



Rapport annuel d'activité 2021

Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters année d'exercice 2020

Responsable scientifique : Pr Philippe Lehours

Adjoint : Dr Emilie Bessède

Responsable administratif : Mr David Karle

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

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. Malgré la crise du COVID, l'activité Campylobacter a augmenté en 2020, en particulier l'activité de saisie des laboratoires privés du réseau de surveillance sur le site Campy.Internet. Le nombre de cas d'infections saisi sur ce réseau provenant de données de PCR syndromiques nous montre l'importance de ces approches et leurs conséquences potentielles dans la surveillance épidémiologique de ces infections. Une publication relative à l'évaluation de l'un de ces nouveaux kits de PCR a été publiée. Un appareil de PCR syndromique a été installé au CNR.

Pour l'année 2020, *C. jejuni* reste l'espèce majoritairement isolée de selles suivie par *C. coli*. La troisième bactérie isolée majoritairement de selles est *C. fetus*, à égalité avec *Arcobacter butzleri*. *C. fetus* reste l'espèce la plus invasive. Contrairement aux souches invasives de *C. jejuni* qui proviennent à part égale des volailles et des ruminants, nos travaux d'attribution de sources appliqués aux souches non invasives proviennent majoritairement de la volaille. Les travaux d'attribution de sources, publiés en 2020 pour *C. coli*, démontrent que le réservoir volaille est également très important pour cette espèce. Les résistances aux antibiotiques restent relativement stables par rapport à 2019, même si pour la première fois le pourcentage de résistance aux fluoroquinolones chez *C. jejuni* dépasse celui chez *C. coli*. Nous identifions pour la première fois en France des souches porteuses de méthylases associées à la résistance aux macrolides et observons en 2020 une diversification des espèces de *Campylobacter sp* incluant une potentielle nouvelle espèce. Un nouveau kit de détection des antigènes de Campylobacter dans les selles a été testé et les résultats publiés.

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 2020 grâce en particulier au recrutement de nouveaux correspondants. L'année 2020 confirme la stabilisation de la résistance primaire aux macrolides et aux fluoroquinolones. De rares souches résistantes à l'amoxicilline ou à la rifampicine ont été identifiées en 2020. Notre participation à un protocole de surveillance français et à un réseau de surveillance Européen nous permet de comparer nos données internes au CNR avec des données obtenues sur tout le territoire national et européen. L'année 2020 a été marquée par une forte adhésion de nos correspondants à nous fournir des renseignements cliniques associés à l'envoi de biopsies gastriques. 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. Des nouveaux kits de détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles ont été testés et les résultats publiés. La PCR de détection de *H. pylori* dans les selles semble poser des problèmes techniques à résoudre avant de pouvoir intégrer cette approche dans l'arsenal diagnostique de cette infection.

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.

1-Missions et organisation du CNR

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	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Biologiste	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Émérite, vacataire
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 (80%)

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-Hélicobacters, en insistant sur quelques éléments clés de l'année 2020.

Éléments clés 2020 :

- Malgré la crise sanitaire, l'activité Campylobacters et *H. pylori* du CNRCH a continué d'augmenter au cours de l'année 2020. Notre réseau de correspondants Campylobacter a été élargi nous permettant de couvrir l'intégralité du territoire français.
- Le CNR a proposé au CASFM d'adapter certains seuils d'interprétation.
- Nous avons publié une étude sur l'attribution de sources des souches de *C. coli*.
- Les biologistes du CNRCH ont été impliqués dans la co-organisation du 28^{ème} congrès du GEFH en janvier 2020 à Annecy (F Mégraud, P Lehours, E Bessède) et du 33^{ème} congrès de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group (EHMSG) (F Mégraud), qui s'est tenu en virtuel en septembre 2020.
- Nous avons prévu d'organiser en mars 2020 une journée de travaux pratiques et de conférence à destination des correspondants du CNRCH. Ces journées ont été malheureusement annulées à cause du premier confinement national.
- Nous avons changé de système informatique en décembre 2020 (passage sous GLIMS, société MIPS) et préparé le paramétrage pour un envoi automatisé des résultats du CNR sur des adresses sécurisées type MSsanté ou Apcript (à développer en 2021).

Responsabilités scientifiques :

-P Lehours

- Assistant Editeur de Frontiers in Microbiology.
- Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters.
- Reviewer pour articles scientifiques en moyenne un/mois.
- Editeur associé de Frontiers in Microbiology et de Microbial Drug Resistance.

-E Bessède

- Membre du CA du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters.
- Reviewer pour articles scientifiques en moyenne un/mois.

-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.
- Reviewer pour articles scientifiques en moyenne un tous les 10 jours.
- Editeur du numéro spécial du journal *Helicobacter* : The Year in *Helicobacter* 2020.
- Participation au Hp Genome Project de l'Institut National du Cancer du National Institutes of Health Américain.
- 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).

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 avec quelques nouveautés :

- mise en place de la PCR syndromique BD MAX (Becton Dickinson) pour le diagnostic des diarrhées bactériennes des services d'urgences adultes et pédiatriques au CHU de Bordeaux ;
- évaluation de l'iSeq 100 pour la stratégie NGS au CNRCH ;
- mise en place sur le site Campy.Internet des saisies de résultats des PCR syndromiques ;
- changement de système informatique (passage de TD micro à Glims), et modification de la gestion de la biothèque (diminution du nombre de tubes de congélation, mise en place d'une biothèque centralisée).

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 les performances de ce nouveau réactif pour détecter les *Campylobacters* dans les selles.

Cent dix échantillons ont été analysés : 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 test rapide CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ en suivant les instructions du fabricant et par une méthode moléculaire (PCR r-Biopharm 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 (TRC) : 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.

Sur les 110 selles testées, 53 étaient positives selon le TRC. Réalisée seule, la culture a manqué 5 cas alors que le CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ les a tous détectés.

Le CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ a montré une sensibilité de 96,2% et une spécificité de 94,5%.

Ce test est très facile à utiliser, et ne nécessite aucune automatisation spécifique. Son principal avantage est la rapidité à obtenir un résultat permettant si besoin une prise en charge médicale adaptée.

L'interne qui a effectué ce travail a soutenu sa thèse en septembre 2020 sous la direction de E Bessède.

Ce travail a été publié : J Franco, L Bénéjat, A Ducournau, F Mégraud, P Lehours, E Bessède. Evaluation of CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ rapid membrane enzyme immunoassay to detect *Campylobacter* spp. antigen in stool samples. Gut Pathog 2021. Jan 22;13(1):4. doi: 10.1186/s13099-021-00400-0. (article accepté en 2020).

2-Bilan de la mise en place du BD MAX au CHU de Bordeaux

Le CNRCH loue depuis juillet 2020 l'automate BD MAX de la société Becton Dickinson et le met à disposition du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin pour des PCR bactériennes entériques.

Seules les selles des services des urgences adultes et pédiatriques sont testées en routine à l'aide le réactif BD MAX bactéries entériques (BD MAX Enteric Bacterial Panel, réf. 442963) qui détecte *Campylobacter* sp (*C. jejuni* et *C. coli*), *Salmonella* sp, *Shigella* sp/*E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et *E. coli* stx1/stx2.

Les selles sont testées le jour de leur arrivée au laboratoire. Pour chaque selles positive pour un entéropathogène, le personnel technique du CNR récupère les selles et l'ADN extrait sur BD MAX pour congélation.

La mise en culture est ciblée sur le résultat de la PCR sauf pour les *Campylobacters* et les *Arcobacters* qui sont recherchés par culture systématiquement. En effet et selon le fournisseur, seuls *C. jejuni* et *C. coli* sont détectés par cette technique, les *Arcobacters* ne le sont pas.

La recherche des *Yersinia* s'effectue en parallèle sur gélose sélective.

Au 24 mars 2021, sur 74 selles détectées positives sur BD MAX, 48 selles étaient positives à *Campylobacter* sp (64,9%), 16 selles positives à *Salmonella* sp (25,7%), 9 à *E. coli* stx1/stx2 (12,2%), 1 à *Shigella*/EIEC (1,35%) et 1 à *Campylobacter* sp + *Salmonella* sp (1,35%).

Toutes les salmonelles détectées par PCR ont été isolées par culture. Seules 42 des 49 selles positives à *Campylobacters* étaient également positives en culture (85,7%). Deux des 6 faux négatifs en culture pour *Campylobacter* correspondaient à des selles positives sur BD MAX avec un Ct>30 : ceci est conforme à notre étude publiée en 2019 (Gueudet T et al., J Clin Med 2019).

Pour les 42 selles positives à *Campylobacters* en culture, on retrouvait 35 *C. jejuni* et 7 *C. coli*. Aucune selle négative en BD MAX n'était positive à d'autres espèces de *Campylobacter* sp dans cette série.

Ces résultats démontrent la pertinence des résultats obtenus sur BD MAX pour la détection des entéropathogènes bactériens responsables de diarrhées aiguës communautaires. Comme attendu les *Campylobacters* dominent l'épidémiologie de ces infections. Les services cliniques apprécient d'obtenir en quelques heures un résultat leur permettant d'ajuster si besoin la prise en charge thérapeutique de leurs patients.

Nous devons travailler en interne à ajuster les conditions préanalytiques et analytiques afin d'améliorer les performances de la culture des *Campylobacters* (ici 14,3% de faux négatifs par rapport à la PCR). Nous devons également déterminer les étapes critiques (envoi, conservation, méthodes d'ensemencement et d'incubation).

3-Evaluation de réactions croisées de détection des *Campylobacters* sur automate BD MAX

Chaque année nous recevons de nos correspondants environ 4% de bactéries autres que *C. jejuni* et *C. coli* isolées de selles. Devant certains cas de « faux négatifs » par culture, certains utilisateurs souhaitent connaître les possibles réactions croisées avec des espèces et genres bactériens apparentés.

Le CNR a testé courant 2020 sur BD MAX, à partir de suspensions bactériennes, les possibles réactions croisées vis à vis de *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, *C. ornithocola*, *C. armoricus*, *A. butzleri* et *A. cryaerophilus* (2 souches de collection par bactérie).

Quelques amplifications artéfactuelles, et non reproductibles d'un essai à un autre, ont été obtenues pour *C. lari* et *C. ornithocola*.

Ces résultats, même s'ils méritent d'être contrôlées sur des échantillons de selles, montrent que la PCR BD MAX est très centrée sur *C. jejuni* et *C. coli* et ne détecte pas les autres espèces.

Les utilisateurs qui effectuent des cultures ciblées sur le résultat de la PCR doivent accepter de sous-estimer de 4% la réalité de l'épidémiologie des infections digestives à *Campylobacters* et bactéries apparentées.

L'analyse des données saisies par nos correspondants sur le site Campy.Internet confirme ces conclusions.

Travaux relatifs aux infections à *Helicobacter sp*

1-Evaluation de différentes techniques d'extraction d'ADN pour PCR *H. pylori* dans les selles avec le kit Amplidiag® *H. pylori*+ClariR (Mobidiag, Espoo, Finlande).

L'équipe du Pr C Burucoa a publié un article en 2019 (Pichon *et al.*, J Clin Microbiol 2020) démontrant la possibilité de détecter *H. pylori* (et les mutations associées à la résistance à la clarithromycine) par PCR temps réel dans les selles à l'aide du kit Amplidiag® *H. pylori*+ClariR.

En collaboration avec le CHU de Poitiers, l'objectif de cette étude fut de tester différentes techniques d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de selles et d'évaluer l'influence de cette étape très importante sur la qualité des résultats. L'objectif second était de proposer aux laboratoires d'analyses un éventail de solutions techniques leur permettant de mettre en place cette analyse dans de bonnes conditions.

Matériel :

-selles Bordeaux (n=40) issues d'un protocole de 2015 interne au CNR : statut *H. pylori* connu basé sur la biopsie gastrique. Stockage à sec en tube de 2ml d'aliqots de selles à -80°C.

-selles Poitiers (n=40) issues de la précédente étude publiée en 2020 : statut *H. pylori* connu basé sur la biopsie gastrique. Stockage en tube ENAT, à -80°C.

Méthodes :

-extractions des ADN au CNR sur MagNA Pure 96 (Roche), colonne QIAamp FAST Stool (Qiagen) et automate Arrow (Nordig) sur 12 selles (ou moins selon la quantité disponible) positives pour *H. pylori* de Bordeaux.

-extractions des ADN au CHU de Poitiers sur Easy Mag (bioMérieux).

-PCR temps réel sur automate CFX96 (Biorad) à l'aide du Kit Amplidiag® *H. pylori*+ClariR V1 ou V2 (commercialisée début 2020).

Résultats de l'étude préliminaire sur un nombre limité de selles (n=9 à 12) obtenus avec le V1 du kit :

MagNA Pure	Qiagen	Arrow	Easy Mag
5 pos / 9 selles testées (55,6%)	8 pos / 12 selles testées (66,6%)	3 pos / 12 selles testées (25%)	9 pos / 9 selles testées (100%)
Soit 4 faux neg	Soit 4 faux neg	Soit 9 faux neg	Soit 0 faux neg

Tous les résultats positifs ont montré une parfaite concordance de détection des infections par *H. pylori* sauvage (n=7), résistant (n=4) et double population (sauvage + résistant) (n=1).

Nous confirmons par ce premier essai les excellents résultats obtenus avec l'extraction Easy Mag, une moins bonne performance pour les ADN extraits sur MagNA Pure et colonne Qiagen et de très mauvais résultats pour des ADN extraits sur automate Arrow.

Tests complémentaires :

Tous les ADN restant à tester ont été analysés au CNR à l'aide de la V2 du kit Amplidiag® *H. pylori*+ClariR. Malheureusement, même sur les ADN extraits sur automate Easy Mag, il a été impossible de reproduire les précédents résultats.

Des contacts ont été pris avec le laboratoire Mobidiag pour tenter de comprendre l'origine du problème.

Dans l'attente d'une solution, la PCR de détection de *H. pylori* dans des échantillons de selles ne doit pas être utilisée en routine avec la version actuelle du kit commercialisé par Mobidiag.

2-Evaluation de nouveaux composés à action antibactérienne

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.

Le Dr Marc Maresca (ISM2, Biosciences, UMR CNRS 7313, service 342, Université Aix-Marseille) a sollicité le CNR pour tester *in vitro* l'activité anti *H. pylori* de 5 molécules mimant les peptides (appelées SMAMP) : SH13, SH14, BT61,

BT62, BT52 à 4 mg/ml (concentration initiale) dans de l'eau ultra pure stérile.

Les SMAMP doivent être manipulés stérilement et gardés à 4°C dans leur tube d'origine en verre.

Les CMI de ces composés sur *H. pylori* ATCC et souches cliniques humaines initialement retrouvées par nos collaborateurs étaient de l'ordre de 1,5 à 6,25 µg/ml (détermination en milieu liquide).

Les 5 SMAMP reçus ont été testés sur les souches SS1 et premSS1 par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de disque. Même aux concentrations les plus élevées, aucune activité n'a été malheureusement retrouvée.

3- Diagnostic de l'infection à *H. pylori* à partir d'estomac inclus en paraffine (bilan 2019-2020)

Le CNRCH est parfois sollicité par des correspondants extérieurs pour évaluer la présence de bactérie du genre *Helicobacter* au sein de biopsies incluses en paraffine. Le bilan ci dessous récapitule les résultats obtenus depuis 2019 pour 3 cas.

-Cas 1 :

Contexte : patient ayant reçu 2 traitements d'éradication, sérologie *H. pylori* négative, mais *H. pylori* vu en coloration après fibroscopie avec biopsies en février (faite sous IPP) et test respiratoire positif en avril.

1 bloc datant du 12/10/2020, 2 blocs datant du 28/01/20.

-Cas 2 :

Contexte : PCR *H. pylori* négative, présence de *H. pylori* à l'examen anatomopathologique.

1 bloc paraffiné, biopsie duodénale du 11/04/2019.

-Cas 3 :

Contexte : suspicion sur l'examen anatomopathologique de bactéries du genre *Helicobacter* et de « type Heilmanii ». 2 blocs datant du 30/11/2018.

Pour ces 3 cas les ADN ont été extraits avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen).

Sur ces ADN, les PCR suivantes ont été réalisées : PCR *H. pylori* en temps réel du CNR, une PCR en point final ciblant l'ADNr16s du genre *Helicobacter*, une PCR temps réel commerciale pour *H. pylori* (kit Amplidiag® *H. pylori*+ClariR (Mobidiag, Espoo, Finlande)).

Les résultats étaient les suivants :

-Cas 1 : faiblement positif à *H. pylori* seulement pour le bloc du 12/10/2020 avec la PCR temps réel du CNR ; faiblement positif en PCR point final 16S à *Helicobacter sp* pour les 3 blocs ; positif à *H. pylori* avec le kit Amplidiag® pour les 3 blocs.

-Cas2 : positif à *H. pylori* avec la PCR temps réel du CNR.

-Cas3 : positif à *H. pylori* pour les 2 blocs avec la PCR temps réel du CNR (avec un des 2 blocs très faiblement positif à cause d'une dégradation de l'ADN). Coloration hemalun-eosine et Gram effectuée sur des coupes ne confirme pas la présence de bactéries évocatrices de *Helicobacter du groupe Heilmanii*.

Conclusion

Il est possible de déterminer la présence de *H. pylori* ou du genre *Helicobacter* sur des estomacs conservés en bloc de paraffine.

L'échantillon ne doit pas être trop ancien car l'ADN se dégrade au cours du temps, empêchant une bonne détection de la bactérie si elle est présente.

2.3-Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Nous n'avons pas été sollicités pour transférer nos techniques vers d'autres laboratoires. 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 ;

-une fiche concernant la culture des Campylobacters à partir de prélèvements de selles ;

-de nouvelles versions des fiches de renseignements : Feuille de renseignements biopsie *Helicobacter pylori* ; Feuille de renseignements souche *Helicobacter pylori* ; Feuille de renseignements souche *Campylobacter* ; Feuille de renseignements antigènes *Helicobacter pylori* ; Demande de sérologie *Campylobacter*.

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-gefh-1.pdf>.

Ils ont également participé activement à l'élaboration d'une fiche pratique d'éradication par antibiotique de l'infection à *H. pylori* : mise en ligne courant 2020 sur le site internet du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters : <http://www.helicobacter.fr/wp-content/uploads/2021/03/Fiche-HP-specialistes-2021.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.

En 2020, nous avons répondu en France à 16 demandes d'envoi représentant 63 souches et effectué 1 envoi d'ADN de différentes espèces d'Epsilonprotéobactéries.

En septembre 2020, deux souches de *C. coli* résistants au chloramphénicol ont été envoyées, à leur demande, au National Food Institut-Technical University of Danemark.

2.4-Collections de matériel biologique

Nous avons en 2020 transféré 257 souches de *Campylobacter* de l'année 2016 vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux : 121 issues d'hôpitaux et 136 de laboratoires privés.

Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants habituels (cf tableau ci-dessous) en rajoutant pour 2020 les *Campylobacters* résistants aux macrolides. Les répartitions exactes du nombre de souches sont :

Critères	Laboratoires privés	Hôpitaux
Espèces autres que <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	72	82
<i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> issus d'hémoculture	31	15
Prélèvements autres que selles et hémoculture	7	5
<i>Campylobacters</i> résistants à l'érythromycine	11	34
Total	257	

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 2017 à 2021 (environ 4000 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=19). Ces souches ou leurs ADN sont disponibles gratuitement sur demande : cf tableau suivant.

Collection de souches de référence du CNRCH

Genre	Espèce	Sous-espèce	CCUG	ATCC	CIP	NCTC	NADC	Autres
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>		30485	49616	103493	12481		
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>		34397B					
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>						3257	
<i>Arcobacter</i>	<i>cryaerophilus</i>		17801	43158	104014	11885		
<i>Arcobacter</i>	<i>skirrowii</i>		10374	51132	103588			
<i>Campylobacter</i>	<i>armoricus</i>		73571		111675			
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>				70.70			
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>		11283	33559	70.80	11366		
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>				68.25			
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>		13144	33237	103757	11485		
<i>Campylobacter</i>	<i>curvus</i>		13146	35224	103747	11649		
<i>Campylobacter</i>	<i>curvus</i>		11644					
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>	6823A	27374	53.96	10842		
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>			A169			
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>venerealis</i>	33899	19438	68.29	10354		
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>venerealis</i>	33902		69.45			
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	<i>venerealis</i>			54.19			
<i>Campylobacter</i>	<i>hyointestinalis</i>	<i>lawsonii</i>			104686			
<i>Campylobacter</i>	<i>iguaniorum</i>							SP3
<i>Campylobacter</i>	<i>iguaniorum</i>							03.427
<i>Campylobacter</i>	<i>iguaniorum</i>							CNRCH 2012/706h
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	11284	33560	70.2	11351		DSM 4688
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>	81.176					
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>jejuni</i>						260.94
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>		19506/6824	700819	107370	11168		
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>		10937					
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>Hipp neg</i>						D 1712
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>Hipp neg</i>						D 1713
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	<i>doylei</i>	24567	49349	103751	11951		
<i>Campylobacter</i>	<i>lanienae</i>				106745			
<i>Campylobacter</i>	<i>lari</i>		23947	35221	102722	11352		
<i>Campylobacter</i>	<i>ornithocola</i>							CECT9147 LMG29815, WBE38
<i>Campylobacter</i>	<i>showae</i>				103970			
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	9728	35980	103749	11528		
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>	11289	33562	53.103	11367		
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.20			
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			54.22			
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv sputorum</i>			81.11			
<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum</i>	<i>bv fecalis</i>	12014					
<i>Campylobacter</i>	<i>upsaliensis</i>		14913 T	43954	103681	11541		
<i>Helicobacter</i>	<i>anseris</i>		52421					
<i>Helicobacter</i>	<i>bilis</i>		38995	51630	104752 T			
<i>Helicobacter</i>	<i>bizzozeroni</i>		35545		105233T			

<i>Helicobacter</i>	<i>brantae</i>	52420			
<i>Helicobacter</i>	<i>burdigaliensis</i>		111660		CECT 8850, CNRCH 2005/0566H
<i>Helicobacter</i>	<i>caesarodunensis</i>	68986	111406		DSM 105791
<i>Helicobacter</i>	<i>canadensis</i>	47163	700948	13241	
<i>Helicobacter</i>	<i>canadensis</i>			13242	
<i>Helicobacter</i>	<i>canis</i>		51401	104753 T	12739
<i>Helicobacter</i>	<i>cholecystus</i>		700242	105596	
<i>Helicobacter</i>	<i>cinaedi</i>	15433		105369	
<i>Helicobacter</i>	<i>fennelliae</i>		35683		
<i>Helicobacter</i>	<i>fennelliae</i>			11613	CLO 441
<i>Helicobacter</i>	<i>hepaticus</i>		51449		
<i>Helicobacter</i>	<i>labetoulli</i>	73475		111659 T	
<i>Helicobacter</i>	<i>muridarum</i>	29262	49282	104248	
<i>Helicobacter</i>	<i>mustelae</i>	25715	43772	103759 T	12198
<i>Helicobacter</i>	<i>nemestrinae</i>	44615		104754	
<i>Helicobacter</i>	<i>pametensis</i>	29255	51478	104249	
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>	33837	51801	104787	12824
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>	33838	51802		12826
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>	33839			
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>	33840			
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>	33842			
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>			13154	
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>			13156	
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>			13157	
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>	17874 T	43504	103995	11637
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>	18943		101260	

2.5-Activités d'expertise

Activités d'expertise concernant les *Campylobacters*

Notre CNR travaille avec un réseau de 153 laboratoires : 82 laboratoires privés et 71 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-sept de ces correspondants dont 14 hôpitaux (8 CHU, 6 CHG) saisissent 9 souches isolées sur le site internet du CNRCH via un accès sécurisé (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 2020.

