



RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2024

Année d'exercice 2023

CNR Campylobacter et Hélicobacter

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	<u>CHU de Bordeaux</u>	Pr <u>Philippe Lehours</u>

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants.....	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Organigramme.....	7
Mission et Organisation.....	7
Démarche Qualité.....	8
2. Activités d'expertise	9
2.1 Evolution des techniques	9
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	9
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	11
2.4 Collections de matériel biologique.....	12
2.5 Activités d'expertises.....	13
2.6 Activités de séquençage	14
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	28
3. Activités de surveillance	29
3.1 Description du réseau de partenaires	29
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	34
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	42
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	48
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	48
4. Alertes	54
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	55
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	55
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	57
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...).....	57
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR.....	58
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	58
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	64
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	67
8. Programme d'activité pour les années suivantes	68
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	72
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	72
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	73
1.3 Locaux et équipements.....	74

1.4 Collections de matériel biologique.....	75
1.5 Démarche qualité du laboratoire	78
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	79
2.1 Liste des techniques de référence.....	79
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	79
3. Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques).....	85
3.1 Permanence du CNR	85
3.2 Autorisations MOT	85
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale.....	85
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	85
3.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France	86
3.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR.....	87
3.7 Autres remarques à destination du comité des CNR	87

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

En 2023, l'activité *Campylobacter* a continué à se développer. Deux caractéristiques principales se sont confirmées. Le réseau des laboratoires hospitaliers a considérablement augmenté, résultant d'une sensibilisation et mobilisation accrues post-covid pour les épidémies et infections. L'apport de données et souches transmises au CNRCH par ce réseau a augmenté de 48% en 2023. Le nombre d'établissements hospitaliers a également progressé, créant un véritable maillage territorial, portant leurs actions à la fois sur les déclarations d'infections à *Campylobacter* mais aussi et plus fréquemment sur des cas particuliers multiples nécessitant un avis partagé et une expertise. Le réseau des laboratoires privés voit l'émergence confirmée de groupements de laboratoires qui réorganisent régulièrement leur fonctionnement et rationalisent leurs implantations géographiques. De nouveaux laboratoires nous ont rejoint sur des territoires jusqu'alors non représentés, appartenant pour la plupart à des groupements. Nos partenaires communautaires, historiques ou récemment entrés dans le réseau poursuivent leur partenariat avec intensité, régularité et très forte implication. Forts de leur groupement, ils nous permettent de couvrir les départements limitrophes souvent isolés. Certains sont souvent seuls sur un département pour participer à la surveillance épidémiologique. Douze laboratoires privés et historiques ont quitté le réseau suite à leur rachat par de grands groupes, stoppant de façon radicale leurs envois et fermant tout contact. L'arrêt des cultures et des antibiogrammes dans ces laboratoires est d'autant plus inquiétant que nous constatons en France et en 2023, une augmentation significative d'un nouveau mécanisme de résistance enzymatique aux macrolides (gènes *erm*). Les caractéristiques épidémiologiques et les taux de résistance aux antibiotiques sont néanmoins stables par comparaison aux années précédentes. Une enquête nationale menée par l'ONERBA nous permet également d'éclaircir cette épidémiologie en élargissant les réponses à des laboratoires non partenaires de notre réseau.

L'activité *H. pylori* du CNR s'est maintenue à un niveau identique aux années précédentes. Un nouveau réseau de surveillance épidémiologique a été mis en place mi-juin 2023 sur le modèle du réseau Campy-Internet : le réseau Hélico-net. Les résultats des six premiers mois de saisies ont été intégrés aux données collectées localement au sein du CNR. Nous améliorons, grâce au réseau Hélico-net, notre couverture nationale et constatons que la résistance primaire aux macrolides ré-augmente. Nous faisons ce constat à la fois au CNRCH ainsi que chez nos correspondants Hélico-net. Nous devons comparer ces données au niveau européen et pour les années à venir. Nous avons une meilleure vision des pratiques diagnostics des gastroentérologues et des laboratoires d'analyses pour *H. pylori*. Depuis le remboursement de la PCR au JO de décembre 2022, le CNR a été contacté par de nombreux laboratoires qui souhaitent mettre en place la PCR *H. pylori*. Le CNR a été très sollicité pour des conseils et pour l'automatisation de PCR sur des appareils de PCR syndromique type BD MAX ou Ingenius tel que publié par le CNR.

