD ;

-inoculum : 0,5 McFarland ;

-incubation : atmosphère microaérobie, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, 24h. Si la culture est insuffisante après 24h, réincuber immédiatement et effectuer une lecture après 40-48h d'incubation ;

-lecture : mesurer les diamètres d'inhibition directement face à la boîte, couvercle retiré, éclairée par une lumière réfléchie. Ne pas tenir compte des images « fantômes » au sein des zones d'inhibition ;

-contrôle de qualité : *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

La résistance aux macrolides reste limitée, celle à l'amoxicilline-acide clavulanique ainsi qu'à la gentamicine est exceptionnelle.

Toute résistance observée à l'amoxicilline-acide clavulanique doit être vérifiée, d'une part, en vérifiant l'identification du genre et de l'espèce (confusion possible avec *Arcobacter sp*) et d'autre part en testant la sensibilité sur un autre lot de disques ou, à défaut, par bandelettes à gradient de concentration.

Des valeurs limites spécifiques (diamètre et CMI) doivent être utilisées pour déterminer la sensibilité de *C. fetus* aux fluoroquinolones, celles pour *Arcobacter sp* ne sont pas encore disponibles. Pour les *Arcobacters* les « cut-offs » utilisés pour les Entérobactéries sont recommandés pour catégoriser la sensibilité à l'ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine et gentamicine. Les macrolides et les tétracyclines ne sont plus catégorisés.

Les valeurs critiques sont indiquées dans les recommandations du CA-SFM.

-Techniques recommandées pour le diagnostic d'infection à *H. pylori*

Ces méthodes sont classées en « invasives » ou « non invasives », selon qu'elles nécessitent ou non des biopsies de la muqueuse gastrique antrale et fundique pratiquées au cours d'une fibroscopie gastro-duodénale.

Méthodes invasives

Ce sont les méthodes les plus sensibles et spécifiques. L'association des examens histologiques et des techniques bactériologiques (détection moléculaire ou culture) permet d'une part le dépistage des lésions pré-néoplasiques (atrophie, métaplasie, dysplasie) et néoplasiques (cancer, lymphome) et d'autre part la détection spécifique de la bactérie et la détermination de son profil de résistance aux principaux antibiotiques.

-Test rapide à l'uréase

Cette méthode est adaptée à une recherche rapide en salle d'endoscopie dès les biopsies effectuées. La forte activité uréasique de *H. pylori* est détectée en plaçant un fragment biopsique dans le milieu réactionnel d'une trousse commerciale *ad hoc*. La lecture doit être effectuée en 1h. Sa sensibilité est de 80%, sa spécificité de 95%. Ce test est réalisé sous la responsabilité de l'endoscopiste et à sa charge. Le principal intérêt de ce test est de permettre la mise en œuvre immédiate d'un traitement probabiliste en cas de résultat positif. Il n'est pas inscrit à la NABM.

-Examen anatomo-pathologique

C'est la méthode de détection la plus répandue. La fixation des biopsies par le formol assure une conservation et un transport simple et pratique vers le laboratoire d'anatomopathologie. La qualité des biopsies obtenues, leur nombre (5 sont recommandées) et l'expertise de l'examineur conditionnent les performances de cet examen. Sa valeur ajoutée est de visualiser la gastrite associée à l'infection et les lésions ou complications associées (atrophie, métaplasie, dysplasie, cancer, lymphome), et de classer la gastrite selon le score de Sydney (systèmes OLGA et OLGIM). L'autre avantage est de permettre la visualisation, de par leur morphologie caractéristique, de bactéries du genre *Helicobacter* rattachées au groupe *heilmannii* comportant des espèces non ou très difficilement cultivables.

-Examen bactériologique standard

Prélèvement, transport

Au cours de l'endoscopie gastrique, plusieurs biopsies sont prélevées dans l'antra à environ 3 cm du pylore et au niveau du tiers supérieur du fundus. Les échantillons doivent être adressés rapidement au laboratoire en utilisant un milieu de transport spécifique à +4°C (milieu Portagerm Pylori, BioMérieux) : le délai de transport doit être idéalement de 24h. Une autre solution est de congeler les biopsies immédiatement dans un tube sec et les acheminer en carboglace ou en azote liquide.