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy.Internet	TOTAL
Nb.	1253	2498	4745	8946

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 6 laboratoires privés, 3 cliniques-polycliniques. Nous recevons également des prélèvements de différents CHU et CHG (Libourne, Hôpital Cochin, Hôpital Saint Antoine, Hôpital Armand Trousseau, Reims).

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de prélèvements reçus en 2020 par type de correspondants types de prélèvements.

	CHU de Bordeaux			Externes			TOTAL
	Biopsies gastriques, souches, ADN	Selles	Tests respiratoires	Biopsies gastriques, souches, ADN	Selles	Tests respiratoires	
Nb.	94	5	21	1821	1	33	1975
%	4,8%	0,3%	1,1%	92,2%	0,05%	1,7%	

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).

Nous avons également reçu 415 demandes de sérologies *H. pylori* dont 86% venant du CHU de Bordeaux (3 CH extérieurs seulement). Ces sérologies sont réalisées sur automate Liaison XL sur le chaîne Plateau Automatisé de Biologie Médicale (PABIM) du pôle de Biologie et Pathologie du CHU de Bordeaux.

2.6-Activités de séquençage

-Le CNRCH n'a pas accès à une plateforme de séquençage en interne au CHU. L'acquisition d'un appareil de séquençage haut débit est toujours au stade de projet au CHU de Bordeaux. En effet, le CHU de Bordeaux essaie 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 testé en 2020 un mini-séquenceur de la société Illumina, le iSeq 100 (cf bilan des

activités recherche 2020 au CNR). En 2021, le CNR souhaite investir de cet appareil. Il serait mis à disposition d'autres laboratoires du CHU de Bordeaux (Génétique, Virologie...) et du CNR IST (Pr C Bébéar). En attendant la mise en place de ce projet, la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Bordeaux ne possède plus d'appareil de séquençage haut débit et la plateforme Génome-Transcriptome (INRA Bordeaux-Aquitaine, Cestas-Pierroton) est difficilement accessible en routine.

-Le CNR a recruté en décembre 2018 Mr Quentin Jehanne qui 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* ». Son travail s'est poursuivi en 2020 sur ces mêmes thématiques.

-Le CNR a fait appel en 2020, comme les 2 dernières années, 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* et *Campylobacter*.

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 à nouveau 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>).

Le CNR a mis en place une «pipeline» d'analyse automatisée des génomes de *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Arcobacter*. Celle-ci sera présentée dans le bilan des activités de recherche 2020 du CNR.

3-Activités de surveillance

Éléments clés en matière de surveillance pour l'année 2020

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 2020 : le nombre de laboratoires participants a diminué mais nous couvrons l'intégralité des départements de l'hexagone. En 2020, les saisies sur le site Campy.Internet ont fortement augmenté. Comme initié en 2018, l'activité privée pour *H. pylori* est en progression.

Les trois principales espèces retrouvées chez l'homme sont *C. jejuni*, *C. coli* puis *Arcobacter butzleri*. En quatrième position on retrouve *C. fetus*. Pour la quatrième 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 et une plus grande diversité d'espèces des genres *Campylobacter* et *Helicobacter*. Les résistances aux antibiotiques chez *Campylobacter sp* sont globalement stables par rapport à 2020.

Le pourcentage de résistance primaire à la clarithromycine chez *H. pylori* stagne à un niveau proche de 20% en 2020. De rares cas de résistance à l'amoxicilline 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 153 laboratoires : 82 laboratoires privés et 71 laboratoires hospitaliers qui participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP. Vingt-sept de ces correspondants dont 14 hôpitaux (8 CHU et 6 CHG) participent également au réseau Campy.Internet.

Au total, nous répertorions 8922 souches de *Campylobacter* et bactéries apparentées. La carte de France ci-dessous montre la répartition par département (Figure 1).

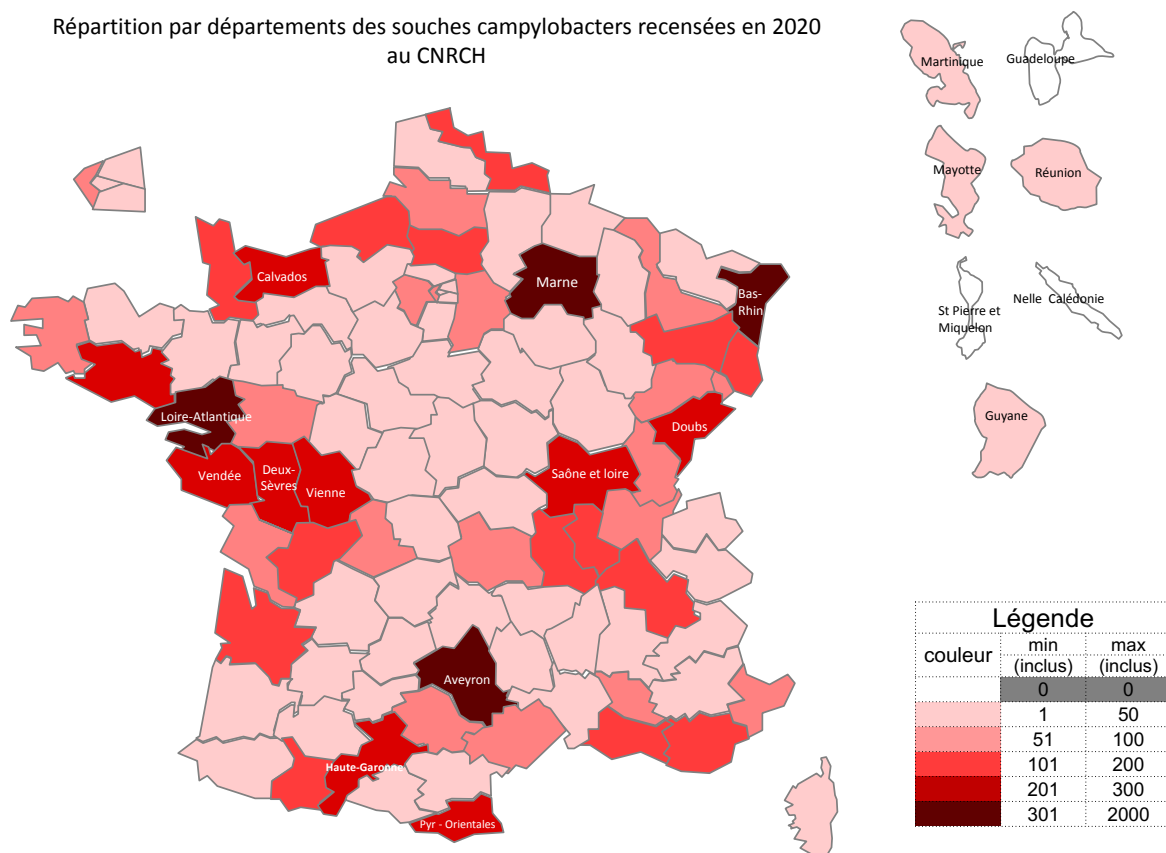


Figure 1. Répartition par département des souches de *Campylobacter* reçues au CNR en 2020 des réseaux Campy.COM, Campy.HOP ou déclarées en ligne par le réseau Campy.Internet. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de souches. Les noms des principaux départements participant au réseau sont indiqués.

-Evolutions du réseau par rapport à l'année 2019 :

Nous couvrons grâce à l'amplitude de répartition de nos correspondants toutes les régions de France dans leur définition. Pour 2020, grâce à une nouvelle campagne de sensibilisation, tous les départements métropolitains sont couverts, ainsi que 4 départements d'outre-mer (La Martinique, La Guyane, Mayotte et La Réunion).

Le nombre de souches reçues en 2020, viables ou non, a augmenté de 6,5% par comparaison à 2019 (cf. Tableau ci-dessous). Malgré la crise du COVID, l'activité Campy.HOP a progressé et la chute a été modérée pour le réseau Campy.COM. L'augmentation constatée en 2020 est liée à la forte activité de saisie du réseau Campy.Internet.

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 9 nouveaux laboratoires privés et 5 laboratoires

hospitaliers. Quatre laboratoires hospitaliers déjà présents dans notre réseau saisissent depuis 2020 sur Campy.Internet (CHU de Poitiers, CH de La Roche sur Yon, CH d'Antibes, CH d'Albi).

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy.Internet	TOTAL
Nb. en 2019	1173	3388	3837	8398
Nb. en 2020	1253	2948	4745	8946
Evolution en %	6,8%	-13,0%	23,7%	6,5%

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 137 sérologies en 2020, dont 41,6% provenaient de correspondants extérieurs au CHU de Bordeaux (CHU Strasbourg, CH Saint Brieux, APHP Hôpital Tenon, APHP Hôpital Saint Antoine). La moyenne d'âge des patients était de 46,3 ans avec un sex-ratio H/F de 1,6. Seules 5,8% étaient positives, 91,2% négatives et 1,4% interprétables (sérum anti-complémentaire notamment).

-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) », coordonnée 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).

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

Nous n'avons pas reçu en 2020 de demande, ceci étant probablement lié à la crise sanitaire.

3.1.2-Description du réseau de partenaires *Helicobacter pylori*

En 2020, le CNR a reçu 1975 prélèvements : 54 tests respiratoires provenant du dép. 33-CHU Bordeaux (n=21) et CH Libourne (n=2), du dép. 75 APHP (n=11), et du dép. 51-CHU Reims (n=20) et 1921 prélèvements (cf tableau ci-dessous) pour recherche de *H. pylori*. Ces prélèvements provenaient du CHU de Bordeaux et de 32 hôpitaux français. Nous avons également reçu des prélèvements de 6 laboratoires privés et 3 cliniques-polycliniques. La carte de France ci-dessous (Figure 2) montre la répartition par département des prélèvements reçus en 2020 au CNR (tests respiratoires inclus) pour recherche d'infection à *H. pylori*. Nos correspondants étaient répartis sur 30 départements en 2020 versus 28 en 2019 et 1 DOM (La Réunion).

Prélèvements	2019	2020
Biopsies	1811 (98,9%)	1885 (98,1%)
Souches	12 (0,7%)	22 (1,1%)
Selles	7 (0,4%)	6 (0,3%)
ADN	0 (0%)	8 (0,4%)
Total	1830	1921

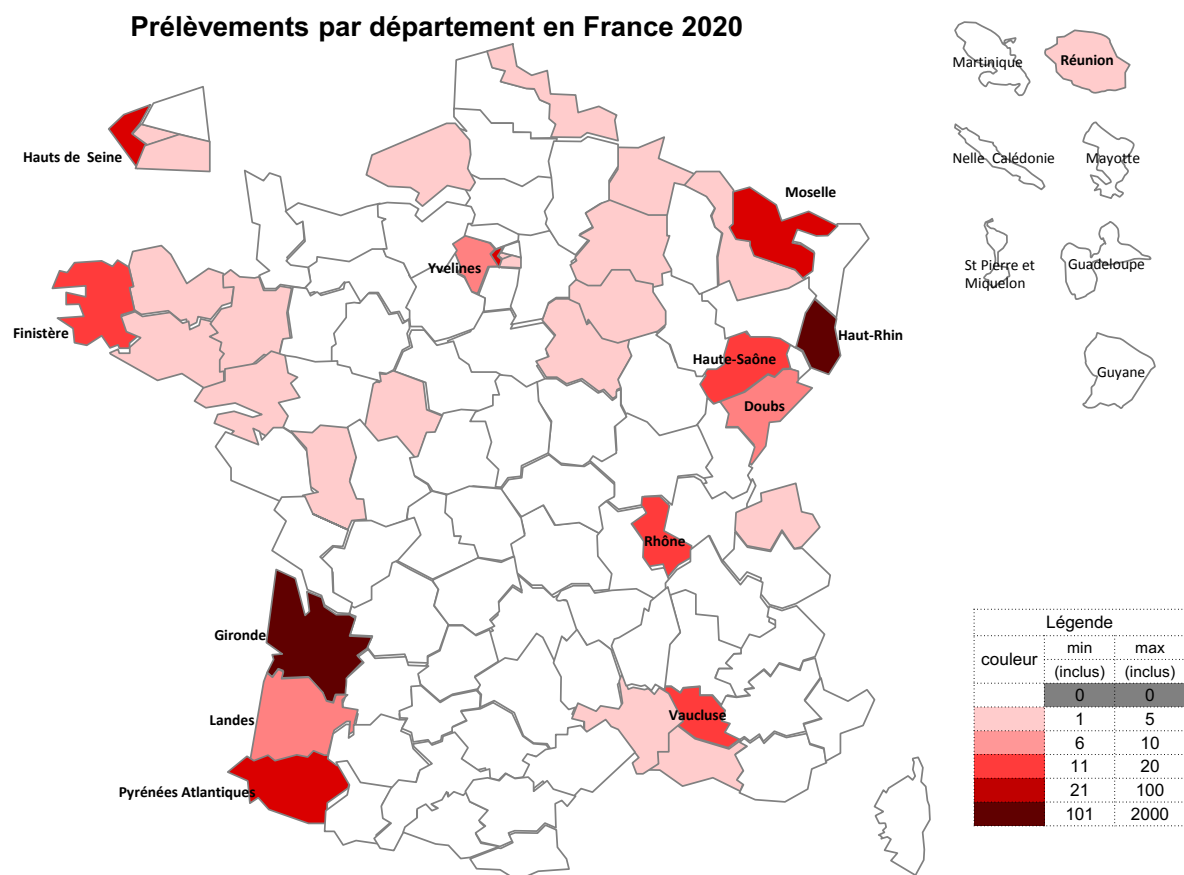


Figure 2. Répartition par département des prélèvements reçus au CNR en 2020 pour recherche d'infection à *Helicobacter pylori*. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de prélèvements (n=1975 au total).

-Evolution du réseau par rapport à l'année 2019 :

Par comparaison à 2019, notre activité concernant la recherche de *H. pylori* par culture et PCR n'a pas chuté malgré la période de confinement liée à la crise du COVID-19.

Nombre de prélèvements	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb. en 2019	146 (8%)	1684 (92%)	1830
Nb. en 2020	94 (4,9%)	1821 (95,1%)	1915 (+4,6%)

Notre activité est liée à celles des correspondants externes au CHU de Bordeaux qui représentent 95,1% en 2020 contre 92% en 2019.

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 ainsi que l'intégration de nouveaux correspondants extérieurs à la Gironde (notamment le CH de Colmar et l'Institut hospitalier Franco-Britannique) ;

-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 (98,1%), rarement des souches isolées (1,1%) et des selles (6 demandes en 2020 dont 5 internes au CHU de Bordeaux avec 16,7% testées positives). 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. La PCR a parfois été réalisée seule (sans culture) à cause du confinement de mars-avril 2020.

Quelques rares cas nous ont obligés à réaliser la culture isolément (réception d'une souche déjà identifiée). Les résultats suivants correspondent au nombre de patients dont les prélèvements ont été analysés : pour 175 patients, deux prélèvements antré et fundus avaient été envoyés, soit 1740 patients pour 1915 prélèvements reçus.

Nombre de patients (par technique)	2019	2020
Culture + PCR	1732 (99,1%)	1677 (96,4%)
PCR seule	9 (0,5%)	57 (3,3%)
Culture seule	6 (0,3%)	4 (0,2%)
Quantité insuffisante	0	2 (0,1%)
Total (Culture et/ou PCR)	1747	1740

Si l'on se base sur les résultats de la culture et/ou de la PCR, environ 33% des patients sont positifs pour *H. pylori*. Ceci est en augmentation par rapport à 2019 (28%).

Nombre de patients	<i>H. pylori</i> positif 2019	<i>H. pylori</i> positif 2020
Par culture et PCR*	488/1732 (28,2%)	551/1677 (32,9%)
Par PCR seule	3/9 (33,3%)	12/57 (21,1%)
Par culture seule	4/6 (66,7%)	0/4 (0%)
Total	495/1747 (28,3%)	563/1738 (32,4%)

*positivité basée sur le résultat de la PCR

Le nombre de tests respiratoires reçus en 2020 a chuté par rapport à 2019 avec seulement 54 analyses.

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) : 8946*

Nombre de souches ayant pu être étudiées dans les locaux du CNR : 4201**

428 souches/4201 (10,2%) n'ont pas donné de subcultures soit 3773 souches viables (dont 24 double populations). Cette proportion est en légère baisse par rapport à 2019 (11,03%).

*4745 dossiers saisis sur Campy.Internet, **dont 24 double populations (mélange de souches d'antibiotypes différents ou d'espèces différentes).

- Répartition par espèce et par nature de prélèvements :

Cette répartition est basée sur 8082 isolats (viables et en incluant les doubles populations).

Les trois principales espèces répertoriées sont *C. jejuni* (84,2%), *C. coli* (12,8%), *C. fetus* (1,0%), *Arcobacter butzleri* arrive en 4^{ème} position en 2020 (0,9%) (Tableau 1 et Tableau 2). *C. jejuni* et *C. coli* sont majoritairement isolés de selles : 98,8% et 99,6% respectivement. *C. jejuni* dépasse pour la quatrième année consécutive en nombre absolu *C. fetus* comme première espèce isolée de flacons d'hémocultures même si cela ne concerne que 1,1% des isolats de *C. jejuni* versus 53,1% des *C. fetus*. *A. butzleri* est majoritairement isolé de selles (94,7%). Les isolats de *C. lari* et *C. upsaliensis* sont rares, majoritairement isolés de selles (respectivement 73,7% et 85,7%). *C. upsaliensis* a été isolé dans 14,3% des cas d'hémoculture. Treize *Helicobacter* sp (4 *H. cinaedi*, 4 *H. pullorum*, 2 *H. caesarodunensis*, 1 *H. bilis*, 1 *H. canadensis* et 1 *H. canis*) sont répertoriés en 2020. Nous observons également en 2020 à nouveau une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 37 espèces rares ou nouvelles : 15 *C. ureolyticus*, 8 *C. rectus*, 2 *C. concisus*, 2 *C. ornithocola*, 2 *C. peloridis*, 1 *C. armoricus*, 1 *C. gracilis*, 1 *C. curvus*, 1 *C. hominis*, 1 *C. hyointestinalis*, 1 *C. lanienae*, 1 *C. showae* et 1 *Campylobacter* sp proche de *C. lanienae* qui correspond probablement à une nouvelle espèce.

La proportion de *C. fetus* diffère en fonction des réseaux : elle est de 2,5% pour le réseau Campy.HOP alors qu'elle n'est que de 0,3% pour le réseau Campy.COM.

La proportion de souches invasives de *C. jejuni* est également plus importante au sein du réseau Campy.HOP, 2,8%, contre 0,09% pour Campy.COM.

Lorsque l'information était disponible, nous avons relevé 45 discordances entre l'identification fournie par le correspondant et celle du CNRCH obtenue par MALDI-TOF Bruker (cf tableau disco). 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) sont systématiquement investiguées par séquençage des génomes correspondants (cf bilan NGS 2020 et projet 2021).

Discordances d'identification	N=45
<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>	29
<i>C. jejuni</i> / <i>C. fetus</i>	2
<i>C. coli</i> / <i>A. butzleri</i>	7
<i>C. coli</i> / <i>C. lari</i>	1
<i>C. lari</i> / <i>C. ornithocola</i>	2
<i>C. coli</i> / <i>C. ureolyticus</i>	1
<i>C. coli</i> / <i>Campylobacter</i> sp	1
<i>C. coli</i> / <i>H. pullorum</i>	1
<i>A. butzleri</i> / <i>Campylobacter</i> sp	1

- Répartition mensuelle des souches isolées :

Le graphique ci-dessous indique le nombre de souches répertoriées au cours de l'année 2020 pour l'ensemble des réseaux.

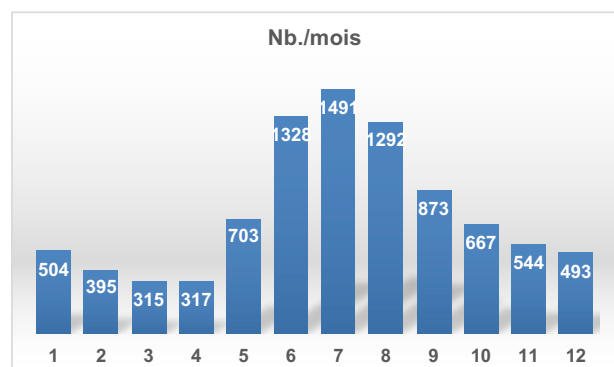


Tableau 1 : Répartition par espèce et par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2020. Treize *Helicobacter* sp (4 *H. cinaedi*, 4 *H. pullorum*, 2 *H. caesarodunensis*, 1 *H. bilis*, 1 *H. canadensis* et 1 *H. canis*) sont répertoriés en 2020. Nous observons également en 2020 à nouveau une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 37 espèces rares ou nouvelles : 15 *C. ureolyticus*, 8 *C. rectus*, 2 *C. concisus*, 2 *C. ornithocola*, 2 *C. peloridis*, 1 *C. armoricus*, 1 *C. gracilis*, 1 *C. curvus*, 1 *C. hominis*, 1 *C. hyointestinalis*, 1 *C. lanienae*, 1 *C. showae* et 1 *Campylobacter* sp proche de *C. lanienae* qui correspond probablement à une nouvelle espèce.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter. sp</i>	<i>Helicobacter. sp</i>	<i>Arcobacter. sp</i>	Total
Sang	74	4	43	1	4	1	1	7	6	0	141
Selles	6722	1030	33	71	14	11	6	12	7	1	7907
Biopsie	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3
Abcès & pus	1	0	1	0	0	0	0	14	0	0	16
Liquide	5	0	2	2	0	0	0	3	0	0	12
Autres	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3
Total	6803	1034	81	75	19	12	7	37	13	1	8082
%	84,2%	12,8%	1,0%	0,9%	0,2%	0,1%	0,1%	0,5%	0,2%	0,0%	100,0

Tableau 2 : Répartition en pourcentage des espèces par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2020.