L'année 2023, pour le CNR *Campylobacters* et *Hélicobacters*, est une année de démarrage du nouveau projet 2023-2027 notamment nos projets NGS. L'équipe bioinformatique du CNR s'est étoffée par le recrutement d'un 0,5 ETP ingénieur supplémentaire, dédié à ces analyses. Nous avons travaillé sans relâche en 2023 pour finaliser, qualifier et améliorer notre pipeline d'analyse du résistome des *Campylobacters* et bactéries apparentées. Nous avons également mis en place un paramétrage informatique interne à notre SIL pour intégrer informatiquement ces résultats destinés à nos correspondants. Les EEQ de ce pipeline étaient tous conformes en 2023. Nous sommes enfin prêts pour mettre cette stratégie en routine dès 2024. Pour la partie NGS et *H. pylori*, une approche du résistome et du virulome de *H. pylori* au sein de biopsies gastriques a été développée. Un pipeline spécifique dédié à l'analyse de cette stratégie NGS a été construit. Le CNR sera pionnier en France en 2024 pour proposer cette stratégie réservée à des cas sévères d'infection par la technique, *DNA Capture*.

La démarche qualité du CNR a franchi un cap important avec l'avis favorable du COFRAC sur la PCR *H. pylori*, la culture et les antibiogrammes des *Campylobacters*. Les formations continues se sont poursuivies en 2023, sous la forme de webinaires, destinés à nos correspondants. Nous avons maintenu à jour et alimenté en informations nouvelles notre site internet qui a vu sa fréquentation augmenter en 2023. Le personnel biologiste du CNR a été par ailleurs très sollicité pour ses missions de conseils.

Remerciements

Le CNRCH remercie chaleureusement tous les laboratoires qui participent à son réseau pour leur envoi et pour la qualité de nos échanges. Nous présentons la plupart de nos correspondants qui ont accepté de figurer sur ce rapport (avant Annexe 1), en tant que partenaire du CNR et membre du dispositif de surveillance des infections à *Campylobacter* et/ou *Hélicobacters*.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

In 2023, the *Campylobacter* activities continued to grow. Two main features appear to be confirmed. The hospital laboratories network has grown considerably, as a result of increased post-covid awareness and mobilization for outbreaks and infections. The contribution of data and strains transmitted to the CNRCH by this network increased by 48% in 2023. The number of Hospitals has also increased, creating a real territorial network, focusing their actions not only on reports of *Campylobacter* infections, but also and more frequently on multiple individual cases, requiring shared opinion and expertise.

The private laboratory network has seen the confirmed emergence of laboratory groups that regularly reorganize their operations and rationalize their geographical locations. New laboratories have joined us in previously unrepresented territories, most of them belonging to groups. Our community partners, both long-standing and those who have recently joined the network, continue to pursue their partnership with intensity, regularity and strong commitment. Thanks to the strength of their groups, they enable us to cover neighboring, often isolated, departments. Twelve laboratories have left the network following their takeover by major groups. The cessation of cultures and antibiotic susceptibility testing in these laboratories is even more worrying given the significant increase in a new mechanism of enzymatic resistance to macrolides (*erm* genes) in France and in 2023. Epidemiological characteristics and antibiotic resistance rates are nevertheless stable compared with previous years. A national survey carried out by ONERBA also enables us to shed light on this epidemiology, by extending responses to laboratories that are not partners in our network.

The CNR's *H. pylori* activity remained at the same level as in previous years. A new epidemiological surveillance network was set up in mid-June 2023, modelled on the Campy-Internet network: the Helico-net network. The results of the first six months of data capture have been integrated with the data collected locally by the CNR. Thanks to the Helico-net network, we are improving our national coverage, and we are noticing that primary resistance to macrolides is increasing again. We are making this observation both at the CNRCH and with our Helico-net correspondents. We need to compare these data at European level and for the coming years.