Broyage des biopsies

Il est conseillé de broyer les biopsies avec du matériel jetable (microtube + pilon) dans un bouillon nutritif.

Examen microscopique

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame colorée par la méthode de Gram. *H. pylori* apparaît comme un bacille incurvé, ou spiralé à Gram négatif. La sensibilité de l'examen microscopique est de 75%.

Mise en culture

C'est la méthode la plus spécifique. Elle permet de déterminer la sensibilité de la bactérie isolée aux antibiotiques. Sa sensibilité peut atteindre 95% si les étapes de la phase pré-analytique sont optimales. Ses inconvénients sont liés aux exigences du transport des biopsies au laboratoire et au délai prolongé de réponse car cette bactérie a une croissance lente.

Le produit de broyage estensemencé sur un milieu constitué d'une base gélosée (milieux cœur-cerveau, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Brucella, par exemple) additionnée de 10% de sang (mouton, cheval ou humain). Des suppléments sélectifs sont utilisés pour inhiber la croissance de contaminants occasionnels. Une gélose prête à l'emploi est commercialisée par bioMérieux, elle présente une bonne sensibilité et une bonne sélectivité.

L'incubation est réalisée rapidement en atmosphère microaérobie, humide, à environ 35°C +/- 2°C. En primoculture, les colonies n'apparaissent pas avant 3 jours. Les primocultures doivent être incubées 10-12 jours avant d'être déclarées négatives. Dès l'apparition d'une pousse bactérienne, les colonies doivent être repiquées afin d'éviter l'apparition rapide de formes coccoïdes non subcultivables.

L'identification à l'espèce est facile sur les critères d'exigence culturale (microaérobie), de par l'aspect incurvé ou spiralé au Gram et de la présence d'une activité uréasique, oxydasique et catalasique. La spectrométrie de masse MALDI-TOF utilisant les bases de données commerciales ne permet pas l'identification de *H. pylori* du fait de la grande diversité des souches rencontrées.

Selon les recommandations HAS de 2017, la gastroscopie avec envoi des biopsies pour examen histopathologique et culture (+/-PCR) est recommandée en première intention pour les patients avec symptômes orientant vers une pathologie digestive haute notamment :

- syndrome ulcéreux ;
- dyspepsie chez un patient > 40-45 ans et/ou en cas de symptômes d'alarme (dont dysphagie, amaigrissement, anémie) ;
- anémie ferriprive ou carence en vitamine B12 sans cause trouvée ;
- patients avec facteurs de risque de cancer gastrique : personnes > 40-45 ans, apparentées à un patient ayant eu un cancer gastrique ;
- autres facteurs de risque : lymphome gastrique du MALT ;
- intervention bariatrique prévue.

Détection moléculaire

La PCR en temps réel permet de façon beaucoup plus rapide que la culture la détection spécifique de *H. pylori* à partir des biopsies gastriques. Des troupes diagnostiques commercialisées et performantes, sont disponibles et donnent un résultat en 2 à 4h. La sensibilité est supérieure à celle de la culture. L'automatisation de l'extraction en facilite la réalisation. Ces troupes renseignent toutes sur la présence de l'infection et des mutations associées à la résistance aux macrolides.

Une troupe utilisant une PCR multiplex suivie d'une hybridation sur bandelette est aussi disponible et permet la recherche des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones en plus des macrolides.

La détection de *H. pylori* par PCR n'est pas encore inscrit à la NABM.

Un format de PCR temps réel utilisable pour PCR sur échantillon de selles est disponible en France (Pichon M *et al.*, J Clin Microbiol 2020).

Méthodes non invasives

-Test respiratoire à l'urée marquée

Ce test est basé sur l'activité uréasique de *H. pylori*. Il détecte la production de CO₂ marqué au carbone 13 à partir d'urée ¹³C ingérée par le patient. Le test doit être réalisé à jeun, avant tout traitement ou au moins 4 semaines après la fin d'un traitement antibiotique et à 2 semaines de l'arrêt des inhibiteurs de la pompe à proton. Le ¹³CO₂ est détecté dans l'air expiré, juste avant et 30 min après l'ingestion de l'urée marquée, par spectrométrie de masse ou infrarouge. Les prélèvements sont adressés aux laboratoires équipés sans conditions particulières de transport. La sensibilité et la spécificité de ce test dépassent 95%. Il est particulièrement recommandé pour le contrôle de l'efficacité du traitement d'éradication. Le ¹³C étant un isotope naturel non radioactif, ce test peut être réalisé sans danger chez l'enfant et les femmes enceintes.