Nature	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter. sp</i>	<i>Helicobacter. sp</i>	<i>Arcobacter. sp</i>	Total
Sang	1,1	0,4	53,1	1,3	21,1	8,3	14,3	18,9	46,2		1,7
Selles	98,8	99,6	40,7	94,7	73,7	91,7	85,7	32,4	53,8	100,0	97,8
Biopsie	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	2,7	0,0		0,0
Abcès & pus	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	37,8	0,0		0,2
Liquide	0,1	0,0	2,5	2,7	0,0	0,0	0,0	8,1	0,0		0,1
Autres	0,0	0,0	2,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0

Ces données confirment la saisonnalité habituelle et très marquée en 2020 des infections à *Campylobacters*. Même si nous recevons des souches tout au long de l'année, les mois de Mai à Septembre regroupent 63,7% des souches répertoriées en 2020 versus 57,1% en 2019.

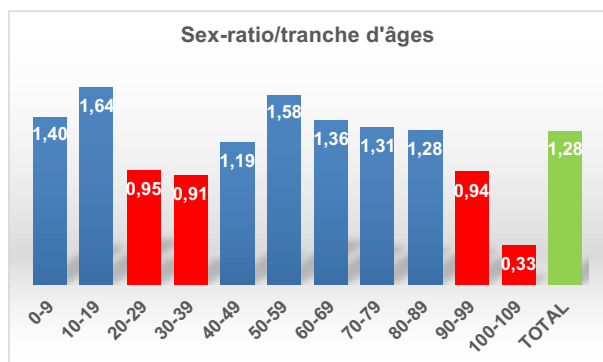
- Répartition par sexe :

Les chiffres ci-dessous tiennent compte des 8922 souches répertoriées viables.

Sexe féminin	3920	43,94%
Sexe masculin	5002	56,06%

La prédominance masculine est toujours marquée (sex-ratio H/F : 1,28 en moyenne).

Cette répartition est valable pour de nombreuses tranches d'âge sauf pour les 20-29 ans, 30-39 ans, 90-99 et 100-109 ans (cf figure ci-dessous). Ceci témoigne notamment, pour les deux premières tranches d'âges 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	4685	72,5	1532	62,4	6217	69,69
Enfants, <15 ans et ≥1 an	1713	26,5	790	32,2	2503	28,05
Nourrissons <12 mois et ≥1 mois	59	0,91	115	4,7	174	1,95
Nouveaux nés <1 mois	9	0,14	19	0,8	28	0,31
Total (Nb.)	6466		2456		8922	

Les infections à *Campylobacters* touchent toutes les tranches d'âge avec 28,05% de cas pédiatriques (<15 ans). La proportion de nourrissons (<12mois) est plus importante au sein du réseau Campy.HOP (4,7% versus 0,91% pour Campy.COM).

Tranches d'âges :

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 (%)	23,95	14,65	14,53	8,51	7,14	7,77	9,13	7,50	5,32	1,46	0,04
Campy. COM (%)	21,23	14,75	16,32	9,93	7,96	8,46	9,67	6,82	3,97	0,82	0,06
Campy. HOP (%)	31,11	14,37	9,81	4,76	4,97	5,94	9,13	9,28	8,88	3,14	-

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). La tranche

d'âge 0-29 ans représente 55,3% des infections à *Campylobacter* sp.

- **Répartition en fonction du type de malade** : Les données présentées ci-dessous concernent le réseau Campy.HOP, Campy.COM et Campy.Internet (soit 8922 cas).

Hospitalisation	n=1827	20,48%
Consultation	n=5341	59,86%
Non précisé	n=1754	19,66%

- **Voyage à l'étranger** : Une notion de voyage à l'étranger a été renseignée (Oui/Non) dans 4252 cas sur 8922 cas. Le pays, ou la région du monde, a été précisé dans 128 cas. Les principales régions concernées étaient l'Europe, l'Afrique, les Caraïbes et l'Asie (cf tableau ci-dessous).

Régions du monde	Nombre de cas	Détails
Europe	58	dont Espagne (17), Portugal (11), Italie (6)
Afrique	26	dont Afrique du Nord (17)
Asie	10	
Caraïbes	3	
Proche et Moyen Orient	7	
Inde Indonésie	7	
Amérique du Sud et Centrale	5	
Amérique du Nord	6	
Océanie	2	
Iles de l'océan indien	4	
TOTAL	128	

- **Contexte épidémique** :

Cas isolés	4604	51,6%
Cas groupés*	192	2,15%
Non précisé	4126	46,25%

*161 cas familiaux (85,85%), 23 cas en collectivités (11,98%), 8 non renseignés (4,17%).

Les infections à *Campylobacter* et bactéries apparentées sont donc principalement des cas isolés (lorsque l'information est disponible). Les cas groupés sont essentiellement familiaux, 63% d'entre eux surviennent entre mai et septembre : à noter que pour 2021, 35,9% de ces cas groupés ont été signalés en juillet et août. En 2020, 12 cas groupés ont été typés par RAPD : 9 à *C. jejuni* identiques, 2 à *C. coli* identiques, 1 à *C. jejuni* différent soit 8 cas familiaux et 4 cas TIAC.

- **Origine supposée de la contamination** : L'origine alimentaire supposée de la contamination était précisée dans 222 cas sur 8922, 2,49% contre 2,36% l'an dernier, (182 *C. jejuni*, 27 *C. coli*, 1 *C. lari*, 1 *C. fetus*, 3 *Campylobacter* sp) et provenait majoritairement de la viande (30,6% dont 15,3% de la volaille) et des plats préparés en restauration (23,9%). Pour 18 des 19 cas (78,95%) 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.

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

**Campylobacter* sp : 15 *C. ureolyticus*, 8 *C. rectus*, 2 *C. ornithocola*, 2 *C. concisus*, 2 *C. peloridis*, 1 *C. armoricus*, 1 *C. curvus*, 1 *C. gracilis*, 1 *C. hominis*, 1 *C. hyointestinalis*, 1 *C. lanianae*, 1 *C. showae*, 1 *Campylobacter* sp proche de *C. lanienae* (probable nouvelle espèce).

**Helicobacter* sp : 4 *H. cinaedi*, 4 *H. pullorum*, 2 *H. caesarodunensis*, 1 *H. bilis*, 1 *H. canadensis*, 1 *H. canis*.

**Arcobacter* sp : 1 *A. lanthieri*.

Ampicilline											
C.COM	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	* <i>Campylobacter. sp</i>	* <i>Helicobacter. sp</i>	* <i>Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	3203	521	19	9	11	6	1	5	4	0	3779
Intermédiaire	143	30	0	1	0	0	0	0	1	0	175
Résistant	1485	218	0	29	3	2	1	0	0	0	1738
Total	4831	769	19	39	14	8	2	5	5	0	5692
Résistance en %	30,7	28,3	0,0	74,4	21,4	25,0	50,0	0,0	0,0	0,0	30,5
Non testé C.COM	217	28	0	0	0	1	0	0	0	0	246
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	* <i>Campylobacter. sp</i>	* <i>Helicobacter. sp</i>	* <i>Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	1068	150	56	14	3	2	2	25	6	1	1327
Intermédiaire	53	17	0	0	0	0	0	0	0	0	70
Résistant	587	64	0	22	2	1	2	1	2	0	681
Total	1708	231	56	36	5	3	4	26	8	1	2078
Résistance en %	34,4	27,7	0,0	61,1	40,0	33,3	50,0	3,8	25,0	0,0	32,8
Non testé C.HOP	47	6	6	0	0	0	1	6	0	0	66
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	* <i>Campylobacter. sp</i>	* <i>Helicobacter. sp</i>	* <i>Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	4271	671	75	23	14	8	3	30	10	1	5106
Intermédiaire	196	47	0	1	0	0	0	0	1	0	245
Résistant	2072	282	0	51	5	3	3	1	2	0	2419
Total	6539	1000	75	75	19	11	6	31	13		7770
Résistance en %	31,7	28,2	0,0	68,0	26,3	27,3	50,0	3,2	15,4	0,0	31,1
Non testé TOTAL	264	34	6	0	0	1	1	6	0	0	312

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>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	2264	392	14	11	6	7	0	4	4	0	2702
Intermédiaire	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Résistant	0	1	0	14	0	0	0	0	0	0	15
Total	2264	393	14	25	6	7	0	4	5	0	2718
Résistance en %	0,0	0,3	0,0	56,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Non testé C.COM	2784	404	5	14	8	2	2	1	0	0	3220
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	1743	235	62	16	5	2	4	26	6	1	2100
Intermédiaire	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	4
Résistant	0	0	0	20	0	1	0	0	0	0	21
Total	1744	236	62	36	5	3	4	26	8	1	2125
Résistance en %	0,0	0,0	0,0	55,6	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,99
Non testé C.HOP	11	1	0	0	0	0	1	6	0	0	19
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	4007	627	76	27	11	9	4	30	10	1	4802
Intermédiaire	1	1	0	0	0	0	0	0	3	0	5
Résistant	0	1	0	34	0	1	0	0	0	0	36
Total	4008	629	76	61	11	10	4	30	13		4843
Résistance en %	0,0	0,2	0,0	55,7	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
Non testé TOTAL	2795	405	5	14	8	2	3	7	0	0	3239

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>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	1939	326	16	31	6	7	2	4	2	0	2333
Résistant	2893	446	3	8	8	1	0	1	1	0	3361
TOTAL	4832	772	19	39	14	8	2	5	3	0	5694
Résistance en %	59,9	57,8	15,8	20,5	57,1	12,5	0,0	20,0	33,3	0,0	59,0
Non testé C.COM	216	25	0	0	0	1	0	0	2	0	244
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	645	82	53	28	3	3	3	18	3	1	839
Résistant	1099	154	9	8	2	0	1	7	4	0	1284
TOTAL	1744	236	62	36	5	3	4	25	7	1	2123
Résistance en %	63,0	65,3	14,5	22,2	40,0	0,0	25,0	28,0	57,1	0,0	60,48
Non testé C.HOP	11	1	0	0	0	0	1	7	1	0	21
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	2584	408	69	59	9	10	5	22	5	1	3172
Résistant	3992	600	12	16	10	1	1	8	5	0	4645
TOTAL	6576	1008	81	75	19	11	6	30	10		7817
Résistance en %	60,7	59,5	14,8	21,3	52,6	9,1	16,7	26,7	50,0	0,0	59,4
Non testé TOTAL	227	26	0	0	0	1	1	7	3	0	265

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>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	4820	728	19		14		2	5			5588
Résistant	13	44	0		0		0	0			57
TOTAL	4833	772	19		14		2	5			5645
Résistance en %	0,3	5,7	0,0		0,0		0,0	0,0			1,0
Non testé C.COM	215	25	0	39	0	9	0	0	5	0	293
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	1734	213	62		5		4	24			2042
Résistant	12	23	0		0		0	1			36
TOTAL	1746	236	62		5		4	25			2078
Résistance en %	0,7	9,7	0,0		0,0		0,0	4,0			1,7
Non testé C.HOP	9	1	0	36	0	3	1	7	8	1	66
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	6554	941	81		19		6	29			7630
Résistant	25	67	0		0		0	1			93
TOTAL	6579	1008	81		19		6	30			7723
Résistance en %	0,4	6,6	0,0		0,0		0,0	3,3			1,2
Non testé TOTAL	224	26	0	75	0	12	1	7	13	1	359

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>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	2638	166	15		14		2	3			2838
Résistant	2194	607	4		0		0	2			2807
TOTAL	4832	773	19		14		2	5			5645
Résistance en %	45,4	78,5	21,1		0,0		0,0	40,0			49,7
Non testé C.COM	216	24	0	39	0	9	0	0	5	0	293
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	915	53	52		5		4	25			1054
Résistant	826	183	9		0		0	0			1018
TOTAL	1741	236	61		5		4	25			2072
Résistance en %	47,4	77,5	14,8		0,0		0,0	0,0			49,1
Non testé C.HOP	14	1	1	36	0	3	1	7	8	1	72
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	3553	219	67		19		6	28			3892
Résistant	3020	790	13		0		0	2			3825
TOTAL	6573	1009	80		19		6	30			7717
Résistance en %	45,9	78,3	16,3		0,0		0,0	6,7			49,6
Non testé TOTAL	230	25	1	75	0	12	1	7	13	1	365

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>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	4199	691	19	39	14	8	2	5	5	0	4982
Résistant	10	8	0	0	0	0	0	0	0	0	18
TOTAL	4209	699	19	39	14	8	2	5	5	0	5000
Résistance en %	0,2	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Non testé C.COM	839	98	0	0	0	1	0	0	0	0	938
C.HOP	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	1638	222	56	34	5	3	4	25	8	1	1996
Résistant	7	4	0	1	0	0	0	0	0	0	12
TOTAL	1645	226	56	35	5	3	4	25	8	1	2008
Résistance en %	0,4	1,8	0,0	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
Non testé C.HOP	110	11	6	1	0	0	1	7	0	0	136
TOTAL	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>C. lari</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>*Campylobacter. sp</i>	<i>*Helicobacter. sp</i>	<i>*Arcobacter. sp</i>	Total
Sensible	5837	913	75	73	19	11	6	30	13	1	6978
Résistant	17	12	0	1	0	0	0	0	0	0	30
TOTAL	5854	925	75	74	19	11	6	30	13	1	7008
Résistance en %	0,3	1,3	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Non testé TOTAL	949	109	6	1	0	1	1	7	0	0	1074

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)

La majorité des cas positifs (68,7%) avait entre 30 et 69 ans, majoritairement des femmes dans la quasi intégralité des tranches d'âge.

Ages	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	Total
Hommes	4	14	20	39	70	39	40	25	3	0	254
Femmes	6	18	22	54	67	61	45	33	2	0	308
Total	10	32	42	93	137	100	85	58	5	0	562
Ratio H/F	0,67	0,78	0,90	0,72	1,04	0,64	0,89	0,75	1,5	0	0,82

-Pour les 54 tests respiratoires reçus en 2020, le sex-ratio H/F (tous résultats confondus) était de 1,16 et la moyenne d'âge de 40,65 ans.

-Pour les 415 sérologies reçues en 2020, le sex-ratio H/F (était de 1,24 et la moyenne d'âge de 60 ans : 32,5% de ces sérologies étaient positives, 66% négatives ; 0,5% équivoques et 1% n'ont pu être réalisées (sérum icterique ou hémolysé).

-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 (cf rapport 2019). La concordance entre culture et PCR est montrée ci-dessous pour 2019 et 2020.

Culture	PCR	Nombre de patients 2019	Nombre de patients 2020*
+	+	415/1732 (24,0%)	383/1578 (24,3%)
-	+	73/1732 (4,2%)	81/1578 (5,1%)
-	-	1244/1732 (71,8%)	1144/1578 (70,6%)

*Les résultats des biopsies en provenance du CH de Colmar n'ont pas été intégrés dans ce tableau à cause de doutes sur les conditions préanalytiques (transport-congélation/décongélation).

La culture de *H. pylori* a sous-estimé 17,5% des infections par rapport à la PCR (CH Colmar exclu) (*versus* 15% en 2019). 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 (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 et répertoriée dans un classeur qualité. 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 2020. Nous indiquons les résultats obtenus pour les principales espèces identifiées en 2020 : *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 2020). 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* (31,7%) et *C. coli* (28,2%) : comme par le passé, la résistance est plus élevée chez *C. jejuni*. *C. fetus* reste parfaitement 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 pour *C. jejuni* (60,7%) dépasse pour la première année *C. coli* (59,5%). Il n'y a pas de différence entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP. La résistance de *C. fetus* à la ciprofloxacine diminue en 2020 soit 14,8% versus 27,2% en 2019 et 24% en 2018. Ceci est peut-être dû à la modification de «cut-off» spécifique à *C. fetus* pour cet antibiotique intégrée dans les recommandations du CA-SFM et maintenant largement appliqué.

La résistance à l'érythromycine reste à un niveau inférieur à 1% pour *C. jejuni*, *C. coli* étant comme par le passé plus résistant et en baisse par rapport à 2019 (7,3% en 2020). Les souches de *C. coli* du réseau Campy.HOP sont plus résistantes (9,7%) que celles du réseau Campy.COM (5,7%)

La résistance à la tétracycline reste à un niveau très élevé notamment pour *C. coli* (78,3%) et semble stagner pour *C. jejuni* (45,9%).

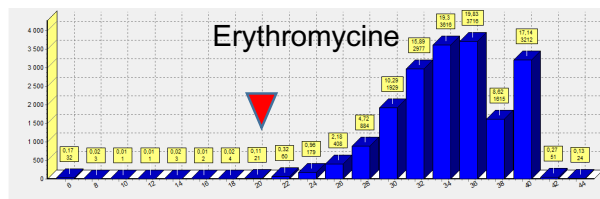
La résistance à la gentamicine reste anecdotique pour *Campylobacter* sp mais peut être rencontrée pour *C. jejuni* (0,3%) et *C. coli* (1,3%).

Le tableau ci-dessous récapitule, sur le format de l'ECDC, les phénotypes de sensibilité regroupés en 3 item :

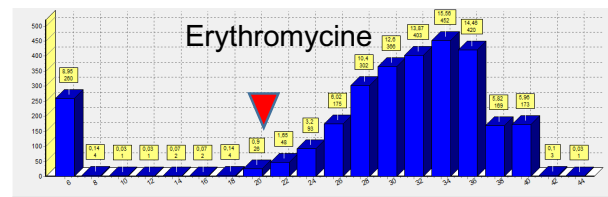
Phénotypes	<i>C. coli</i> (n=1010)*	<i>C. jejuni</i> (n=6586)*
Sensible tous les ATB	108 (10,7%)	1451 (22,0%)
Erythromycine et Ciprofloxacine-R	58 (5,7%)	17 (0,3%)
Résistant à tous les ATB**	2 (0,2%)	0 (0%)

*déduction faite des souches non testées sur Campy.Internet ; ** sauf amoxicilline-ac. clavulanique.

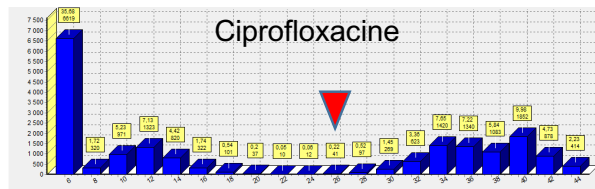
C. jejuni



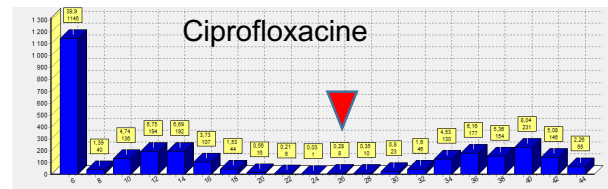
C. coli



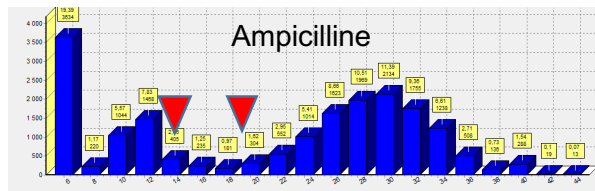
Ciprofloxacin



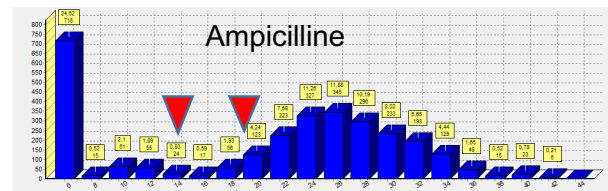
Ciprofloxacin



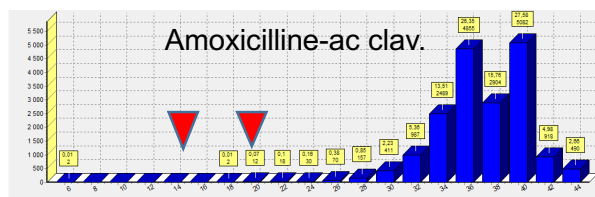
Ampicilline



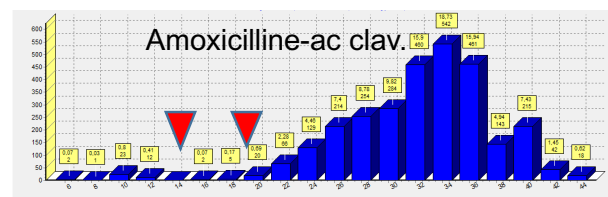
Ampicilline



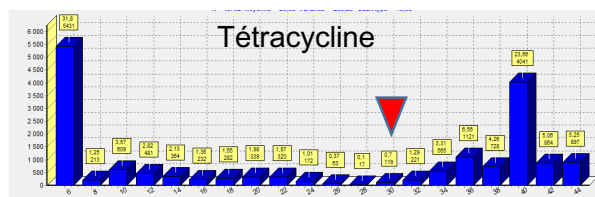
Amoxicilline-ac clav.



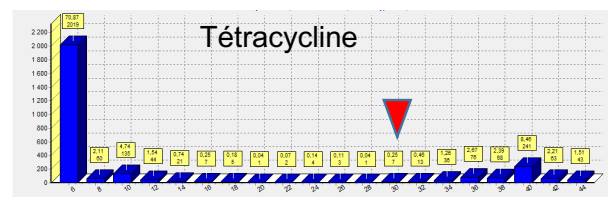
Amoxicilline-ac clav.



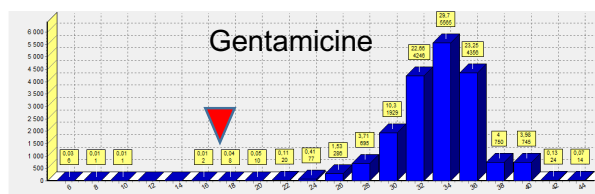
Tétracycline



Tétracycline



Gentamicine



Gentamicine

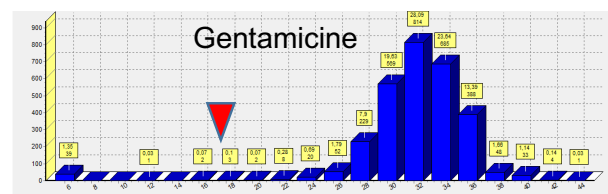
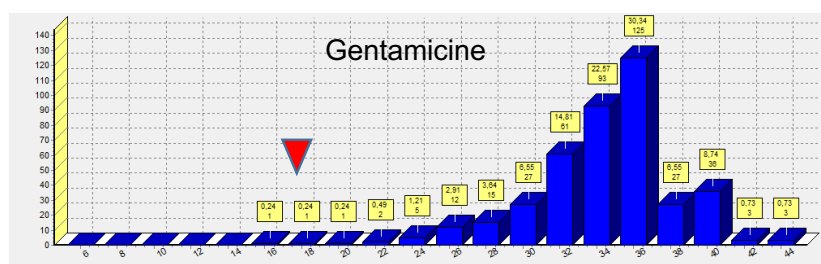


Figure 3. Distribution des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode des disques sur une série de 18755 souches de *C. jejuni* et 2905 *C. coli* isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2020.

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 selon le CA-SFM 2020. Données issues de la base du SIRWeb.