We now have a clearer picture of the diagnostic practices of gastroenterologists and *H. pylori* laboratories. Since the reimbursement of PCR in the JO of December 2022. The CNR has been contacted by numerous laboratories wishing to implement *H. pylori* PCR. The CNR has been much in demand for advice and for PCR automation on syndromic PCR equipment such as BD MAX or Ingenius, as published by the CNR.

For the *Campylobacters* and *Helicobacters* CNR, 2023 is the start-up year for the new 2023-2027 project, in particular our NGS projects. The CNR bioinformatics team has been strengthened by the recruitment of an additional 0.5 FTE engineer, dedicated to these analyses. In 2023, we worked relentlessly to finalize, qualify and improve our analysis pipeline for the resistome of *Campylobacters* and related bacteria. We also set up an internal IT configuration at our LIS to integrate these results for our correspondents. The EEQs in this pipeline were all compliant in 2023. We are now ready to put this strategy into routine use from 2024. For NGS and *H. pylori*, we have developed an approach to the *H. pylori* resistome and virulome in gastric biopsies.

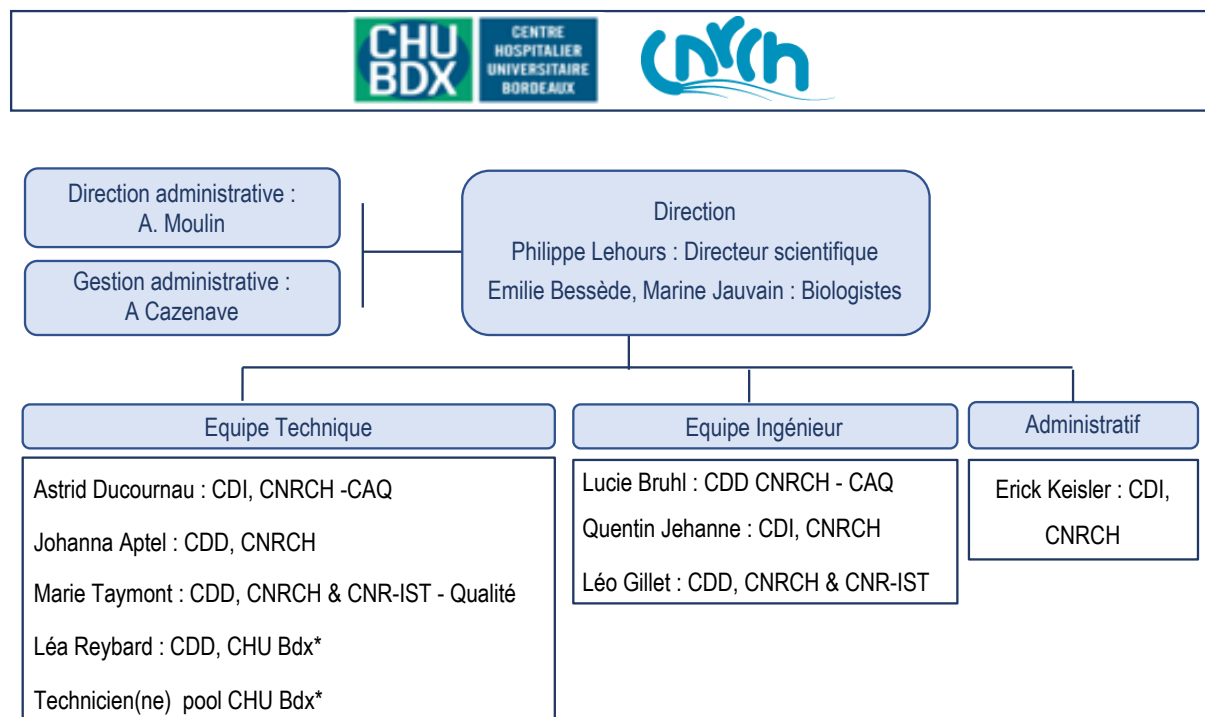
A specific pipeline dedicated to the analysis of this NGS strategy has been built. In 2024, the CNR will be the first in France to offer this strategy, reserved for severe cases of infection using the DNA Capture technique.