-Sérologie

De nombreuses trousse diagnostiques utilisant les techniques ELISA, chimiluminescence ou Western-blot sont commercialisées mais seulement 4 ELISA ont une sensibilité et une spécificité supérieures à 90% selon une étude de l'ANSM (ex-AFSSAPS) et sont donc recommandées. A l'opposé, les tests de diagnostic rapide immunochromatographiques et ceux utilisant de la salive ou des urines ne sont pas recommandés du fait de leurs performances médiocres. La sérologie est peu coûteuse et de réalisation facile. Elle est recommandée comme test diagnostique en cas d'ulcère hémorragique, d'utilisation récente d'inhibiteur de la pompe à protons (IPP), d'antibiotiques ou en cas de charge bactérienne faible (atrophie gastrique et lymphome du MALT) car les autres tests peuvent être faussement négatifs. Cependant, elle ne permet pas de distinguer une infection active d'une infection ancienne à cause de la persistance fréquente des anticorps après un traitement antibiotique efficace. Elle n'est donc pas utilisée pour le contrôle d'éradication. L'HAS recommande la sérologie comme test diagnostic de première intention dans les cas suivants :

Personnes ou patients sans symptôme digestif :

-< 40-45 ans, apparentés à un patient ayant eu un cancer gastrique ;

-ou avec antécédent d'ulcère sans preuve d'éradication de *H. pylori* (y compris avant prise d'AINS ou d'aspirine à faible dose) ;

-ou avec purpura thrombopénique immunologique.

En cas de positivité, il est recommandé de pratiquer une endoscopie avec envoi de biopsies pour culture et PCR.

-Recherche de *H. pylori* dans les selles

H. pylori est éliminé dans les selles sous forme non viable, ce qui rend possible la détection de son ADN par amplification génique. La limite de cette recherche est la présence d'inhibiteurs de la *Taq* polymérase dans les échantillons. Des formats de PCR adaptés aux selles commencent à être commercialisés et permettent la détection à la fois de la bactérie et des mutations associées à la résistance aux macrolides.

Une autre méthode de recherche est la détection d'antigènes spécifiques de cette bactérie par technique ELISA ou immunochromatographique dans les selles. Les tests utilisant des anticorps monoclonaux doivent être utilisés. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont légèrement inférieures à celles du test respiratoire à l'urée marquée. Ils sont donc recommandés pour le contrôle d'éradication quand le test respiratoire n'est pas disponible ou peu praticable (enfants).

Ces tests ne sont pas inscrits à la NABM.

-Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les critères proposés par le CA-SFM et harmonisés en fonction des critères proposés par l'EUCAST (CA-SFM/EUCAST 2018) :

-milieu MH-10% sang de mouton ou gélose Schaedler vit K1 ;

-inoculum : 3 McFarland ;

-incubation : atmosphère microaérobie, 35°C, 48h. Si la culture est insuffisante après 48h, réincuber immédiatement et effectuer une lecture après 72h d'incubation ;

-lecture : mesurer les CMI à l'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette de Etest. Ne pas tenir compte des images « fantômes » au sein des zones d'inhibition ;

-contrôle de qualité : *Helicobacter pylori* CCUG 17874.

Selon les recommandations du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, du CNR *Helicobacter* et du CA-SFM, les antibiotiques qui doivent être testés (en CMI uniquement) sont la clarithromycine et la lévofloxacine. Il n'est pas nécessaire de tester l'amoxicilline car cette résistance est rare, ni le métronidazole du fait du manque de reproductibilité des résultats de CMI et de sa signification clinique limitée. La sensibilité à la tétracycline et aux rifamycines peut être testée en seconde intention bien que les résistances soient rares.

Les valeurs critiques sont indiquées dans les recommandations du CA-SFM.