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 selon le CA-SFM 2020. Données issues de la base du SIRWeb.

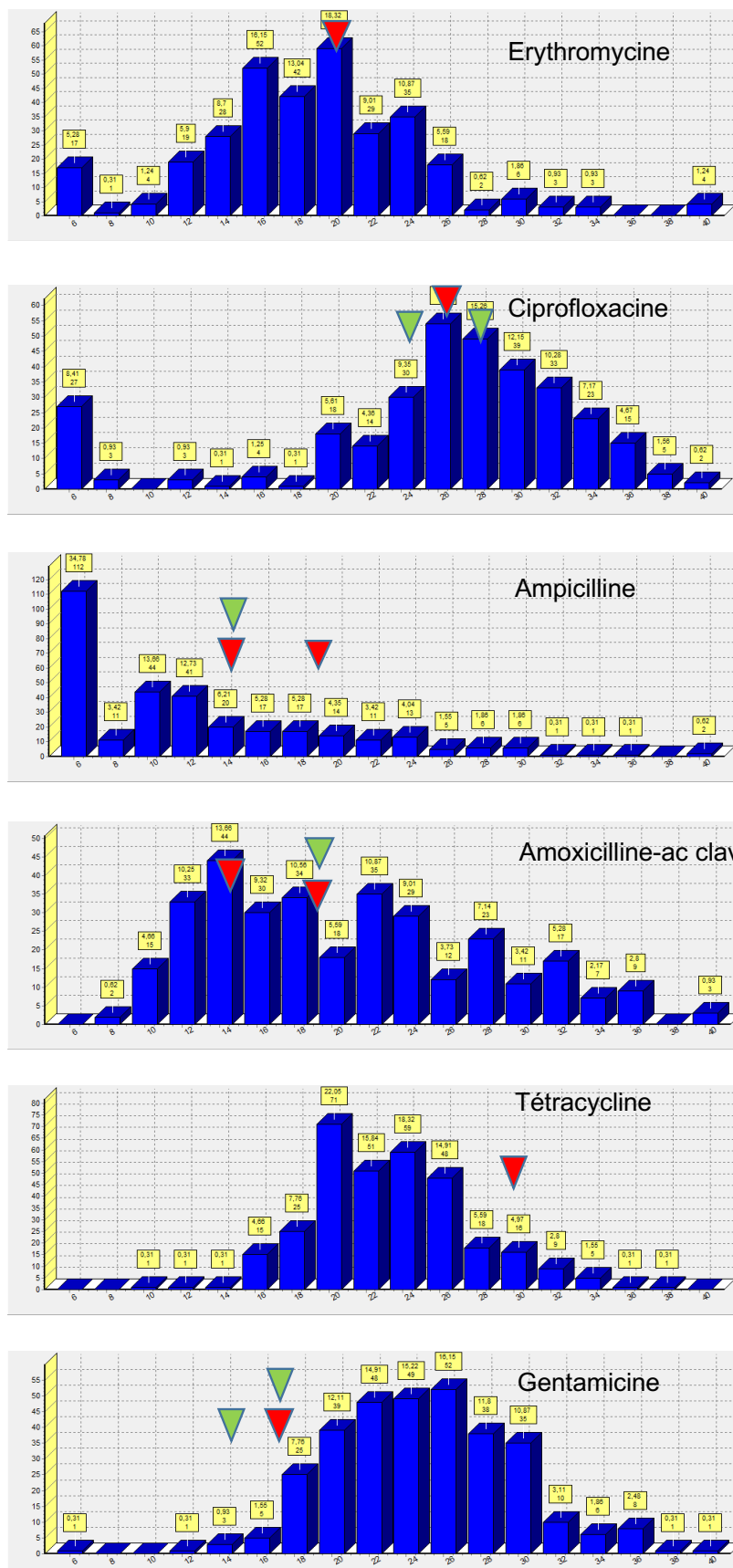


Figure 5. Distribution des diamètres d'inhibition obtenus par la méthode des disques sur une série de 322 souches de *Arcobacter* sp isolées entre le 01/01/2015 et le 31/12/2020.

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 *Campylobacter* 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 2020. Données issues de la base du SIRWeb.

-Tendances évolutives sur une période de 34 ans (Figure 6)

La résistance à la ciprofloxacine chez *C. coli* continue sa descente amorcée depuis 2012. En 2020, pour la première fois, la résistance à la ciprofloxacine est plus élevée chez *C. jejuni* que chez *C. coli*. Les résistances à la tétracycline sont stables 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.

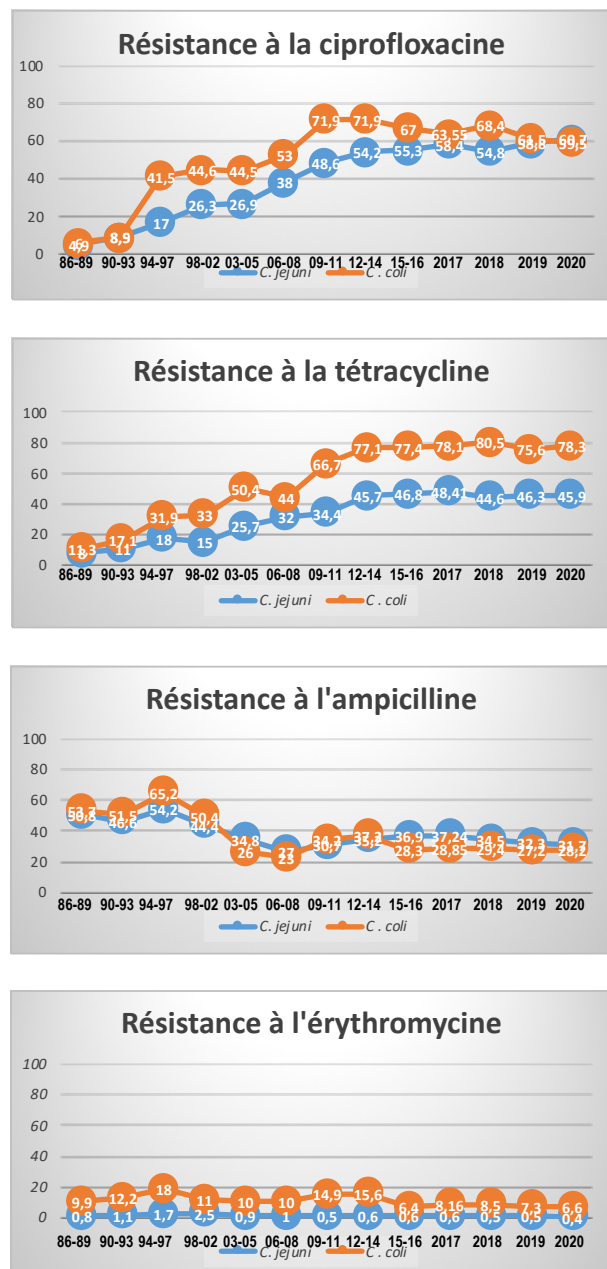


Figure 6 : Evolution de la résistance en France aux antibiotiques chez *C. jejuni* et *C. coli* sur une période de 34 ans. Les résultats sont exprimés en pourcentage.

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 2020, soit le milieu MH-10% sang de mouton (préparé au CNR), soit la gélose Schaedler vit K1 (bioMérieux), avec un inoculum 3 McF, par 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 2020, sur les 443 souches de *H. pylori* détectées par culture, 15 n'ont pas pu être testées à cause d'une subculture négative.

Molécule	2019 (Nb. et %R)	2020 (Nb. et %R)
Amoxicilline	5/415 (1,2%)	4/428 (0,9%)
Clarithromycine	134/415 (32,3%)	110/428* (25,7%)
Lévofloxacine	86/415 (20,7%)	73/428 (17,1%)
Métronidazole	223/415 (53,7%)	262/428* (61,2%)
Rifampicine	7/415 (1,7%)	4/428 (0,9%)
Tétracycline	2/415* (0,5%)	0/428 (0%)

*Discordance antre/fundus pour 2 souches concernant la clarithromycine et 1 souche concernant le métronidazole.

Conformément aux années passées, la résistance à l'amoxicilline, rifampicine et tétracycline est rare ou nulle 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.

Les principaux phénotypes de sensibilité étaient les suivants :

Phénotype	Nb.	%
Métronidazole-R	151	35,3
Tout-S	122	28,5
Clarithromycine-Métronidazole-R	61	14,3
Métronidazole-Lévofloxacine-R	27	6,3
Clarithromycine-R	20	4,7
Clarithromycine-Lévofloxacine-Métronidazole -R	19	4,4
Lévofloxacine-R	15	3,5
Clarithromycine-Lévofloxacine-R	5	1,2
Amoxicilline-Clarithromycine-R	1	0,2
Amoxicilline-Clarithromycine-Lévofloxacine-R	1	0,2
Amoxicilline- Clarithromycine- Lévofloxacine-Métronidazole-R	2	0,5
Lévofloxacine-Métronidazole-Rifampicine-R	2	0,5
Lévofloxacine-Rifampicine-R	1	0,2
Lévofloxacine-Métronidazole-Clarithromycine-Rifampicine-R	1	0,2
	428	100

S : sensible ; R : résistant

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 427 des 428 souches viables.

Les discordances sont rares entre phénotype et génotype : 0,5% uniquement de discordance majeure due à deux cas interprétés Résistant *in vitro* mais de génotype WT par PCR.

Phénotype clarithromycine	Génotype clarithromycine	2019 Nb. (%)	2020 Nb. (%)
Sensible	WT	269/411 (65,5%)	310/427 (72,6%)
	A2142-43G	2/411 (0,5%)	0/427 (0%)
	A2142-43G + WT	9/411 (2,2%)	8/427 (1,9%)
	A2142C + WT	0/411 (0%)	0/427 (0%)
Résistant	WT	1/411 (0,2%)	2/427 (0,5%)
	A2142-43G	10/411 (25,3%)	73/427 (17,1%)
	A2142C	1/411 (0,2%)	1/427 (0,2%)
	A2142-43G + WT	25/411 (6,1%)	33/427 (7,7%)

Pour 8 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 (1,9%). Dans 33 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 2019 et %	Nombre de patients (par génotype) en 2020 et %
WT	317/491 (64,6%)	420/563 (74,6%)
A2142-43G	130/491 (26,5%)	92/563 (16,3%)
A2142C	1/491 (0,2%)	1/563 (0,2%)
A2142-3G + WT	43/491 (8,8%)	50/563 (8,9%)
Total Résistants Clarithromycine par PCR	174/491 (35,4%)	143/563 (25,4%)

Comme par le passé, la mutation A2142-43G est la plus fréquente. La proportion de double population (WT+R) est stable en 2020 *versus* 2019 (8,9% versus 8,8%). 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 2020 et pour la deuxième année consécutive, la résistance primaire aux antibiotiques pour les souches isolées de biopsies gastriques en routine au CNRCH.

Nous disposons pour 2020 des renseignements cliniques associés à 1489 des 1740 prélèvements reçus (85,6%) dont 87,3% de patients naïfs et 13,2% de patients en échec de 1 ou plusieurs lignes de traitement d'éradication.

Pathologie	Nombre	% par pathologies	<i>H. pylori</i> POS*	% <i>H. pylori</i> POS
Gastrite	477	27,4	159	33,3
Epigastralgies	318	18,3	94	29,6
Non renseignée	251	14,4	112	44,6
Reflux	120	6,9	33	27,5
Anémies (fer-B12)	115	6,6	33	28,7
Dyspepsie non ulcéreuse	110	6,3	21	19,1
Autres étiologies	78	4,5	24	30,8
Ulcères	67	3,9	28	41,8
Chirurgie bariatrique/Sleeve	55	3,2	11	20,0
Douleurs abdominales	35	2,0	8	22,9
Diarrhées	30	1,7	8	26,7
Cancer (ou antécédents)	23	1,3	7	30,4
Oesophagite	22	1,3	5	22,7
Sérologie positive	22	1,3	15	68,2
Vomissements	10	0,6	2	20,0
MALT (ou antécédents)	7	0,4	2	28,6
	1740	100	562	32,3

*selon le résultat de la PCR

Sont surlignées en gris les pathologies pour lesquelles le pourcentage de patients *H. pylori* positif dépasse 30%.

Le pourcentage de résistance primaire aux macrolides était de 19,9% *versus* 47,8% en secondaire. Ces chiffres sont proches de ceux obtenus en 2019 et de ceux publiés dans le protocole de surveillance PHARE du CNR (cf paragraphe 3.5).

Aucune augmentation entre résistance primaire à la lévofloxacine (17,1%) *versus* secondaire (15,6%) est observée en 2020. Ceci est probablement dû au fait que la lévofloxacine n'est pas conseillée dans les traitements probabilistes.

Antibiotique	Résistance primaire	Résistance secondaire
Clarithromycine*	78/392 (19,9%)	44/92 (47,8%)
Lévofloxacine	45/291 (17,1%)	12/77 (15,6%)
Métronidazole	164/291 (62,4%)	64/77 (83,1%)
Tétracycline	0/291 (0%)	0/77 (0%)
Rifampicine	0/291 (0%)	2/77 (2,6%)
Amoxicilline	1/291 (0,4%)	3/77 (3,9%)

*clarithromycine : résultats basés sur la PCR.

Les pourcentages de résistance aux autres antibiotiques sont calculés pour les cas où la culture était positive et l'antibiogramme complet.

Les données présentées ci-après montrent la répartition des CMI pour 1555 souches de *H. pylori* et intègrent celles de 2020 (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 courant 2019 n'a pas influencé la répartition des CMI.

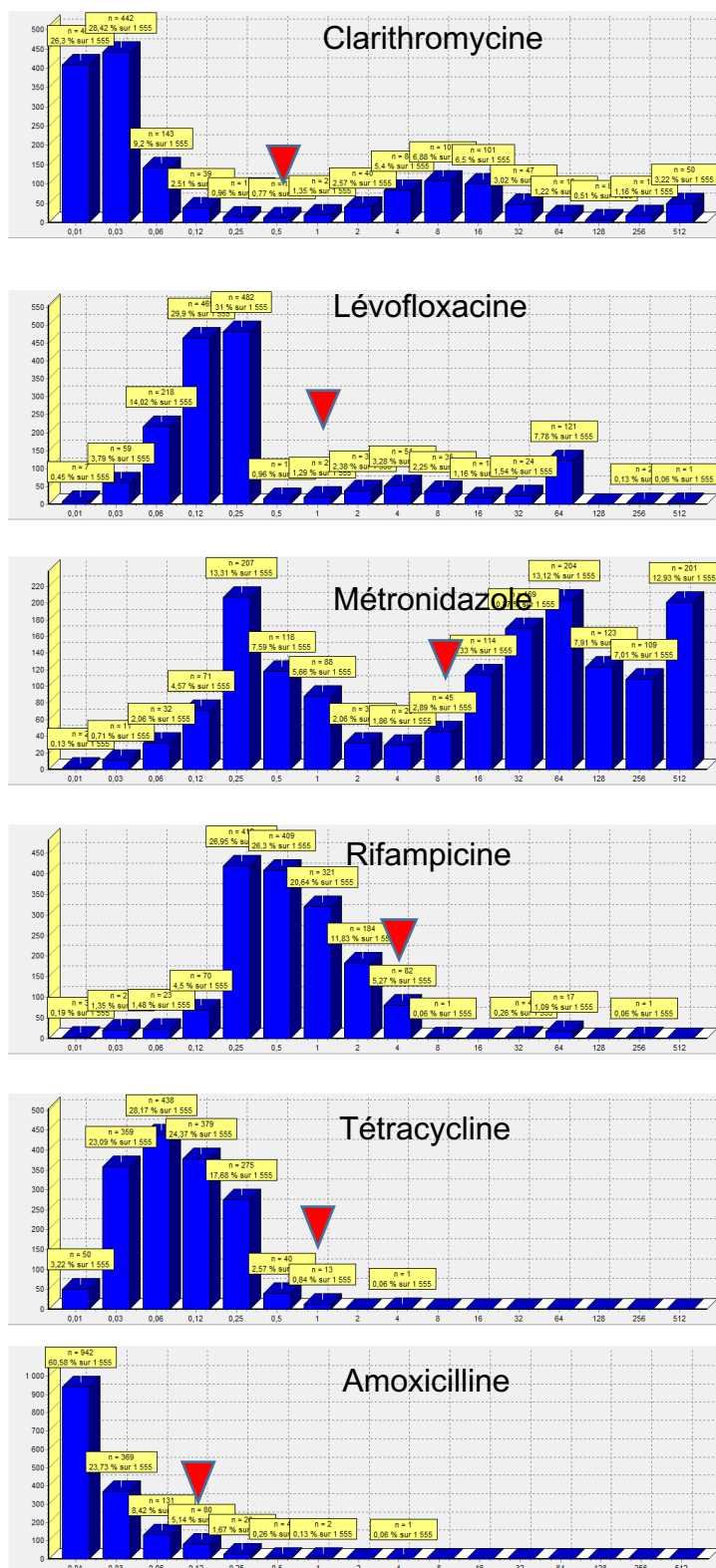


Figure 7. Distribution des CMI obtenues par la méthode du Etest sur une série de 1555 souches de *H. pylori* isolées entre le 01/01/2016 et le 31/12/2020

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 2020. 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 2019 et 2020 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.

La surveillance de la résistance aux antibiotiques de *H. pylori* a été réalisée en France en 2014, 2016 et 2018 selon la même méthodologie.

Dans cette étude observationnelle, des biopsies gastriques ont été obtenues par 62 gastro-entérologues sélectionnés au hasard dans 5 régions de France et envoyées au CNRCH où une culture, des tests de sensibilité aux antibiotiques ainsi qu'une PCR en temps réel ont été réalisés afin de détecter *H. pylori* et ses mutations associées à la résistance. Au cours de cette étude, 951 patients ont été inclus en 2018 : 55,3% de femmes, âge moyen: 52,4 ans $\pm$ 15,7, 71,6% nés en France. Parmi eux, 359 patients étaient *H. pylori* positifs à la fois par culture et PCR en temps réel, et 7 autres par PCR uniquement ; 244 étaient des patients naïfs, 110 patients précédemment traités et pour 5 les antécédents médicaux étaient manquants.

La résistance primaire à la clarithromycine était de 20,9% [16,3-26,4], à la lévofloxacine 17,6% [13,4-22,9] et au métronidazole 58,6% [52,3-64,6%].

La résistance secondaire à ces antibiotiques était de 56,4%, 22,7% et 87,3%, respectivement. Il n'y avait pas de résistance à l'amoxicilline ni à la tétracycline et une très faible résistance à la rifampicine (1,2%) chez les patients naïfs et traités a été observée.

La résistance primaire à la clarithromycine qui est passée de 22,2 à 20,3% entre 2014 et 2016 semble stable et cela peut être lié à une consommation stable de macrolides sur la période de 3 ans. La résistance primaire à la lévofloxacine était également relativement stable tandis que la résistance au métronidazole augmentait.

Il est intéressant de noter que chez les patients naïfs et traités, une résistance à l'amoxicilline a été rarement trouvée ainsi qu'une résistance à la rifampicine. De plus, la résistance à la tétracycline n'a jamais été détectée malgré l'utilisation de Pylera® qui est le seul traitement incluant cet antibiotique.

Ces données ont été publiées : F Mégraud, C Alix, P Charron, L Bénéjat, A Ducournau, E Bessède, P Lehours. Survey of the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in France in 2018 and evolution during the previous five years. *Helicobacter* 2021 Feb;26(1):e12767. doi: 10.1111/hel.12767. Epub 2020 Oct 22. (accepted in 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 et 2019.

L'année 2019 a été consacrée à la vérification des données, l'année 2020 à l'analyse et à l'écriture d'un article scientifique. Ces résultats ont été présentés oralement au Congrès de l'European Helicobacter & Microbiota Study Group et à l'United European Gastroenterology Week en 2019. Courant 2020, 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 ont été réalisées.

Les taux de résistance pour les 1211 patients adultes inclus étaient de 21,4% pour la clarithromycine, 15,8% pour la lévofloxacine et 38,9% pour le métronidazole, et étaient significativement plus élevés dans les pays d'Europe centrale / occidentale et méridionale que dans les pays d'Europe du Nord.

Une association significative a été trouvée entre la résistance à la clarithromycine chez *H. pylori* et la consommation dans la communauté des macrolides ($p = 0,0003$) et des macrolides à action intermédiaire ($p = 0,005$), et entre la résistance à la lévofloxacine et la consommation de quinolones ($p = 0,0002$) et les quinolones de deuxième génération ($p = 0,0003$). Conclusion : cette étude confirme la corrélation positive entre la consommation d'antibiotiques dans la communauté et la résistance à *H. pylori* dans les pays européens. Une augmentation limitée de la résistance a été notée par rapport à la décennie précédente mais qui ne permet pas l'utilisation de la clarithromycine et de la lévofloxacine sans test de sensibilité pour le traitement de *H. pylori*.

Ce travail a été accepté pour publication dans Gut le 23 mars 2021 : Gut. 2021 Apr 9;gutjnl-2021-324032. doi: 10.1136/gutjnl-2021-324032. Online ahead of print. PMID: 33837118

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

En 2020, le gène *rpoB* de 4 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>
5671	≥32	D530N
5674	≥32	H540Y
5753	≥32	H540N
5785	≥32	D530N

Les mutations retrouvées sont celles présentes au niveau de l'acide aminé 530 (2 souches) avec substitution d'un D par N et de l'acide aminé 540 (2 souches) avec substitution d'un H par N ou Y.

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

En 2020, aucune mutation non décrite n'a été identifiée. Il est tout de même 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 2020, 2 souches de *H. pylori* présentaient une CMI à l'amoxicilline supérieure à 0,125 mg/L, c'est-à-dire catégorisées résistantes : 0,25 mg/L et 0,38 mg/L.

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 2 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 0,38 mg/L
- les mutations S543R, N562Y, T593A et G595S ont été retrouvées uniquement chez la souche avec une CMI à 0,25 mg/L

D'autres mutations non décrites ont été identifiées. Par exemple, l'insertion d'un acide aminé K en 465 et la mutation V469M ont été retrouvées uniquement chez la souche avec une CMI à 0,38 mg/L.

Au vu de la difficulté pour déterminer les mutations responsables de la résistance de *H. pylori* à l'amoxicilline, le génome d'une quinzaine de souches amoxicilline R a été séquencé en 2020 pour tenter d'identifier d'autres supports génétiques de cette résistance par des outils de bioinformatique. Cette analyse est en cours, en collaboration avec l'équipe de Ivo Boneca, Institut Pasteur, Paris (cf projet NGS).

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.

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 réalisées par le secrétariat du CNR qui en informe les biologistes du CNR.

Aucun événement majeur n'a été noté en 2020.

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

A cause de la crise du COVID, aucun événement de ce type n'a pu être organisé. Le CNRCH a dû annuler la journée de Travaux pratiques et sa journée annuelle des correspondants prévue en mars 2020.

-Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

- Joséphine Delage. BTS ANABIOTEC, Blanquefort (Gironde)-Juin-Aout 2020
- Théo Cousinou. BTS Bionalyses et Contrôles. Lycée Raoul Dautry-Limoges. Octobre-Décembre 2020.
- Marine Jauvain (master 2, Microbiologie-Immunologie, Université de Bordeaux) : culture de *H. pylori* dans un projet de recherche centré sur l'effet anti-microbien de la metformine. Septembre 2019-Octobre 2020.
- Justine Franco, interne en pédiatrie (CHU de Bordeaux) : Janvier-Septembre 2020.
- Valentin Dobremel, externe en pharmacie (CHU de Bordeaux) : Septembre-Novembre 2020.

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

Les biologistes du CNRCH ont également participé activement à l'élaboration d'une fiche pratique d'éradication antibiotique de l'infection à *H. pylori* mise en ligne courant 2020 sur le site internet du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters : <http://www.helicobacter.fr/wp-content/uploads/2021/03/Fiche-HP-specialistes-2021.pdf>

-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).

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 courant 2021 ou 2022 (en fonction de l'évolution de la crise sanitaire) 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 2020 sont listées ci-dessous :

- une fiche technique pour la recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques ;
- une fiche concernant la culture des Campylobacters à partir de prélèvements de selles ;
- de nouvelles versions des fiches de renseignements : Feuille de renseignements biopsie *Helicobacter pylori* ; Feuille de renseignement souche *Helicobacter pylori* ; Feuille de renseignements souche *Campylobacter* ; Feuille de renseignements antigènes *Helicobacter pylori* ; Demande de sérologie Campylobacter.

-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 2020 des mails et appels téléphoniques a été réalisé par le secrétaire du CNR. Les données sont présentées ci-dessous. L'activité de contacts thérapeutiques est stable malgré la première période de confinement COVID.

En 2020, seuls les contacts pour conseils thérapeutiques et techniques ont été répertoriés : 178 contacts (versus 191 en 2019) dont 109 par email et 69 par téléphone ; dont 104 pour des conseils thérapeutiques (58% des contacts) et 74 pour des conseils techniques (42% des contacts).

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 autres biologistes 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 tracé 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 la catégorisation 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 ...)

P Lehours a été sollicité fin 2020 pour une interview sur le Pr Martin J Blaser, microbiologiste de renom dans le domaine des infections à *Campylobacter-Helicobacter*-Microbiote. Cette vidéo a été mise en ligne sur le site du Département Sciences Biologiques et Médicales (Université de Bordeaux).

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 2020, 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.

Dans le but de suivre l'évolution des réservoirs en fonction de l'invasivité de ce pathogène, 107 nouvelles souches ont été séquencées, provenant de cas cliniques issus de la période 2018-2019 (en rouge dans le tableau ci-dessous). Les génomes ont été obtenus auprès de la société Integragen, sur séquenceur HiSeq4000 d'Illumina.

Tableau. Total des souches séquencées pour le projet *C. jejuni* invasifs/non invasifs, depuis 2009. Durant l'année 2020, 54 nouveaux génomes de *C. jejuni* invasifs ont été séquencés, dont 31 pour l'année 2018 et 23 pour l'année 2019. Pour les souches non invasives, 53 nouveaux génomes ont été séquencés, dont 31 pour l'année 2018 et 22 pour l'année 2019.

Année	Invasifs	Non invasifs
2009	-	39
2011	17	-
2012	18	-
2013	33	-
2014	35	-
2015	33	83
2016	37	32
2017	45	56
2018	5 +31	9 +31
2019	+23	+22
TOTAL	277	272

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. Les biais d'attribution de ces marqueurs ont été corrigés selon la méthode décrite par le CNRCH (Berthenet E, *et al.*, Sci Rep 2019).

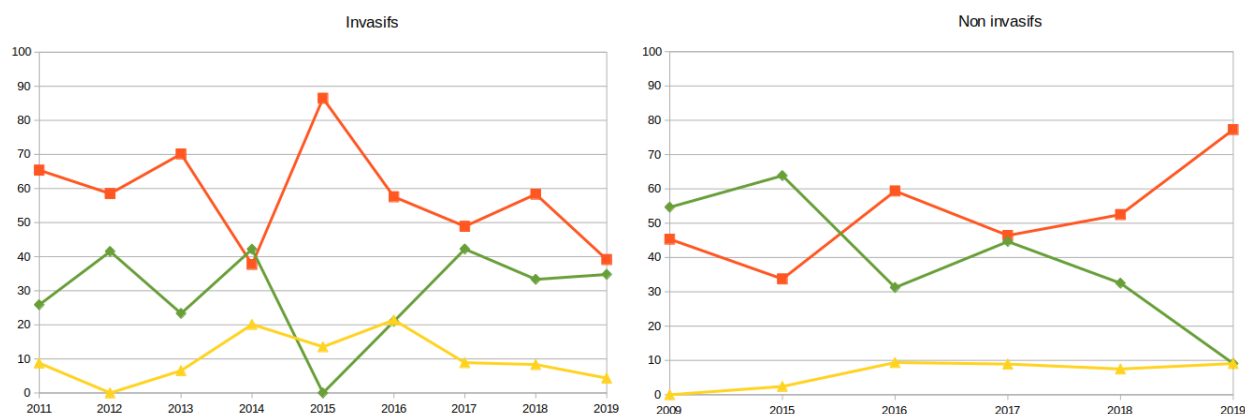


Figure 8 : Évolution des proportions (en %) pour chaque réservoir, volaille en orange, ruminants en vert et environnement en jaune, en fonction des années (de 2009 à 2019). En abscisse : années ; en ordonnées : pourcentage des souches.

On constate que, pour les souches invasives, la tendance est à l'égalité des proportions pour les réservoirs volailles et ruminants, avec un pourcentage moyen d'environ 40%. La proportion du réservoir environnement est en revanche en baisse. Pour les souches non invasives, l'écart entre la proportion de souches issues de la volaille et celles issues des ruminants s'accroît fortement. En effet, pas loin de 80% de nos souches provenant de selles sont attribuées au réservoir volaille contre 10% pour le réservoir ruminants. Les souches environnementales sont en proportions stables depuis 2016. Les souches de cas cliniques de 2020 qui seront séquencées durant cette année 2021 permettront de savoir si ces tendances se confirment ou non (cf projet 2021).

2- Bilan du projet d'attribution de sources pour *C. coli*

Les *Campylobacters* sont transmis à l'homme par la consommation de produits contaminés, principalement la viande, avec comme sources majeures la volaille, les ruminants et le porc. La principale espèce identifiée en France est *C. jejuni*, représentant 84,2% des souches, suivi de *C. coli* avec 12,8% (données CNR 2020). Ces données sont applicables à de très nombreux pays dans le monde. C'est principalement pour cette raison que contrairement à *C. jejuni*, le nombre d'études ciblant uniquement *C. coli* est très faible. Les méthodes permettant l'analyse des génomes de ces espèces ont été développées à partir de *C. jejuni* notamment la MLST (pour MultiLocus Sequence Typing) à partir de 7 gènes du core-genome de cette espèce. Cette méthode a montré sa robustesse pour structurer les populations de *C. jejuni*. En revanche, pour *C. coli* le génome moins variable rend la MLST moins efficace.

Nous avons donc estimé qu'il était important de trouver un moyen plus performant pour identifier les sources de contamination de *C. coli*, en utilisant une méthode plus précise que la MLST qui se base sur des gènes entiers. Ainsi en 2019, 259 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) permettant de discriminer les populations volaille, ruminants et porcs ont été déterminés à partir de plus de 400 souches disponibles dans les bases de données publiques.

Ces marqueurs discriminants sont appliqués chaque année sur les souches cliniques de notre laboratoire. En 2020, 59 génomes de *C. coli* ont donc été séquencés dans le but de suivre l'évolution de la répartition des réservoirs (Figure 9).

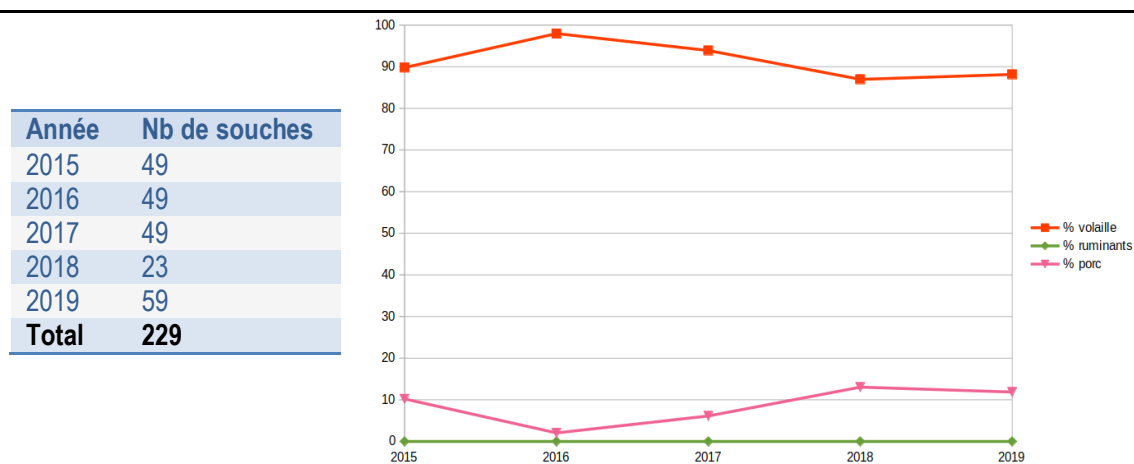


Figure 9. Évolution des proportions en % pour chaque réservoir, volaille en rouge, ruminants en vert et porc en rose, en fonction des années (de 2015 à 2019). Le total des souches séquencées pour le projet d'attribution de source de *C. coli* depuis 2015 est indiqué à gauche.

L'utilisation de mutations en tant que marqueurs génomiques discriminants nous permet ainsi d'observer une nette répartition des différentes sources de contamination à *C. coli*. Depuis 2015, la tendance montre que le réservoir volaille est majoritaire avec en moyenne 90% des souches cliniques attribuées. Le réservoir porc stagne autour de 10%. Aucune souche provenant du réservoir ruminant n'a été détectée. Le contraste est d'autant plus saisissant lorsque nous le comparons à une sélection de souches cliniques américaines où la proportion du réservoir ruminant se situe aux alentours de 10% et celui des porcs montant à 20%. La volaille, principalement attribuée à *C. jejuni*, semble donc également concerner *C. coli*, ce qui va à l'encontre de certaines études qui désignent les porcs comme la principale source. Ces résultats sont cruciaux et doivent être impérativement mis à jour chaque année.

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal American Society for Microbiology, Applied and Environmental Microbiology en 2020 (doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01787-20>).

3-Bilan des séquençages de souches particulières et de possibles nouvelles espèces :

Le genre *Helicobacter* de la famille des *Helicobacteraceae* regroupe 42 espèces validées (33 avec des séquences génomiques complètes). De nouvelles espèces sont fréquemment proposées.

L'année 2020/2021 s'illustre par la volonté de développer encore davantage l'apport en routine du séquençage appliqué à l'étude des infections à *Campylobacter* et *Helicobacter*.

Les souches que nous recevons au CNR sont identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (sauf pour *H. pylori*) et les résistances aux antibiotiques sont déterminées par des méthodes phénotypiques. Ces méthodes sont rapides et peu coûteuses mais présentent un inconvénient majeur : elles manquent de précision lorsqu'elles sont face à de nouvelles espèces ou nouveaux mécanismes de résistance. Ainsi, on souhaite courant 2021, que ces souches que l'on qualifie de « particulières » soient séquencées et fassent l'objet d'analyses bio-informatiques. Pour développer cette activité, il a donc été nécessaire en 2020 de mettre en place une série de tests à partir d'un séquenceur adapté à nos besoins : l'iSeq 100 d'Illumina. Ce dernier est conçu pour séquencer de petits génomes (jusqu'à 2 millions de paires de bases), jusqu'à 4 millions de séquences d'une taille de 150pb et 24 échantillons en capacité maximale. Il semble donc parfaitement convenir à un usage ponctuel de séquençage de génomes bactériens.

Le séquenceur a été testé sur 24 ADN en 2020 en 2 «run» (juillet et octobre). La sélection comprenait diverses espèces de *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Arcobacter* provenant de différents projets : cas groupés investigués par RAPD, souches de *Campylobacter* résistantes à l'érythromycine ou souches multi-résistantes, souches à identification non concluante par MALDI-TOF, souches testées en attribution de source etc... (cf Tableau ci-après)

La majorité de ces génomes a au préalable été séquencée par la société Integrage avec un séquenceur plus puissant, l'iSeq 4000, permettant ainsi une comparaison deux à deux de la qualité des génomes. Les ADN de chacune des souches ont été extraits par nos méthodes classiques, à savoir via les systèmes MagNA Pure et les librairies ont été réalisées à l'aide des kits Nextera DNA Flex d'Illumina. Durant la création des librairies, une étape d'amplification des ADN par PCR est nécessaire afin d'avoir une quantité suffisante de matériel à séquencer. Cette étape est critique car il est important d'avoir avant le séquençage des quantités d'ADN similaires pour chacune des souches, afin d'obtenir des génomes avec des couvertures uniformes (couverture = nombre de fois qu'une région génomique donnée est séquencée, indice de qualité d'un séquençage). Lors du premier «run» en juillet, les ADN ont été quantifiés et dilués avant la PCR et lors du deuxième «run» en octobre, ces étapes ont été réalisées après la PCR.

Tableau. Récapitulatif du choix des souches, les différentes couvertures de séquençage obtenues avec les deux runs et les résultats d'identification des espèces par bio-informatique.

id	Projet	Espèce LABO	Run qt avant PCR		Run qt après PCR	
			Couverture	Identification NGS	Couverture	Identification NGS
1	RAPD positive	<i>C. jejuni</i>	18,92	<i>C. jejuni</i>	164,86	<i>C. jejuni</i>
2	RAPD positive	<i>C. jejuni</i>	14,93	<i>C. jejuni</i>	236,76	<i>C. jejuni</i>
3	RAPD Négative	<i>C. jejuni</i>	130,10	<i>C. jejuni</i>	53,78	<i>C. jejuni</i>
4	RAPD Négative	<i>C. jejuni</i>	91,33	<i>C. jejuni</i>	71,94	<i>C. jejuni</i>
5	RAPD Ambigue	<i>C. jejuni</i>	17,67	<i>C. jejuni</i>	100,70	<i>C. jejuni</i>
6	RAPD Ambigue	<i>C. jejuni</i>	16,36	<i>C. jejuni</i>	46,47	<i>C. jejuni</i>
7	Souche résistante à l'érythromycine	<i>C. jejuni</i>	5,91	<i>C. jejuni</i>	5,20	<i>C. jejuni</i>
8	Souche résistante à l'érythromycine	<i>C. jejuni</i>	13,00	<i>C. jejuni</i>	212,31	<i>C. jejuni</i>
9	Souche résistante à l'érythromycine	<i>C. jejuni</i>	67,57	<i>C. jejuni</i>	55,69	<i>C. jejuni</i>
10	Souche multi-résistante	<i>C. coli</i>	104,68	<i>C. coli</i>	125,37	<i>C. coli</i>
11	Souche multi-résistante	<i>C. coli</i>	93,69	<i>C. coli</i>	105,36	<i>C. coli</i>
12	Souche multi-résistante	<i>C. coli</i>	138,20	<i>C. coli</i>	132,31	<i>C. coli</i>
13	Souche résistante à l'augmentin	<i>C. coli</i>	120,28	<i>C. coli</i>	100,14	<i>C. coli</i>
14	Souche particulière	<i>C. sp.</i>	66,38	<i>C. lari</i>	56,10	<i>C. lari</i>
15	Souche résistante à l'amoxicilline	<i>H. pylori</i>	3,26	<i>H. pylori</i>	29,23	<i>H. pylori</i>
16	Souche résistante à l'amoxicilline	<i>H. pylori</i>	4,94	<i>H. pylori</i>	23,41	<i>H. pylori</i>
17	Souche résistante à l'ertapénème	<i>A. butzleri</i>	92,68	<i>A. butzleri</i>	68,63	<i>A. butzleri</i>
18	Souche résistante à l'ertapénème	<i>A. butzleri</i>	53,36	<i>A. butzleri</i>	59,43	<i>A. butzleri</i>
19	Sélection pour attribution de source	<i>C. coli</i>	70,26	<i>C. coli</i>	118,79	<i>C. coli</i>
20	Sélection pour attribution de source	<i>C. coli</i>	15,60	<i>C. coli</i>	136,31	<i>C. coli</i>
21	Souche invasive	<i>C. jejuni</i>	38,43	<i>C. jejuni</i>	173,88	<i>C. jejuni</i>
22	Souche non invasive	<i>C. jejuni</i>	141,96	<i>C. jejuni</i>	112,39	<i>C. jejuni</i>
23	Souche particulière	<i>H. sp.</i>	3,62	Erreur	164,55	<i>H. labetoulli</i>
24	Souche particulière	<i>H. sp.</i>	3,85	<i>H. burdigalensis</i>	6,57	<i>H. burdigalensis</i>

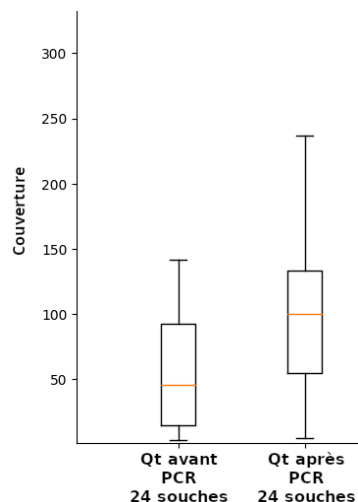
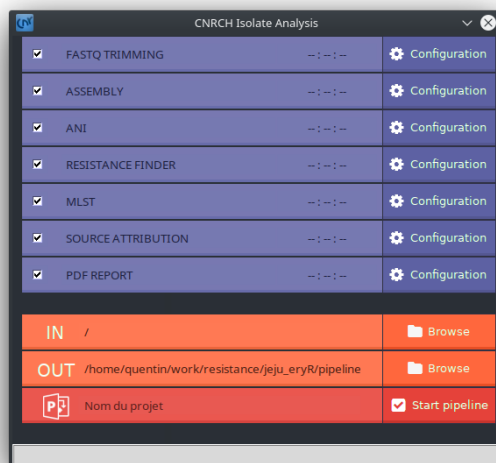


Figure 10. Comparaison des couvertures de séquençage entre le run avec la quantification (Qt) effectuée avant amplification par PCR et le run avec la quantification effectuée après amplification.

Les résultats obtenus sont concordants et concluants. Le biais apporté par l'étape de quantification est visible dans la figure ci-dessus et est non négligeable. En effet, selon si la quantification des ADN est effectuée avant ou après l'amplification par PCR, la couverture pour chaque souche varie fortement. Quantifier les ADN après l'étape d'amplification nous a permis d'obtenir des génomes très bien couverts, ce qui sera à privilégier. Quelques souches ont posé problème, ce qui peut s'expliquer par :

- une souche difficilement cultivable et/ou une mauvaise extraction d'ADN.
- un génome difficile à assembler car comprenant de nombreuses répétitions telles les bactéries du genre *Helicobacter*.



A Bordeaux, le : 8/06/2020
CNRCH - Laboratoire de Bactériologie, CHU Pellegrin
Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux
Tél: +33 (0)5 56 79 59 77

RAPPORT WGS CAMPYLOBACTER

IDENTIFIANT : 2019-0557H
SEXE PATIENT : M
AGE PATIENT : 60
CODE POSTAL : 86000

OK ANI (AVERAGE NUCLEOTIDE IDENTITY) : Espèce identifiée

Espèce	Score ANI
<i>Campylobacter jejuni</i>	96.98 %

OK SOURCE POTENTIELLE DE CONTAMINATION

- Volaille	: 11.8 %
- Bovine	: 0.0 %
- Environnement	: 91.25 %

OK MLST (MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING)

Sequence type	: 6
Clonal complex	: Inconnu

OK ANTIBIOGRAMMES (laboratoire) ET MARQUEUR(S) DE RÉSISTANCE (bioinformatique)

	AMP	CIP	ERY	TET	GEB
ATB Labo	S	R	R	S	S
WGS Bioinfo	S	R	R	S	S

Antibiotique	Marqueur	Score BLAST
Ciprofloxacin	GyrA C jejuni mutation T86R	98.65 %
Erythromycine	23S mutation A2074T	99.3 %
Erythromycine	rplD 50S Ribosomal protein L4 mutation T177S	97.89 %
Erythromycine	rplV 50S Ribosomal protein L22 mutation A105M	93.84 %

Figure 11. Illustration de la «pipeline» automatisée développée au CNR, combinant une suite d'outils bio-informatiques. Développée sous Linux à l'aide du langage Python, elle permet à partir de données de séquençage de réaliser plusieurs analyses sur le génome d'une souche donnée et de générer un rapport au format PDF contenant tous les résultats.

Malgré cela, les analyses bio-informatiques ont apporté des résultats robustes. En utilisant une «pipeline» d'analyses créée au CNRCH (Figure 11), les espèces de chacune des souches ont bien été identifiées par les méthodes ANI (Average Nucleotide Identity) et DDH (DNA-DNA Hybridization), telles les souches non identifiées en laboratoire (cf 14, 23 et 24 dans le tableau ci-dessous) montrant ainsi la forte importance du WGS (whole-genome sequencing). Les résultats RAPD (méthode permettant d'identifier si deux bactéries proviennent de la même souche) pour les souches 1 à 6 ont également pu être confirmés par core-genome MLST (cgMLST, méthode permettant la comparaison pour

chaque gène des allèles deux à deux). De plus, les mécanismes de résistance pour chaque antibiotique ont été retrouvés en utilisant les bases de données publiques, telles NCBI et CARD, mais aussi une base « fait-maison » construite à partir de publications plus spécifiques.