The CNR's quality approach reached an important milestone with the COFRAC's favorable opinion on *H. pylori* PCR, culture and *Campylobacter* antibiograms. Ongoing training continued in 2023, with webinars for our correspondents. We kept our website up to date and supplied it with new information. Its traffic increased in 2023. The CNR's biologist staff were also much in demand for their advisory services.

1. Missions et organisation du CNR

En l'absence d'éléments nouveaux : renvoyer à l'annexe 1.

Organigramme 2023



Fonction	Prénom-Nom	Qualification	Statut
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., DR. ès Sci	PU-PH
Biologiste	Emilie Bessède	Ph., DR. ès Sci	MCU-PH
Biologiste	Marine Jauvain	Ph.,	AHU
Ingénieur hospitalier CAQ	Lucie Bénéjat-Bruhl	M2	CDD
Ingénieur hospitalier	Quentin Jehanne	Dr. ès Sci	CDI
Ingénieur hospitalier	Léo Gillet	M2	CDD
TLM, CAQ	Astrid Ducournau	BTS	CDI
TLM CHU Bordeaux	Johanna Aptel	BTS	CDD
TLM CHU Bordeaux	X (pool des TLM de Bactériologie du CHU Pellegrin)	BTS	CDI
TLM CHU Bordeaux	Léa Reybard (préparation milieu de culture)	BTS	CDI
TLM qualité	Marie Taymont	BTS	CDD
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDI

Pas d'évolution interne en 2023 par rapport à 2022. Marine Jauvain est partie en congés maternité le 15/12/2023.

Mission et Organisation

Aucune évolution notable dans les missions du CNR depuis le dépôt de candidature de renouvellement.

Démarche Qualité

Audits : Un audit de traçabilité sur la culture et les antibiogrammes de *H. pylori* a été réalisé au sein du CNR le 27/06/2023. Il a fait l'objet de 4 écarts et d'une remarque. A ce jour, un seul écart reste à clôturer. Il concerne l'avancement du dossier de validation de méthode pour la culture de *H. pylori*. L'ensemble de l'équipe est mobilisé pour finaliser ce dossier pour la fin du premier trimestre 2024.

Le CNR a eu sa 1ère visite COFRAC en décembre 2022. A l'issue de cet audit, aucun écart n'a été soulevé.

Le laboratoire est officiellement accrédité pour l'identification et la culture des *Campylobacter* sp (ligne de portée BM MG11), pour l'antibiogramme (ligne de portée BM MG12) et autres germes apparentés. Le CNR est également accrédité pour détection de *H. pylori* par PCR (BM BA02).

EEQ/CIL :

Programme EEQ	Examen	Méthode	No. EEQ	No. EEQ conformes	Précisions
ECDC	Identification <i>Campylobacter</i> sp + antibiogramme	MALDI-TOF + diffusion en milieu gélosé	6	6	
QCMD	PCR <i>H. pylori</i>	PCR en temps réel	18	18	
Ring Test (CIL)	Culture <i>H. pylori</i> + identification antibiogramme	Milieu sélectif maison, identification conventionnelle, CMI par Etest	6	5	Discordance mineure pour la sensibilité au métronidazole
LabQuality	Détection des antigènes de <i>H. pylori</i> dans les selles	Détection immunochromatographique	6	6	
INSTAND	Sérologie <i>C. jejuni</i>	ELISA	2	2	

EEQ du pipeline bioinformatique du CNR : régulièrement, l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) au travers du réseau «FWDAMR-RefLabCap» (<https://www.fwdamr-reflabcap.eu>) propose aux laboratoires nationaux de références d'analyser une sélection de souches de *Campylobacter* sp. dans le but d'harmoniser, au sein de l'union européenne, la détection de l'espèce ainsi que la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

Il s'agit d'un test important pour pouvoir valider le pipeline d'analyses automatiques de génomes du CNRCH. Les résultats génomiques obtenus étaient en adéquation avec ce que l'ECDC attendait. Le pipeline d'analyses du CNR et plus particulièrement la base de données de résistance établie et affinée au cours du temps a permis de retrouver précisément chaque mutation et gène de résistance. Plus de détails seront fournis dans la partie 2.6 de ce rapport « Activités de séquençage ».