Tableau. Comparaison deux à deux des génomes (% de similarité) par cgMLST et ANI, suivant les trois séquençages effectués (iSeq100 Qt avant ou iSeq100 Qt après et HiSeq 4000).

id	Qt avant / Qt après		Qt après / HiSeq4000	
	cgMLST	ANI	cgMLST	ANI
1	79,69	99,42	99,69	99,98
2	74,83	98,72	99,63	99,98
3	99,60	99,99	99,74	99,99
4	99,82	100,00	99,69	100,00
5	78,68	98,89	99,74	99,99
6	71,79	99,46	98,33	99,89
7	98,84	99,99	99,55	99,15
8	85,35	99,66	99,81	99,99
9	99,87	100,00	99,55	99,99
10	98,53	100,00	99,61	100,00
11	98,54	100,00	99,41	100,00
12	99,41	100,00	99,70	100,00
13	98,16	100,00	Non séquencé par HiSeq	
14	98,60	99,99	98,05	99,95
15	50,00	99,74	50,00	99,99
16	100,00	99,91	100,00	99,96
17	86,36	100,00	90,91	100,00
18	96,00	99,97	100,00	100,00
19	96,89	99,99	99,80	100,00
20	81,35	99,61	99,52	100,00
21	91,08	99,90	99,62	99,99
22	99,69	99,99	99,88	100,00
23	56,25	Erreur	Non séquencé par HiSeq	
24	81,82	97,35	96,88	98,99

Enfin, la comparaison avec les génomes obtenus avec un séquençage plus performant (HiSeq 4000) permet de se rendre compte de la capacité de l'iSeq 100. Lorsque les ADN sont quantifiés après PCR avec l'HiSeq4000, on obtient des génomes proposant des scores de similarité très élevés avec les génomes obtenus. En effet, sans compter les exceptions citées précédemment, les séquences sont en moyenne à plus de 99% similaires ce qui conforte donc l'idée d'acquérir un appareil de séquençage plus modeste.

Pour confirmer l'importance des méthodes d'analyses moléculaires, la « pipeline » de traitements bio-informatiques a récemment été testée sur 3 souches d'intérêt dont les espèces n'ont pu être identifiées par les méthodes classiques de laboratoire, c'est-à-dire par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Nous avons reçu en 2020 une souche de *Campylobacter* provenant de l'hôpital Saint-Antoine à Paris et deux souches du genre *Helicobacter*, l'une provenant de l'hôpital Pellegrin, l'autre du CHU de Tours.

Tableau. Souches cliniques sélectionnées pour cette analyse. Les caractéristiques biochimiques ont été déterminées par galeries « API Campy » et les résistances aux antibiotiques évaluées par antibiogrammes en disques et E-tests.

	<i>Campylobacter</i> sp.	<i>Helicobacter</i> sp.	<i>Helicobacter</i> sp.	
Lieu	Paris (hôpital)	Bordeaux (Pellegrin)	Tours (hôpital)	
Origine	Selles	Hémoculture	Hémoculture	
Patient	Homme, 48 ans	Homme, 55 ans	Homme, 76 ans	
Culture	Gélose sang / 37°C / 24h / microaérobie	Gélose sang / 37°C / 48h / microaérobie	Gélose sang / 37°C / 48h / microaérobie	
Morphologie	bacille, incurvé et mobile	bacille, incurvé et mobile	bacille, incurvé et mobile	
Caractéristiques biochimiques	Ox+ / Cat+ / Ure-	Ox+ / Cat+ / Ure-	Ox+ / Cat+ / Ure-	
Antibiogrammes	Ampicilline	S	Ampicilline	R
	Amox + clav.	S	Amox + clav.	I
	Gentamicine	S	Gentamicine	S
	Érythromycine	S	Érythromycine	R
	Ciprofloxacine	S	Ciprofloxacine	R
	Tétracycline	S	Tétracycline	S

L'ADN de chacune de ces souches a été extrait en utilisant les systèmes MagNA Pure et a été quantifié par Qubit. Le séquençage a été effectué en utilisant le même séquenceur utilisé pour le projet précédant à savoir l'iSeq 100. Les séquences brutes ont finalement été traitées par la « pipeline » d'analyses bio-informatiques.

Tableau. Récapitulatif des résultats obtenus après traitements bio-informatiques.

	<i>Campylobacter sp.</i>	<i>Helicobacter sp.</i>	<i>Helicobacter sp.</i>
Taille du génome (Mpb)	1,65	1,71	1,71
ANI (seuil fixé à 95%)	<i>C. lanienae</i> (83,14%)	<i>H. caesarodunensis</i> (99,99%)	<i>H. caesarodunensis</i> (99,89%)
DDH (seuil fixé à 80%)	<i>C. lanienae</i> (60,1%)	<i>H. caesarodunensis</i> (99,57%)	<i>H. caesarodunensis</i> (99,63%)
Résistance (CNRCH)	Aucune	ERY CIP	ERY CIP
Résistance (NGS)	Aucun mécanisme	23S A2147G	23S A2147G GyrA N85F N85F+D89G

Les génomes obtenus ont montré une taille d'environ 1,7 millions de paires de bases, concordant avec ce que l'on peut retrouver dans la littérature pour les espèces de *Campylobacter* et *Helicobacter*. En utilisant les méthodes ANI et DDH, ces trois souches ont été comparées à une base de données comprenant 129 références de *Campylobacter sp.*, *Helicobacter sp.* et *Arcobacter sp.* La souche de *Campylobacter* a proposé des scores se rapprochant d'un *C. lanienae*. Cependant, ces scores ont des valeurs bien inférieures au seuil fixé pour pouvoir affirmer de manière significative qu'il s'agit de cette espèce. Elle fera l'objet d'une future publication. Concernant les deux souches du genre *Helicobacter*, les scores indiquent sans ambiguïté la très forte similarité avec la souche référence « *H. caesarodunensis* ». Il s'agit d'une espèce très rare de *Helicobacter sp.* qui a été identifiée et décrite dans notre laboratoire en 2017, en collaboration avec le CHU de Tours (van der Mee-Marquet *et al.*, Front Microbiol 2017).

Enfin, les mécanismes de résistance retrouvés *in silico* sont concordants avec les résultats obtenus *in vitro*. Aucun mécanisme n'a été identifié pour la souche de *Campylobacter sp.* et on a pu déterminer la présence, pour les souches de *Helicobacter sp.*, d'une mutation bien décrite dans la séquence de l'ARN ribosomique 23S associée la résistance à l'érythromycine et des mutations dans la séquence de la sous unité A de la gyrase associées la résistance à la ciprofloxacine.

L'implémentation des analyses par biologie moléculaire permet de valider les méthodes classiques de laboratoire avec des résultats plus précis. Cette étude a particulièrement permis de valider l'importance de la bio-informatique quant à l'identification pertinente de l'espèce et des mécanismes de résistance associés.

Nous souhaitons compléter ces données en 2021 par de la microscopie électronique et publier ces cas conjointement avec les correspondants nous ayant envoyés ces souches.

5-Première description en France de méthylases bactériennes associées à la résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter sp.*

Les campylobactérioses sont la plupart du temps bénignes mais dans certains cas comme chez les patients immunodéprimés, diabétiques ou aux âges extrêmes, des risques de complications peuvent apparaître. Le recours aux antibiotiques est alors nécessaire. Les macrolides sont généralement les molécules de première intention mais il est possible d'administrer une fluoroquinolone ou une tétracycline en cas de résistance. La résistance aux antibiotiques est malheureusement chose commune en France. En effet, depuis la fin des années 2000, la résistance aux quinolones et tétracycline a drastiquement augmenté, jusqu'à un seuil critique de 60% pour les deux espèces les plus représentées à savoir *C. jejuni* et *C. coli* (données CNRCH). La résistance aux macrolides reste toutefois assez faible (environ 4%) mais n'est pas à sous-estimer. Des mécanismes de résistances apparaissent en effet couramment.

Au CNRCH nous avons pour mission de suivre ces résistances et d'en identifier les mécanismes associés. La « pipeline » d'analyse bio-informatique permet de remplir cet objectif. En 2020, nous avons ainsi sélectionné 51 souches de *C. jejuni* et *C. coli* multi-résistantes, isolées de cas cliniques entre 2018 et 2019, afin d'identifier les principaux mécanismes.

Tableau. Souches cliniques sélectionnées afin de déterminer les résistances par NGS et bio-informatique. La totalité des souches de *C. jejuni* et *C. coli* sont ici résistantes à la ciprofloxacine et l'érythromycine et la majorité sont résistantes à l'ampicilline et la tétracycline. Enfin, seules 6 *C. coli* sont résistants à la gentamicine.

Espèce	Nb de souches	Résistance et marqueurs associés				
		AMP	CIP	ERY	TET	GEN
<i>C. coli</i>	30	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. coli</i>	2	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutations T86I and D90N	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. coli</i>	2	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2074G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. coli</i>	1	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. coli</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	novel erm (ermN)	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. coli</i>	1	Undescribed blaOXA-61 promoter mutations	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	APH(2'')-If, APH(2'')-Ih and AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia
<i>C. coli</i>	2	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	novel erm (ermN)	<i>tetO</i>	APH(2'')-Illa and APH(2'')-Ic
<i>C. coli</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	APH(2'')-Illa and APH(2'')-Ic
<i>C. coli</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia
<i>C. coli</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	<i>ermB</i>	<i>tetO</i>	AAC(6)-Ie-APH(2'')-Ia
<i>C. jejuni</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2074C	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	1	blaOXA-61 promoter mutation G63T	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	2	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2074T	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	2	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2075G	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	1	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2074C	<i>tetO</i>	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	1	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86R	23S mutation A2074T	Sensitive	Sensitive
<i>C. jejuni</i>	1	Sensitive	<i>gyrA</i> mutation T86I	23S mutation A2074G	Sensitive	Sensitive

Les principaux gènes et mutations listés dans le tableau ci-dessus font partie des mécanismes les plus fréquemment rencontrés. On peut, par exemple, citer les mutations dans le gène de la sous-unité A de la gyrase responsable de la résistance à la ciprofloxacine, la présence du gène *tetO* conférant la résistance à la tétracycline ou bien les mutations dans la séquence de l'ARN 23S pour la résistance à l'érythromycine.

Concernant ce dernier mécanisme, l'utilisation du séquençage a permis d'identifier que la résistance à l'érythromycine pour 4 souches de *C. coli*-Ery-R reçues en 2019 était portée par des méthylases, des enzymes rares ayant la capacité de « méthylar » l'ARN 23S réduisant ainsi l'activité de l'érythromycine.

Ici, nous avons identifié deux versions :

-ErmB : Cette première méthylase est la plus représentée chez *Campylobacter*, notamment en Chine où elle fût décrite pour la première fois en 2008 (Shangshang Qin *et al.* 2014). Ce gène a pour particularité d'être présent au sein de « multidrug-resistant genomic islands » ou « MDRGI », incluant des gènes comme *tetO* pour la résistance à la tétracycline ou APH(2'') pour la résistance à la gentamicine. Ici, notre souche de *C. coli* de 2019 possède un MDRGI de Type III, fortement identique à plusieurs souches chinoises (telle la souche ZP-GX-1, doi: 10.1128/AAC.03039-14). ErmB fût rarement décrite dans le reste du monde : en Belgique en 2012 (Elhadidy M *et al.*, 2012), en Espagne en 2015 (Florez-Cuadrado *et al.* 2015), aux Etats-Unis en 2018 (Jessica C. Chen *et al.* 2018), ou bien en Australie en 2020 (Rhiannon L. W. *et al.* 2020). En France, aucune publication ne mentionne sa présence. Dans le cadre de notre étude, nous avons poussé la recherche de ErmB sur toutes nos souches résistantes à l'érythromycine depuis 2016. Nous avons ainsi identifié deux autres isolats de *C. coli* de 2017 et 2018 ErmB-positifs.

Nous identifions donc les premières souches françaises de *Campylobacter sp* possédant ce gène de résistance qui a émergé en Chine en 2008.

-ErmN : La deuxième version, chez 3 de nos souches, est une nouvelle méthylase décrite dans la littérature pour la première et unique fois au Québec en 2018 (Greninger A. *et al.* doi: 10.1093/cid/ciz1060). Ce nouveau gène *erm* que nous avons appelé « *ermN* » est inséré dans la séquence CRISPR de l'opéron CRISPR-cas9. Nous avons mené plusieurs expériences pour déterminer le rôle du système immunitaire CRISPR-cas9 dans l'acquisition de ce gène. Dans cette étude, il a ainsi été montré par transformations bactériennes qu'en présence d'érythromycine et du produit de PCR CRISPR-cas9-*ermN*, une bactérie possédant ce système immunitaire peut insérer le produit dans son génome et acquérir la résistance à l'érythromycine via cette méthylase. Des expériences de conjugaison bactérienne n'ont en revanche pas abouti et nous n'avons pu observer un partage de ce gène de résistance d'une bactérie à l'autre. L'insertion de ce gène au sein de l'opéron CRISPR-cas9 est donc potentiellement un phénomène très rare et qui se transmet préférentiellement avec la séquence CRISPR-cas9 entière lorsque la bactérie receveuse ne possède pas le système en question.

De même que pour *ermB*, nous avons recherché par PCR la présence de *ermN* dans nos collections de souches Ery-R : 3 souches de *C. coli* datant de 2016 étaient positives pour *ermN*.

En France, *ermN* semble donc avoir circulé sans être détecté depuis 2016, deux ans avant l'identification même de ce gène au Québec.

L'utilisation du séquençage et de la bio-informatique a ainsi permis de révéler pour la première fois en France, à notre connaissance, la présence de ces méthylases. L'apparition de ce type de gène est préoccupante, et la recherche de souches positives est d'ores et déjà effectuée en routine parmi les souches résistantes à l'érythromycine que nous recevons au CNR.

Ce travail sera poursuivi en 2021 pour publication. Il sera intégré au travail de thèse de Mr Q Jehanne.

6-Collaboration avec le National Institute of Health (NIH, Maryland, Etats-Unis. Correspondante : Dr Maria Constanza Camargo)

Ce projet consiste à analyser des séquences de souches provenant de malades atteints de cancer gastrique ou de gastrite isolée, d'un grand nombre de pays du monde entier. A ce jour, 281 souches de 13 pays ont été séquencées. En parallèle des approches NGS, le CNRCH est notamment impliqué dans l'étude des mutations associées à la résistance aux antibiotiques, notamment leur prévalence en fonction des populations.

Le CNRCH a reçu en 2020 348 souches à tester. Ces souches proviennent de collections de souches réparties sur tous les continents. Les données de NGS étaient disponibles pour 347 d'entre elles.

Chaque souche, après décongélation et subculture, a été testée *in vitro* par Etest (selon le protocole de routine du CNR) pour déterminer la sensibilité à la clarithromycine et à la lévofloxacine. Les résultats ont été comparés une fois obtenus à ceux du NGS. Toute discordance phénotype/génotype a été contrôlée :

-en répétant les CMI ;

-en vérifiant par PCR temps réel la présence de mutation dans l'ADNr 23S associée à la résistance aux macrolides ;

-en amplifiant la QRDR de *gyrA* et en séquençant les produits de PCR.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus après vérification des discordances observées.

	Génotype	In vitro		
		S	R	S+R
Clarithromycine / ADNr23S	Pas de mutation (n=251)	249	0	2*
	Mutation (n=96)	0	93	3*
Lévofloxacine / GyrA	Pas de mutation (n=227)*	227	0	0
	Mutation (n=120)	13**	107	0

*nous avons confirmé pour ces 6 souches la présence d'une double population WT+R par PCR à partir des ADN extraits des souches.

**présence des mutations suivantes dans la QRDR : 1_A97V and 12_N87T. Ces mutations ne sont pas associées à la résistance aux quinolones *in vitro*.

Nous recevrons 89 dernières souches à antibiogrammer en mars 2021.

Ces résultats préliminaires révèlent plusieurs points :

-il existe une bonne corrélation entre phénotype et génotype pour la sensibilité chez *H. pylori* aux macrolides et fluoroquinolones ;

-les mutations retrouvées dans l'ADNr 23S sont homogènes dans des souches provenant de différentes régions du monde et restreintes aux position A2142 et A2143 ;

-les mutations retrouvées dans la QRDR sont plus variables et non systématiquement associées à une résistance *in vitro*.

7-Etude rétrospective multicentrique sur les bactériémies à *Campylobacter* sp.

Cette étude a été réalisée avec le Dr Mathilde Puges du service de Maladies Infectieuses du CHU de Bordeaux et une interne de ce service Mme Claire Tinévez.

Les bactériémies à *Campylobacter* sont des infections sévères, avec des taux de mortalité élevés (15 à 28%). De nombreux patients reçoivent une antibiothérapie inappropriée par méconnaissance de la part de certains cliniciens des résistances naturelles des *Campylobacter*, notamment vis à vis des céphalosporines et à cause de référentiels publiés antérieurement. De plus, en dehors de l'infection par le VIH et de l'hypogammaglobulinémie, les facteurs de risque de l'hôte sont mal connus, notamment en ce qui concerne les nouveaux types d'immunosuppression.

Une étude rétrospective multicentrique a été menée de janvier 2015 à décembre 2019 en France incluant les patients atteints de *Campylobacter* spp. Les bactériémies ont été incluses dans 34 hôpitaux français participant au réseau de surveillance du Centre National de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters, ainsi que d'autres Hôpitaux Universitaires français. Les caractéristiques microbiologiques et cliniques ont été extraites rétrospectivement des dossiers médicaux. Le point final de l'étude était d'analyser l'impact du délai d'initiation adéquate de l'antibiothérapie sur la survie sans rechute à 30 jours, au moyen du test de Kruskal-Wallis.

Au cours de la période d'étude de 5 ans, 546 patients avaient une bactériémie à *Campylobacter* spp., 68,1% étaient des hommes et l'âge médian était de 68 ans (intervalle interquartile (IQR) [53-78]). *C. jejuni*, *C. fetus* et *C. coli* étaient les espèces les plus fréquemment isolées (respectivement 43,2, 42,1 et 7,1%). La plupart des patients étaient immunodéprimés, puisque 42,8% avaient une greffe d'organe solide, une greffe de cellules souches, une splénectomie, une corticothérapie ou un traitement immunosuppresseur, et 14,1% avaient une hypogammaglobulinémie. Les autres principales affections sous-jacentes étaient un diabète (22,8%), une néoplasie solide (22,3%), une insuffisance rénale chronique (18,9%) ou une maladie hépatique chronique (13,1%). Une localisation secondaire a été retrouvée dans 12,5% des cas, soit endovasculaire, ostéoarticulaire ou endocardite (respectivement 6,8, 3,7 et 2%). Seuls 77,3% des patients ont reçu une antibiothérapie adéquate et le délai médian entre le diagnostic et l'initiation de l'antibiotique était de 2 jours (IQR [0-4]). Le taux de mortalité précoce était de 10,8% et il n'y avait pas d'impact significatif du retard à une antibiothérapie adéquate sur la survie sans rechute à 30 jours ($p = 0,353$). Dans l'analyse multivariée, seul le sexe féminin était significativement associé à la survie sans rechute à 30 jours (OR 0,35 [intervalle de confiance à 95% 0,11-0,9], $p = 0,03$).

Le taux de mortalité de la bactériémie à *Campylobacter* spp. était assez élevée mais il n'y avait pas d'impact significatif du délai avant l'instauration d'une antibiothérapie adéquate dans cette étude.

Les données de cette étude sont encore en cours d'analyse et feront l'objet en 2021 de communications en congrès et d'une publication scientifique.

8-Etude d'impact de la mise en place d'un test de détection rapide immunoenzymatique des Campylobacters dans les selles pédiatriques

Cette étude a été réalisée en 2020 sous la direction de Emilie Bessède lors des travaux de thèse de Mme Justine Franco.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la mise en place d'un test de détection rapide immunoenzymatique pour répondre aux cliniciens sur la présence ou non de *Campylobacter* dans les selles des enfants passant aux urgences et pour lesquels une coproculture était demandée. Le test immunoenzymatique, CAMPYLOBACTER QUIK CHEK (commercialisé par Abbott et validé au CNR) a été réalisé sur les selles des enfants de juillet 2019 à juillet 2020. De plus, les enfants ayant eu une coproculture réalisée aux urgences pédiatriques entre juillet 2018 et juillet 2019, ont également été inclus dans cette étude rétrospective. Les données cliniques et la prise en charge de tous les enfants inclus ont été relevées en utilisant le logiciel DXCare du CHU de Bordeaux afin de déterminer si leur prise en charge était conforme aux recommandations des sociétés savantes françaises, européennes et américaines. Un groupe d'experts indépendants a été sollicité pour valider ou non la conformité de certains dossiers cliniques.

Au total, 272 échantillons de selles sont arrivés au laboratoire sur cette période : 56 étaient positives à *Campylobacter*. Après la mise en place du test immunoenzymatique, une augmentation significative de la prescription inappropriée d'antibiotiques a été observée. Ceci étant principalement dû à la prescription d'antibiotiques pour des infections non sévères à *Campylobacter*.

Cette étude montre l'importance de sensibiliser les cliniciens sur la prise en charge des infections à *Campylobacter* à l'heure où les tests de détections rapides des Campylobacters se démocratisent.

Les résultats de cette étude feront l'objet en 2021 de communications en congrès et d'une publication scientifique.

9-Etude des pratiques et de l'impact de la mise en place de PCR syndromiques dans les laboratoires partenaires du CNR et participant au réseau Campy.Internet

Seize laboratoires participant au réseau Campy.Internet réalisent des PCR syndromiques permettant la détection des *Campylobacters* dans des échantillons de selles.

Nous avons fait évoluer notre site de saisie courant 2020 pour leur permettre de saisir ces données.

Sur ces 16 laboratoires : 9 utilisent le BD MAX Enteric Bacterial Panel (Becton Dickinson), 3 le kit Allplex GI-Bacterial Assay (Seegene), 3 le Film Array_GI (bioMérieux), 1 l'Amplidiag Bacterial GE (Mobidiag) et 1 le Novodiag (Mobidiag).

Un laboratoire a changé de technique en cours d'année.

Les laboratoires réalisant la culture après avoir effectué une PCR syndromique, ont été intégrés dans ce bilan : sur 2766 résultats de PCR positifs saisis, un *Campylobacter* a été isolé dans 2329 cas soit 84,2% de culture positive avec 2056 *C. jejuni* (88,3%), 272 *C. coli* (11,7%) et 1 *C. fetus* (0,04%).

Les pourcentages de culture positive par rapport au format de PCR utilisé sont résumés dans le tableau ci-dessous.

PCR utilisée	Nb. de laboratoires concernés	% de culture POS <i>versus</i> PCR
BD MAX Enteric Bacterial Panel	9	92,41%
Allplex GI-Bacterial Assay	3	76,96
Film Array_GI	3	64,29%
Novodiag	1	63,83%
Amplidiag Bacterial GE	1	46,27%

Sans interpréter à l'excès ces données, car les conditions préanalytiques et analytiques entre laboratoires peuvent varier, il en ressort que les performances du BD MAX pour la détection des *Campylobacters* sont excellentes.

Pour les laboratoires participant au réseau Campy.Internet mais ne réalisant pas de PCR, sur 1582 cultures positives une plus grande diversité bactérienne a été isolée et identifiée : 82,87% *C. jejuni*, 12,51% *C. coli*, 1,26% *C. fetus*. Pour le reste, soit 3,36%, ont été identifiées d'autres espèces plus rares de *Campylobacters*, des *Arcobacters* et des *Hélicobacters* entérohépatiques. Ceci démontre à nouveau que la généralisation des PCR syndromiques dans les laboratoires d'analyses médicales va, si la culture est ciblée uniquement sur le résultat de la PCR, avoir des répercussions épidémiologiques à l'avenir avec une restriction à 2 espèces seulement du genre *Campylobacter*.

6.2.-Liste des publications et communications de l'année 2020, 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

- Roy C, Robert D, Bénéjat L, Buissonnière A, Ducournau A, Mégraud F, Bessède E, Boraud D, Lehours P. Performance Evaluation of the Novodiag Bacterial GE+ Multiplex PCR Assay. J Clin Microbiol. 2020 Sep 22;58(10):e01033-20. doi: 10.1128/JCM.01033-20.
- Bénéjat L, Buissonnière A, Ducournau A, Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Evaluation of RIDASCREEN® and RIDA®QUICK *Helicobacter pylori* kits for *Helicobacter pylori* detection in stools. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020 Oct;39(10):1941-1943. doi: 10.1007/s10096-020-03943-3.
- Jehanne Q, Pascoe B, Bénéjat L, Ducournau A, Buissonnière A, Mourkas E, Mégraud F, Bessède E, Sheppard SK, Lehours P. Genome-Wide Identification of Host-Segregating Single-Nucleotide Polymorphisms for Source Attribution of Clinical *Campylobacter coli* Isolates. Appl Environ Microbiol. 2020 Nov 24;86(24):e01787-20. doi: 10.1128/AEM.01787-20.
- Jehanne Q, Bénéjat L, Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Evaluation of the Allplex™ H *pylori* and ClariR PCR Assay for *Helicobacter pylori* detection on gastric biopsies. Helicobacter. 2020 Aug;25(4):e12702. doi: 10.1111/hel.12702.
- J Franco, L Bénéjat, A Ducournau, F Mégraud, P Lehours, E Bessède. Evaluation of CAMPYLOBACTER QUIK CHEK™ rapid membrane enzyme immunoassay to detect *Campylobacter spp.* antigen in stool samples. Gut Pathog 2021. Jan 22;13(1):4. doi: 10.1186/s13099-021-00400-0. (article accepté en 2020)

- F Mégraud, C Alix, P Charron, L Bénéjat, A Ducournau, E Bessède, P Lehours. Survey of the antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in France in 2018 and evolution during the previous five years. *Helicobacter* 2021 Feb;26(1):e12767. doi: 10.1111/hel.12767. Epub 2020 Oct 22. (article accepté en 2020)

En lien avec l'activité de recherche INSERM

- Giraud J, Molina-Castro S, Seeneevassen L, Sifré E, Izotte J, Tiffon C., Staedel C, Barthelemy P, Lehours P, Mégraud F, Dubus P, Varon C. Verteporfin targeting YAP1/TAZ-TEAD transcriptional activity inhibits the tumorigenic properties of gastric cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2020 Apr 15;146(8):2255-2267. doi: 10.1002/ijc.32667. Epub 2019 Sep 30.
- 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*. 2020;73(2):801-809. doi: 10.3233/JAD-190496.
- Péré-Védrenne C, He W, Azzi-Martin L, Prouzet-Mauléon V, Buissonnière A, Cardinaud B, Lehours P, Mégraud F, Grosset CF, Ménard A. The Nuclear Remodeling Induced by *Helicobacter* Cytotoxicity Involves MAFB Oncoprotein. *Toxins (Basel)*. 2020 Mar 12;12(3). pii: E174. doi: 10.3390/toxins12030174.
- A Bosseboeuf, C Seillier, N Mennesson, S Allain-Maillet, M Fourny, A Tallet, E Piver, P Lehours, F Mégraud, L Berthelot, J Harb, E Bigot, S Hermouet. Analysis of the targets and glycosylation of monoclonal IgAs from MGUS and myeloma patients. *Front Immunol* 2020. May 27;11:854. doi: 10.3389/fimmu.2020.00854. eCollection 2020.
- A Bosseboeuf, N Mennesson, S Allain-Maillet, A Tallet, E Piver, O Decaux, C Moreau, P Moreau, P Lehours, F Mégraud, V Salle, E Bigot-Corbel, J Harb, S Hermouet. Characteristics of MGUS and Multiple Myeloma According to the Target of Monoclonal Immunoglobulins, Glucosyl-sphingosine or Epstein-Barr Virus EBNA-1. *Cancers* 2020. May 15;12(5):E1254. doi: 10.3390/cancers12051254.
- C Tiffon, J Giraud, SE Molina-Castro, S Peru, L Seeneevassen, E Sifré, C Staedel, E Bessède, P Dubus, F Mégraud, P Lehours, O C.B. Martin, C Varon. TAZ Controls *Helicobacter pylori*-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-Like Invasive and Tumorigenic Properties. *Cells* 2020. Jun 13;9(6):E1462. doi: 10.3390/cells9061462.
- L Seeneevassen, J Giraud, S Elena Molina-Castro, E Sifré, C Tiffon, C Beauvoit, C Staedel, F Mégraud, P Lehours, O C.B. Martin, H Boeuf, P Dubus, C Varon. Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) inhibits Cancer Stem Cells tumorigenic properties through Hippo kinases activation in Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 22;12(8):E2011. doi: 10.3390/cancers12082011.
- Blosse A, Peru S, Levy M, Marteyn B, Floch P, Sifré E, Giese A, Prochazkova-Carlotti M, Azzi Martin L, Dubus P, Mégraud F, Ruskone Fourmestraux A, Fabiani B, Copie-Bergman C, Robe C, Hahne M, Huard B, Lehours P. APRIL-producing eosinophils are involved in gastric MALT lymphomagenesis induced by *Helicobacter* sp infection. *Sci Rep* 10, 14858 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71792-3>
- S Courtois, M Haykal, C Bodineau, E Sifré, L Azzi-Martin, A Ménard, F Mégraud, P Lehours, R.V. Durán, C Varon and E Bessède. Autophagy Induced by *Helicobacter pylori* Infection Is Necessary for Gastric Cancer Stem Cells Emergence. *Gastric Cancer*. 2021 Jan;24(1):133-144. doi: 10.1007/s10120-020-01118-9. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32940810. (accepted in 2020)

-Publication du Pr F Mégraud

- Nyssen OP, Pérez-Aisa Á, Tepes B, Rodrigo-Sáez L, Romero PM, Lucendo A, Castro-Fernández M, Phull P, Barrio J, Bujanda L, Ortuño J, Areia M, Brglez Jurecic N, Huguet JM, Alcaide N, Voynovan I, María Botargues Bote J, Modolell I, Pérez Lasala J, Ariño I, Jonaitis L, Dominguez-Cajal M, Buzas G, Lerang F, Perona M, Bordin D, Axon T, Gasbarrini A, Marcos Pinto R, Niv Y, Kupcinskas L, Tonkic A, Leja M, Rokkas T, Boyanova L, Shvets O, Venerito M, Bytzer P, Goldis A, Simsek I, Lamy V, Przytulski K, Kunovsky L, Capelle L, Milosavljevic T, Caldas M, Garre A, Mégraud F, O'Morain C, Gisbert JP, Hp-EuReg Investigators. *Helicobacter pylori* first-line and rescue treatments in patients allergic to penicillin: Experience from the European Registry on *H. pylori* management (Hp-EuReg). *Helicobacter*. 2020 Jun;25(3):e12686. doi: 10.1111/hel.12686. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32173974.
- Nyssen OP, Perez-Aisa A, Rodrigo L, Castro M, Mata Romero P, Ortuño J, Barrio J, Huguet JM, Modolell I, Alcaide N, Lucendo A, Calvet X, Perona M, Gomez B, Gomez Rodriguez BJ, Varela P, Jimenez-Moreno M, Dominguez-Cajal M, Pozzati L, Burgos D, Bujanda L, Hinojosa J, Molina-Infante J, Di Maira T, Ferrer L, Fernández-Salazar L, Figuerola A, Tito L, de la Caba C, Gomez-Camarero J, Fernandez N, Caldas M, Garre A, Resina E, Puig I, O'Morain C, Mégraud F, Gisbert JP. Bismuth quadruple regimen with tetracycline or doxycycline versus three-in-one single capsule as third-line rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection: Spanish data of the European *Helicobacter pylori* Registry (Hp-EuReg). *Helicobacter*. 2020 Oct;25(5):e12722. doi: 10.1111/hel.12722. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32656898.
- Nyssen OP, Perez-Aisa A, Castro-Fernandez M, Pellicano R, Huguet JM, Rodrigo L, Ortuño J, Gomez-Rodriguez BJ, Pinto RM, Areia M, Perona M, Nuñez O, Romano M, Gerarda Gravina A, Pozzati L, Fernandez-Bermejo M, Venerito M, Malfetheriner P, Fernandez-Salazar L, Gasbarrini A, Vaira D, Puig I, Mégraud F, O'Morain C, Gisbert JP.

European Registry on *Helicobacter pylori* Management: single-capsule bismuth quadruple therapy is effective in real-world clinical practice. United European Gastroenterol J. 2020 Nov 11;2050640620972615. doi: 10.1177/2050640620972615. Epub ahead of print. PMID: 33176617.

- Keller JJ, Ooijsaar RE, Hvas CL, Terveer EM, Lieberknecht SC, Högenauer C, Arkkila P, Sokol H, Gridnyev O, Mégraud F, Kump PK, Nakov R, Goldenberg SD, Satokari R, Tkatch S, Sanguinetti M, Cammarota G, Dorofeev A, Gubska O, Ianiro G, Mattila E, Arasaradnam RP, Sarin SK, Sood A, Putignani L, Alric L, Baunwall SM, Kupcinskis J, Link A, Goorhuis AG, Verspaget HW, Ponsioen C, Hold GL, Tilg H, Kassam Z, Kuijper EJ, Gasbarrini A, Mulder CJ, Williams HR, Vehreschild MJ. A standardised model for stool banking for faecal microbiota transplantation: a consensus report from a multidisciplinary UEG working group. United European Gastroenterol J. 2020 Nov 5;2050640620967898. doi: 10.1177/2050640620967898. Epub ahead of print. PMID: 33151137.

- Tepes B, Brglez Jurecic N, Tepes K, Espada Sanchez M, Perez Nyssen O, Smith S, Mégraud F, Gisbert JP. *Helicobacter pylori* eradication rates in Slovenia in the period from 2017 to 2019 - data from the European Registry on *Helicobacter pylori* Management (Hp-EuReg). Dig Dis. 2020 Oct 23. doi: 10.1159/000512506. Epub ahead of print. PMID: 33099549.

- Krzyżek P, Pawelka D, Iwańczak B, Kempirski R, Leśniakowski K, Mégraud F, Łaczmański Ł, Biernat M, Gościński G. High primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from pediatric and adult patients in Poland during 2016-2018. Antibiotics (Basel). 2020 May 2;9(5):228. doi: 10.3390/antibiotics9050228. PMID: 32370201.

- Herrero R, Heise K, Acevedo J, Cook P, Gonzalez C, Gahona J, Cortés R, Collado L, Beltrán ME, Cikutovic M, Gonzalez P, Murillo R, Leja M, Mégraud F, Hernandez ML, Barbier S, Park JY, Ferreccio C; ENIGMA Chile study group. Regional variations in *Helicobacter pylori* infection, gastric atrophy and gastric cancer risk: The ENIGMA study in Chile. PLoS One. 2020 Sep 8;15(9):e0237515. doi: 10.1371/journal.pone.0237515. PMID: 32898138; PMCID: PMC7478833.

- Jribi H, Sellami H, Ben Amor S, Ducournau A, Sifré E, Bénejat L, Mégraud F, Gdoura R. Occurrence and antibiotic resistance of *Arcobacter* species isolates from poultry in Tunisia. J Food Prot. 2020 Jul 7. doi: 10.4315/JFP-20-056. Online ahead of print. PMID: 32634222 (IF: 1.01)

- Bordin DS, Voynovan IN, Embutnieks YV, Nyssen OP, Mégraud F, O Morain C, Perez-Gisbert J. European registry on *Helicobacter pylori* management (Hp-EuReg) as a tool to evaluate and improve clinical practice in Moscow. Ter Arkh. 2020 Apr 27;92(2):12-18. Russian. doi: 10.26442/00403660.2020.02.000567. PMID: 32598712.

- Rokkas T, Niv Y, Gisbert JP, Franceschi F, Gasbarrini A, Hold GL, O'Morain C, Malfertheiner P, Mégraud F. The role of rifaximin in irritable bowel syndrome derived from a network meta-analysis of randomized control trials. Microb Health Dis. 2020;2:e333.

Publications didactiques

- Godbole G, Mégraud F, Bessède E. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2020 Sep;25 Suppl 1:e12735. doi: 10.1111/hel.12735. Review.

- K Robinson, Lehours P. *Helicobacter*: Inflammation, immunology, and vaccines. Helicobacter 2020 Sep;25 Suppl 1:e12737. doi: 10.1111/hel.12737.

- L. Seeneevassen, E. Bessède, F. Mégraud, P. Lehours, P. Dubus and C. Varon Gastric Cancer: advances in carcinogenesis research and new therapeutic strategies. Int J Mol Sci 2021 (accepted for publication, march 22-2021).

- Liou JM, Malfertheiner P, Lee YC, Sheu BS, Sugano K, Cheng HC, Yeoh KG, Hsu PI, Goh KL, Mahachai V, Gotoda T, Chang WL, Chen MJ, Chiang TH, Chen CC, Wu CY, Leow AH, Wu JY, Wu DC, Hong TC, Lu H, Yamaoka Y, Mégraud F, Chan FKL, Sung JJ, Lin JT, Graham DY, Wu MS, El-Omar EM; Asian Pacific Alliance on Helicobacter and Microbiota (APAHAM). Screening and eradication of *Helicobacter pylori* for gastric cancer prevention: the Taipei global consensus. Gut. 2020 Dec;69(12):2093-2112. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322368. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33004546.

- Graham, DY, Mégraud F. Classification system for *Helicobacter pylori* therapies: Compared and contrasted to traditional infectious disease therapy. Helicobacter. 2020; 00:e12773. <https://doi.org/10.1111/hel.12773>.

-Liste des publications de formation

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

- Varon C, Mégraud F. Stomach Cancer. pp 333-343. In: Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW (Eds). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention, 2020. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2020. <http://publications.iarc.fr/586>.

- Mégraud F. *Helicobacter pylori* - Bientôt quarante ans d'âge pour une bactérie que nous hébergeons depuis toujours. pp 61-65. In: Cramer P, Meignien A (Eds). Le défi des maladies infectieuses. Des pestes à la COVID-19. Editions Docis, Paris, France.

- Lehours P, Bénéjat L, Mégraud F. Quand les bactéries s'installent dans l'estomac. pp 36-37. In: Palka L (Ed). Le peuple microbien. Editions Quae, Versailles, France, 2020.

-Communications nationales

Oraux

- E. Bessède. *Campylobacter – Helicobacter*: from chicken to stem cell. Firs Microbiology Day, février 2020 (Université de Bordeaux)
- A. Buissonnière, L. Bénéjat, E. Bessède, F. Mégraud, P. Lehours. Evaluation sur échantillons de selles des kits commerciaux RIDA®QUICK *Helicobacter* et RIDASCREEN® *Helicobacter* (r-biopharm). XXVIIIème journée du Groupe d'Etude Français des Helicobacters, janvier 2020, Annecy, France.
- 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.
- Q Jehanne, B Pascoe, L Bénéjat, A Ducournau, A Buissonnière, E Mourkas, F Mégraud, E Bessède, SK Sheppard, P Lehours. Attribution de sources pour *Campylobacter coli* par approche GWAS : "the power of SNPs". RICAI 2020, 14-15 décembre, 2020.

Posters

- Marine Jauvain, Sarah Courtois, Philippe Lehours, Emilie Bessède. Metformin modifies the gut microbiota of mice infected with *Helicobacter pylori*. Journée du département, Université de Bordeaux (décembre 2020)

-Communications internationales

Oraux

- La crise sanitaire a entraîné l'annulation de certains congrès où des communications auraient du être réalisées.

Posters

- Justine Franco, Lucie Bénéjat, Astrid Ducournau, Francis Mégraud, Philippe Lehours, Emilie Bessède. Evaluation of the CAMPYLOBACTER QUIK CHECK to detect *Campylobacter* in stool samples. ECCMID 2020 (on line).
- Justine Franco, Lucie Bénéjat, Astrid Ducournau, Francis Mégraud, Philippe Lehours, Emilie Bessède. Evaluation of the CAMPYLOBACTER QUIK CHECK to detect *Campylobacter* in stool samples. ESPID 2020 (on line).
- 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. ECCMID, 18 – 21 April 2020, Paris, France.
- 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.
- Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe in 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community. R. -Bruyndonckx; F. Mégraud; S. Coenen; L. Wittkop; T. D. Huang; M. Hoebeke; L. Bénéjat; P. Lehours; H. Goossens; Y. Glupczynski1; *H. pylori* Resistance European Multicentric Study Group; European Surveillance of Antimicrobial ConsumptionNetwork (ESAC-Net). XXXIIIrd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer. 12 Septembre 2020.

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

-Blosse A, Peru S, Levy M, Marteyn B, Floch P, Sifré E, Giese A, Carlotti M, Azzi Martin L, Dubus P, Mégraud F, Ruskone Fourmestraux 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. 23-24 janvier 2020.

Posters

-La crise sanitaire a entraîné l'annulation de certains congrès où des communications auraient du être réalisées.

-Communications internationales

Oraux

-La crise sanitaire a entraîné l'annulation de certains congrès où des communications auraient du être réalisées.

Posters

-L Seeneevassen, J Giraud, SS Molina-Castro, E Sifré, C Tiffon, C Beauvoit, C Staedel, F Mégraud, P Lehours, O. Martin, H Boeuf, P Dubus and C Varon. Leukaemia Inhibitory Factor signalling for targeting Cancer Stem Cells in gastric adenocarcinoma. XXXIIIrd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer. 12 Septembre 2020.

-O. Martin; S. Bacon, L. Seeneevassen, P. Lecompte-Saint-Jean, E. Sifré, P. Lehours, C. Varon. Modulation-of-Nrf2-mediated-antioxidant-response-after infection with *Helicobacter pylori* may contribute to gastric cancer. XXXIIIrd International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer. 12 Septembre 2020.

-L Seeneevassen, J Giraud, SS Molina-Castro, E Sifré, C Tiffon, C Beauvoit, C Staedel, F Mégraud, P Lehours, O. Martin, H Boeuf, P Dubus and C Varon. Leukaemia Inhibitory Factor signalling for targeting Cancer Stem Cells in gastric adenocarcinoma. UEGW virtual week. Octobre 2020.

-O Martin, S Bacon, E Sifré, P Lehours, C Varon. Nrf2 role and targeting in *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. UEGW virtual week. Octobre 2020.

-Conférences sur invitations des membres du CNRCH

-P Lehours

- P Lehours. 28^{ème} Réunion du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Veyrier du Lac (Annecy). 23-24 janvier 2020. Invité : Modérateur.

-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

-28^{ème} Réunion du Groupe d'Etudes Français des Helicobacters (GEFH). Veyrier du Lac (Annecy). 23-24 janvier 2020. Invité : Modérateur.

-33rd International Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group. On-line. 12 septembre 2020. Invité : Modérateur.

-United European Gastro Week 2020. On-line. 11-13 octobre 2019. Invité : Modérateur.

Conférences invitées mais annulées ou reportées du fait de la situation sanitaire :

-28th Annual Meeting of the Korean College of Helicobacter & Upper Gastrointestinal Research. Séoul, Corée. 20-22 mars 2020.

-Digestive Disease Week. Chicago, IL, USA. 2-5 mai 2020.

-EAGEN Post-Graduate Course: Gastrointestinal diseases - therapeutic role of nutrition and gut microbiota modulation. Yerevan, Arménie. 22-23 mai 2020.

-14th International Congress of Gastroenterology: Principles in therapeutic management of digestive diseases. Florence, Italie. 25 juin 2020.

-26th Meeting of the Japanese Society of Helicobacter Research. Hamamatsu, Japon. 26-27 juin 2020.

-IX^e Latin American Symposium of Helicobacter pylori infection and Gastric Cancer. Antigua, Guatemala. 15-17 juillet 2020.

-Microbiology in Modern Medicine. Kazan, Tatarstan, Russie. 14-16 septembre 2020

-E Bessède

Pas de conférence invitée en 2020.

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

Une collaboration existe avec le Laboratoire National de Référence (LNR) des *Campylobacters* de l'ANSES de Ploufragan. Ce laboratoire s'intéresse aux isolats de *Campylobacters* provenant des élevages de volailles et de porcs, des abattoirs correspondants, des étals du commerce et de l'environnement.

Transfert de séquences génomiques réalisées par le LNR de *Campylobacter jejuni* isolés de cas cliniques par le CNR : il n'y a pas eu de transfert de séquence en 2020.

P Lehours a signalé à l'ANSES de Ploufragan (Mme Kempf Isabelle) l'identification d'une nouvelle méthylase chez *C. coli* associée à la résistance aux macrolides. La séquence des amorces et d'un ADN témoin positif, permettant d'effectuer un screening PCR de ce nouveau gène, ont été envoyés.

Perspectives : continuer les échanges scientifiques avec le CNR et répondre à des appels à projets pour poursuivre et renforcer nos collaborations (cf projet 2021-2022). Le CNR et le LNR ont répondu début 2021 à un Appel à projet d'accompagnement spécifique des travaux de recherches et d'innovation défense-ASTRID-édition 2021 : projet CampOriRes ; développement d'outils pour déterminer l'origine de contaminations humaines à *Campylobacter coli* et leur résistance aux antibiotiques (cf projet 2021-2022).

-F. Mégraud a été nommé en 2020 au Conseil Scientifique de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail (ANSES).

-P Lehours a participé en mars 2020 au jury de thèse de Mr Benjamin Duqué (thèse soutenue le 13 mars 2020) « Quantification du niveau de contamination de *Campylobacter jejuni* dans la filière volaille – Influence de la variabilité des souches et de l'histoire cellulaire. » UMR 1014, INRAE, Oniris, Université Bretagne-Loire. Spécialité : Microbiologie, virologie et parasitologie.

-P Lehours a participé en 2020 au comité de thèse de Mr Samy Julliard, Université de Dijon, « Impact des aliments sur la composition et l'activité du microbiote gastrique et les marqueurs de l'inflammation. Cas d'étude chez le cheval ».

-Le CNR a été sollicité en 2020 à la demande de Samy Julliard, Université de Dijon, pour évaluer la présence de bactérie du genre *Helicobacter* dans 10 biopsies gastriques de cheval présentant des lésions ulcéreuses. Ces recherches sont restées négatives à la fois par culture et par PCR ciblant l'ADNr 16S du genre *Helicobacter*.

8-Programme d'activité pour les années suivantes

-Projets 2021-2022 concernant les Campylobacters et bactéries apparentées (hors NGS)

-Participer à l'évaluation de tous nouveaux kits de diagnostic (recherche d'antigènes, nouveaux kits ELISA etc...) ou PCR pour recherche des *Campylobacters*, notamment les PCR syndromiques.

-Comparer les niveaux de résistance des *Campylobacters* humains et vétérinaires (collaboration avec le LNR *Campylobacter*). Depuis 2014, des prélèvements sont faits en abattoirs : poulets et dindes les années paires, porcs et veaux les années impaires. A l'heure actuelle, seule la surveillance de la résistance des *C. jejuni* de volailles est obligatoire pour l'EFSA. La dernière campagne de prélèvement a eu lieu en 2016 et a repris en 2018. Elle vient d'être publiée (The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. EFSA Journal 2020;18). Nous espérons pouvoir en 2021 comparer nos résultats.

-Elargir notre réseau de correspondants afin d'intégrer plus de laboratoires participants. Les CHU, CHG et gros laboratoires privés seront contactés.

-Elargir le réseau Campy.Internet à quelques laboratoires hospitaliers et privés équipés de MALDI-TOF et participant activement au réseau Campy.Internet. Continuer à suivre les activités de PCR syndromiques des participants de ce réseau.

-Poursuivre nos efforts dans les dossiers de validations de méthodes pour la culture et les antibiogrammes des *Campylobacters*.

-Evaluer un kit ELISA *Campylobacter jejuni* en prévision de l'arrêt des réactifs de sérologie par réaction de fixation du complément.

-Continuer à mettre à jour et enrichir notre base maison du MALDI-TOF afin d'intégrer toutes nouvelles espèces de *Campylobacter sp* et *Helicobacter sp*. Nous utiliserons notamment les souches de collection du CNR.

-Mettre en ligne sur le site internet du CNR des vidéos sous forme de mini travaux pratiques destinés aux techniciens et biologistes intéressés par le diagnostic des infections à *Campylobacters* et *Helicobacters*.

-Mettre en ligne régulièrement sur notre site internet des vidéos de présentations des principales nouveautés épidémiologiques et diagnostiques destinées aux techniciens et biologistes intéressés par le diagnostic des infections à *Campylobacters* et *Helicobacters*.

-Continuer à former à la demande tout personnel (biologiste, technicien...) au diagnostic bactériologique des infections à *Campylobacters sp*.

-Projets 2021-2022 concernant *H. pylori* et les Hélicobacters (hors NGS)

-Finaliser et faire valider par le COFRAC notre dossier de validation de méthode pour la PCR *H. pylori*.

-Commencer à préparer les dossiers de validations de méthodes pour la culture et les antibiogrammes de *H. pylori*.

-Arrêt de la réalisation des tests respiratoires à l'urée marquée pour le diagnostic non-invasif des infections à *H. pylori*.

-Continuer à élargir notre réseau de correspondants en commençant par faire appel aux nombreux correspondants des réseaux *Campylobacters*.

-Participer à l'évaluation de tout nouveau kit de diagnostic (recherche d'antigènes, nouveaux kits ELISA etc...) ou PCR pour recherche de *H. pylori*. Nous souhaitons en particulier mettre en place avant juin 2021 le projet collaboratif entre Becton Dickinson et R-biopharm pour la mise au point de la PCR *H. pylori* sur BD MAX à partir de biopsies gastriques.

-Continuer à former à la demande tout personnel (biologiste, technicien...) au diagnostic bactériologique des infections à *H. pylori*.

-Continuer à participer si besoin à toute discussion utile à la mise à la nomenclature de la PCR de détection de *H. pylori* auprès de la Haute Autorité de Santé (HAS) et de la Commission de Hiérarchisation des Actes de Biologie (CHAB). Nous avons été sollicités par l'HAS début 2019 pour notre expertise dans ce domaine suite à une auto-saisine de l'HAS sur la place des différents tests de diagnostic des infections à *H. pylori*. La crise sanitaire a malheureusement bloqué cette bonne dynamique.

-Définir le mécanisme d'action anti-*H. pylori* de la metformine (collaboration avec IG Boneca, Institut Pasteur Paris). L'équipe du laboratoire a étudié les effets de la metformine sur l'EMT induite par *H. pylori* et a constaté que les bactéries présentes dans les puits contenant les cellules traitées par la metformine n'étaient plus viables. Ainsi de manière fortuite, un nouvel effet antibactérien de la metformine a été découvert. L'effet inhibiteur de la metformine sur la croissance de *H. pylori* a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Courtois S *et al.*, Future Microbiol 2018). A ce jour, le mécanisme d'action de la metformine sur *H. pylori* n'a pas encore été déterminé. Dans les cellules eucaryotes, la metformine est capable d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire entraînant une diminution de la production d'ATP.

Chez les cellules procaryotes, la protéine homologue du complexe I est une NADH déshydrogénase (NDH-1) de la chaîne respiratoire bactérienne. Les enzymes de la chaîne respiratoire bactérienne, en participant à la croissance bactérienne en milieu pauvre en oxygène, jouent donc un rôle essentiel chez les bactéries microaérophiles dont *H. pylori* fait partie. L'hypothèse selon laquelle la metformine serait capable de cibler également le complexe NDH-1 bactérien, entraînant ainsi une altération de la croissance de *H. pylori*, semble intéressante à explorer.

Nous utiliserons la souche *H. pylori* 26695 ainsi que deux mutants délétés pour les sous-unités *nuoE* et *nuoF* de NDH-1. Ce sont deux sous-unités des 14 sous-unités qui composent le gène codant pour NDH-1, et participent à l'activité

enzymatique. Ces souches proviendront de l'Institut Pasteur de Paris avec la participation du Dr Ivo Boneca. A cause de la crise sanitaire, ce projet n'a pu être réalisé en 2020.

-Définir conjointement avec IG Boneca, Institut Pasteur Paris, les mutations responsables dans *pbp1* de la résistance à l'amoxicilline chez *H. pylori*. Des envois de souches et de génomes ont commencé en février-mars 2021.

-Poursuivre le projet collaboratif NIH : terminer l'analyse des 89 souches reçues en mars 2021 et rédiger la publication scientifique en relation avec ce travail. Q Jehanne terminera l'analyse de la syntonie des gènes dans les génomes de *H. pylori* séquencés dans le cadre du *H. pylori* genome project (article collaboratif à écrire).

-Participer à l'analyse de la base de données relative aux patients pris en charge pour une infection à *Helicobacter pylori* en milieu hospitalier en France (diagnostic et traitement). Responsable Scientifique Dr Frédéric HELUWAERT / Hépatogastro-entérologue CH Annecy.

L'objectif de cette base est de rassembler des données exhaustives sur la prise en charge du patient dans sa globalité, du diagnostic à l'éradication de l'infection à *Helicobacter pylori*.

S'agissant des finalités, cette base de données vise à permettre les activités suivantes :

- amélioration de la qualité de la prise en charge individuelle et collective des patients de gastro-entérologie ;
- amélioration des pratiques professionnelles ;
- amélioration du pilotage de l'activité hospitalière du service de Gastro-entérologie ;
- suivi épidémiologique des patients infectés par *H. pylori* ;
- enquêtes de faisabilité pour de potentiels projets de recherche.

P Lehours sera associé à l'analyse des données microbiologiques recueillies.

-Projets en rapport avec l'activité NGS

La «pipeline» de bioinformatique développée par notre ingénieur, Q Jehanne, sera mise en pratique pour les génomes séquencés en 2021.

-Campagne de séquençage 2021 :

Dans la continuité de la stratégie de séquençage des souches de *Campylobacter* et de *Helicobacter*, les génomes de nombreux isolats cliniques vont être étudiés. Nous solliciterons en 2021 à nouveau la société Integragen pour séquencer 55 souches de *C. jejuni* invasifs et 55 non invasifs, afin de poursuivre le projet de surveillance de l'origine des souches invasives et non invasives en France. Les souches seront sélectionnées dans la collection du CNRCH, provenant de cas cliniques analysés entre 2019 et 2020.

Surveillance des principaux réservoirs de contamination à *C. coli* : les marqueurs génomiques discriminant les volailles, ruminants et porcs, identifiés en 2019 seront appliqués cette année encore sur 50 souches.

L'implantation en 2021 du séquenceur iSeq 100 nous permettra :

- régulièrement d'analyser les génomes de souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *H. pylori* résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques ;
- d'analyser en complément de la RAPD les cas groupés d'infections à *Campylobacter* ;
- d'identifier les souches posant problème pour leur identification au MALDI-TOF et d'identifier de nouvelles espèces ;
- d'identifier une résistance rare ou suspecte à un antibiotique donné. Le screening des méthylases chez *Campylobacter* par PCR sera par exemple vérifié et analysé systématiquement avec le séquençage du génome, si le résultat est positif.

-Projet collaboratif avec le LNR-Campylobacter : projet CampOriRes : Développement d'outils pour déterminer l'origine de contaminations humaines à *Campylobacter coli* et leur résistance aux antibiotiques.

L'objectif de ce projet est (i) d'obtenir une collection de souches la plus représentative possible des *Campylobacter coli* circulant dans différents réservoirs animaux et environnementaux en France, (ii) de séquencer l'ensemble des souches de *C. coli* collectées et de déterminer l'antibiorésistance de ces souches (iii) de déterminer des marqueurs génétiques présentant un signal fort d'association à l'hôte en analysant les séquences des génomes entiers de ces souches de *C. coli* en utilisant une approche gène-par-gène avec un pangénome d'une sélection représentative des souches caractérisées, (iv) d'effectuer une étude d'attribution de sources des cas de campylobactérioses à *C. coli* en

utilisant ces nouveaux marqueurs, (v) d'étudier le lien entre le réservoir d'origine et l'antibiorésistance par association de traits génotypiques et phénotypiques et (vi) de comparer les résultats d'attribution de source en utilisant les marqueurs obtenus avec des souches représentatives de la contamination des réservoirs animaux et environnementaux en France d'une part et les marqueurs SNPs déterminés *in silico* avec des souches de diverses origines par l'équipe du CNRCH.

Le CNR sera impliqué dans la sélection des souches de *C. coli* d'origine humaine et dans les étapes bioinformatiques du projet.

Le projet a été soumis fin février 2021 à Appel à projet d'accompagnement spécifique des travaux de recherches et d'innovation défense-ASTRID-édition 2021.

-Projet collaboratif dans le cadre du programme prioritaire de recherche antibiorésistance 2020-Call for proposals – Integrated microbiology and multi-omics data platform.

Le CNRCH a été associé à cet AO dans un projet nommé « ABRomics-PF, a numerical platform on antimicrobial resistance to store, integrate, analyze and share multi-omics data. » Les coordinateurs sont Claudine Médigue (Institut Français de Bioinformatique) et Philippe Glaser (Institut Pasteur).

Plusieurs CNR ont été associés à cette demande. Le CNRCH participera à alimenter cette plateforme avec ces génomes et à partager/développer des outils bioinformatiques.

La décision finale d'acceptation du dossier est en attente.

-Diversité génétique de *H. pylori* et pathologies gastriques :

En collaboration avec le National Institute of Health (Maryland, Etats-Unis. Correspondance : M. Constanza Camargo), un projet génomique sur *H. pylori* a été entrepris fin 2019 et a démarré pleinement en 2020.

Le but de cette étude est d'identifier des spécificités génomiques de trois populations de *H. pylori* : les souches isolées de cancer gastrique, de gastrites non atrophiques et les souches de lymphome gastrique de type MALT.

Seront appréciées dans ce projet les variations génomiques et épigénomiques selon la pathologie, le core génome et le pangénome, la présence de systèmes de restriction-modification, etc...

Notre ingénieur, Q Jehanne sera associé aux analyses bioinformatiques, parmi lesquelles l'étude de la synténie (conservation de l'ordre des gènes).

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 2017-2022 actualisé au 1^{er} avril 2021

Fonction	Nom	Qualification	Statut
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH
Responsable adjoint	Emilie Bessède	Ph., Dr. ès Sci	MCU-PH
Biologiste	Francis Mégraud	Ph., Dr Med	Pr Émérite, vacataire
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 Lecoer	BTS	CDI (40%)
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDD (80%)

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 administratif (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 microaérobie Concept-M400 (Ruskin Technology Ltd.) remplacée en 2017 ;
- un appareil Anoxomat (MART) et des jarres adaptées ;
- un automate d'extraction d'ADN Arrow (NorDiag) ;
- un lecteur de plaque ELISA (acheté en 2020) ;
- un inoculateur multipoint (pour CMI en milieu gélosé) (acheté en 2020) ;
- un appareil de PCR temps réel, le CFX96 Biorad (acheté en 2020 et mis à disposition sur le Plateau de Biologie Moléculaire du CHU de Bordeaux) ;

- un appareil de PCR syndromique, le BD MAX de Becton Dickinson, loué en 2020 pour 2 ans par le CNR et mis à disposition du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin ;
- un PSM ThermoFisher (remplacé en 2020) ;
- un microscope équipé d'une caméra (Olympus)
- une étuve à 35°C (remplacée en 2020);
- un réfrigérateur-congélateur ;
- cinq ordinateurs connectés aux SIL et au réseau du CHU de Bordeaux ;
- un photocopieur/imprimante/scan/fax acheté en 2018 et remplacé en 2021 ;
- 6 congélateurs à -80°C (New Brunswick Scientific) reliés au système de surveillance de la température 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 et d'un lecteur multifonction (dosages acides nucléiques en microplaque, lecteur de plaque type ELISA). Nous avons accès au SIRScan auto (I2A) aux 2 MALDI-TOF (Bruker) du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux, à la plateforme de biologie moléculaire du CHU et à celle du Département Sciences Biologiques et Médicales (Université de Bordeaux) pour réaliser nos PCR en temps réel.

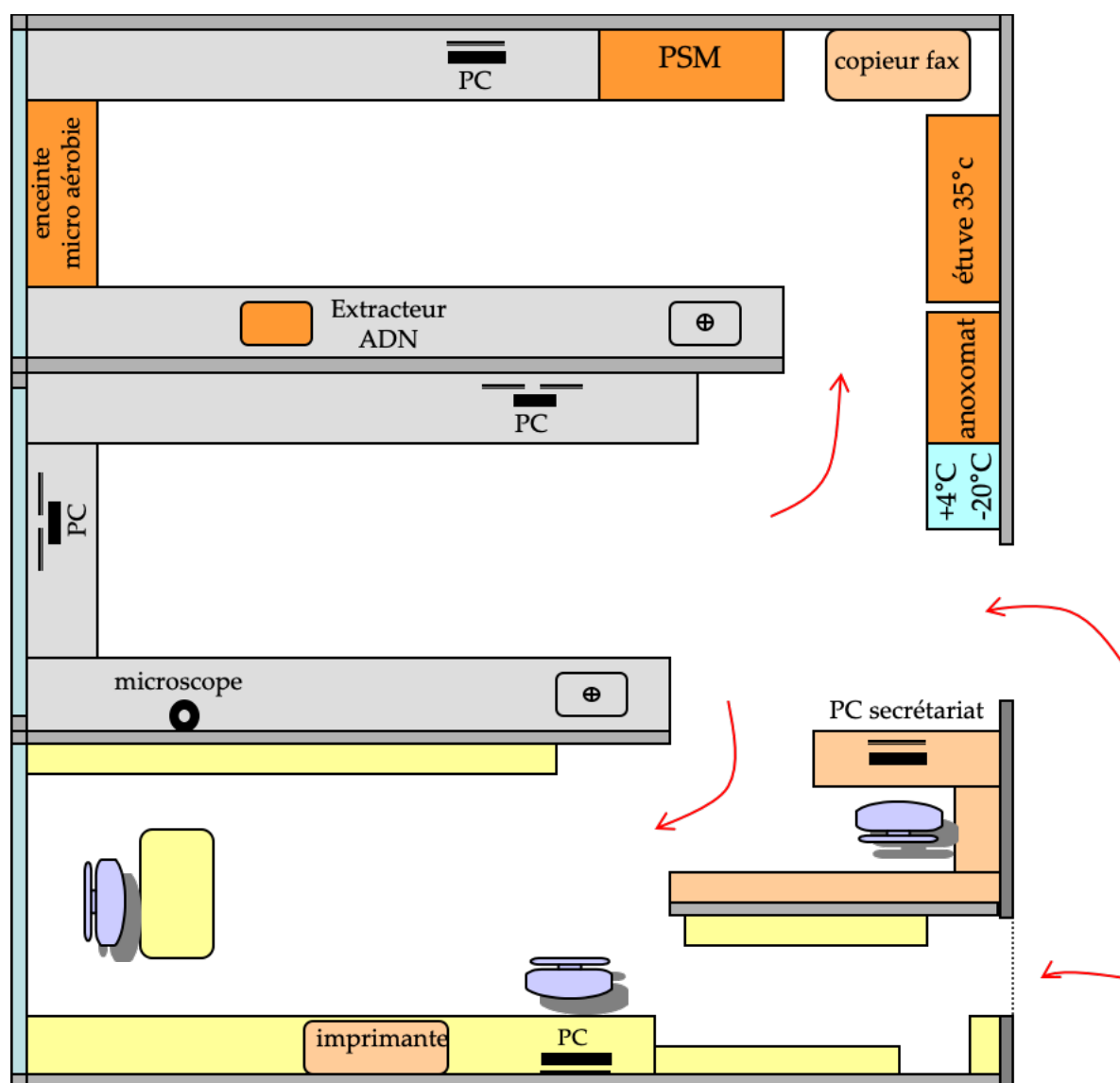


Figure 12 : Plan simplifié des locaux du CNRCH.

1.4.-Collections de matériel biologique

En 2020, nous avons transféré 257 souches de *Campylobacter* de l'année 2016 vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux : 121 pour Campy.HOP et 136 pour Campy.COM.
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*, *Helicobacters* entérohépatiques) de 2017 à 2021 (environ 4000 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=19).

1.5.-Démarche qualité du laboratoire

Le CNRCH fait parti 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.

Le CNRCH est toujours dans l'attente de l'audit d'extension par le COFRAC.

Le 12 novembre 2020, le CNRCH a participé à un audit « test – traçabilité » sur la technique suivante : « Détection de *H. pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel ».

Le test de traçabilité se base sur l'identification d'un examen pour lesquels les éléments de traçabilité vont être recherchés sur site. Une grille de traçabilité est transmise à l'avance au secteur pour que les audités sachent quels éléments leurs seront demandés mais toutes les preuves originales devront être vus lors de l'audit. Cette grille est très exhaustive car elle balaye tous les chapitres de la norme ISO 15189 et le SH-REF-02.

Bilan : 11 écarts.

Des Plans d'action pour répondre aux écarts ont été mis en place :

- sur le site <https://www.cnrch.fr/>, pour chaque analyse réalisée au CNRCH, les conditions et délais d'acheminement attendus y figurent ;
- à l'Accueil de Biologie Centralisée du CHU Pellegrin, lors de la réception des prélèvements transmis par les partenaires extérieurs, les agents au poste Admission collent une étiquette sur le bon de demande précisant à quelle température le prélèvement est arrivé : +5°C ou congelé -20°C ;
- tous les documents relatifs à la détection de *H. pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel ont été mis à jour ;
- mise à jour des nouvelles versions des manuels d'utilisation des appareils, des fiches techniques et des fiches de sécurité sur notre logiciel de gestion documentaire ;
- mise en place de cahier de vie pour les appareils utilisés (identification des appareils, fiche d'intervention)
- mise à jour de l'instruction sur la gestion des CIQ au CNRCH, en définissant les conditions pour garantir la qualité du résultat et, la traçabilité des témoins;
- l'outil de biothèque du logiciel GLIMS est utilisé depuis décembre 2020, afin de mettre en place une biothèque concernant les broyats et les ADN ;

Concernant les barrettes EUROGENTEC, nous avons intégré un suivi des numéros de lot, date d'expiration, date de mise en service sur la feuille de run pour l'extraction sur MagNA Pure 96 et la feuille de run pour la PCR en temps réel *H. pylori*.

Ces plans d'action ont pour deadline mars 2021.

Contrôle externes de qualité (CQE) réalisés en 2020 au CNRCH :

Le CNRCH participe chaque année aux contrôles de qualité externe européens proposés par l'ECDC via le Statens Serum Institut (Copenhague, Danemark), par le QCMD (Glasgow, Ecosse) ou le système Labquality :

- culture identification et antibiogramme *Campylobacters* ;
- PCR *Helicobacter pylori* ;
- détection Ag *H. pylori* dans les selles.

Résultats :

Programme EEQ	Examen	Méthode	Nb EEQ	Nb EEQ conformes
ECDC	Identification bactérienne (Campylobacter)	Maldi-Tof	5	5
	ATB	Diffusion en milieu gélosé		
QCMD	PCR <i>H. pylori</i>	PCR en temps réel LC480	10	10
Labquality	Détection Ag <i>H. pylori</i> /selles	Détection immunoenzymatique	6	6

Le CNRCH organise ou participe également à des essais inter-laboratoires (EIL) avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux :

- culture et antibiogramme *Helicobacter pylori* ;
- test respiratoire à l'urée marquée ^{13}C .

Résultats :

Programme EEQ	Examen	Méthode	Nb EEQ	Nb EEQ conformes
Ring Test	Culture <i>H. pylori</i>	Milieu sélectif	6	6
	Identification	Conventionnelle		
	ATB	Bandelettes CMI		
EIL	Test respiratoire ^{13}C	Analytical Précision AP2003	20	20

-Programme qualité pour 2021

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.

Suite à l'audit « test-traçabilité », le rapport de validation de méthode « Détection de *Helicobacter pylori* et détermination de la résistance à la clarithromycine par PCR en temps réel » est à retravailler. L'ingénieur doit réaliser en particulier des tests complémentaires sur la détection du gène de la bêta-globine humaine qui sert de témoins d'extraction d'ADN à partir de biopsies gastriques.

Durant le 3^{ème} trimestre de l'année 2020, le rapport de validation de méthode « Culture et antibiogramme Campylobacter » a été initié et sera à finaliser pour l'année 2021.

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 *Campylobacter* 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* ;
- PCR syndromiques à partir d'échantillons de selles sur appareil BD MAX (Becton Dickinson) ;
- séquençage de l'ARNr 16S pour identification ;
- PCR en temps réel pour la recherche des mutations à l'origine de la résistance des *Campylobacter* 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 (ou ELISA courant 2021 en remplacement de la RFC) ;
- «pipeline» d'analyses bioinformatiques appliquée à l'étude des génomes de *Campylobacter*.

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'ADNr 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 ;
- sérologie par chimiluminescence (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 immunoenzymatique ou moléculaire :

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 ou IgM) ou par réaction de fixation du complément (ces tests commerciaux vont progressivement disparaître).

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'antré 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-cerveille, 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 37°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 inscrite à la NABM.

Un format de PCR temps réel utilisable pour PCR sur échantillon de selles a été publié (Pichon M *et al.*, J Clin Microbiol 2020). La version commercialisée actuellement de ce kit de PCR semble cependant poser des problèmes techniques impactant la sensibilité et la spécificité des résultats.

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 condition particulière 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 diagnostique 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 2020) :

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

-inoculum : 3 McFarland ;

-incubation : atmosphère microaérobie, 37°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.