Projets pour l'année 2024 :

L'accréditation se poursuit et va s'étendre avec l'ajout d'autres examens. Il est prévu de demander un ajout pour la culture, l'identification et l'antibiogramme de *H. pylori*.

Nous prévoyons un audit qualité interne pour la sérologie de *Campylobacter jejuni* et la détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles afin de proposer ces examens au COFRAC en vue d'obtenir l'accréditation de 100% des techniques lors de la prochaine visite.

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

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

Le CNRCH a finalisé en 2023 la mise en place d'un pipeline d'analyses automatisées des génomes de *Campylobacter sp* et un autre pipeline pour l'analyse du résistome et du virulome de *H. pylori* par technique de capture d'ADN. Nous avons développé en collaboration avec la cellule bio-informatique du Pôle de Biologie du CHU de Bordeaux, un paramétrage permettant d'intégrer nos résultats de génomique bactérienne au sein de notre logiciel GLIMS afin de les rendre accessibles à nos correspondants dès la validation biologique. Ceci sera présenté dans le bilan 2023 des activités de NGS du CNR. Nous sommes donc prêts pour déployer la génomique en routine en 2024 au CNRCH (cf projets).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Travaux relatifs aux infections à *Campylobacter sp*

-Évaluation des performances du test Sofia Fluorescence-Immuno-Assay pour la détection rapide des antigènes de *Campylobacter* dans les selles (Sofia-C-FIA). Collaboration avec les laboratoires Quidel.

Contexte : Les espèces les plus fréquemment responsables de la campylobactériose sont *C. jejuni* et *C. coli*, suivies de *C. fetus*, *C. upsaliensis* et *C. lari*. La PCR permet de détecter l'ADN de *Campylobacter* dans les échantillons de selles. Cependant, les tests PCR sont souvent validés pour *C. jejuni* et *C. coli* uniquement, et les résultats des coprocultures peuvent prendre plusieurs jours. Pour les laboratoires qui n'ont pas accès à la PCR, les tests antigéniques rapides peuvent donc apporter une valeur ajoutée au diagnostic précoce de la maladie. L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances du Sofia Fluorescence-Immuno-Assay pour la détection rapide des antigènes de *Campylobacter* dans les selles (Sofia-C-FIA).

Méthodes : 93 échantillons de selles congelés et 207 échantillons de selles ont été inclus dans l'évaluation rétrospective et prospective, respectivement. La linéarité du test et sa limite de détection (LOD) pour les différentes espèces de *Campylobacter* ont été évaluées dans des séries de dilution. La réactivité croisée avec les espèces phylogénétiques apparentées a été étudiée. Le résultat de la PCR obtenu à l'aide du BD Max Enteric Panel a été considéré comme référence.

Résultats : Évaluation rétrospective : La sensibilité de la Sofia-C-FIA était de 97,85 % (IC 95 % : 91,71 - 99,63 %) par rapport à la PCR. Évaluation prospective : La sensibilité de la Sofia-C-FIA par rapport à la PCR était de 97,14 % (IC à 95 % : 83,38 - 99,85). La spécificité était de 100 % (IC à 95 % : 97,28 - 100 %). Linéarité dans les séries de dilution : élevée pour *C. coli*, *C. jejuni*, *C. armoricus*, *C. ornithocola*, *C. lari* et *C. upsaliensis*, avec un coefficient de corrélation compris entre 0,9912 et 0,999. *C. fetus* n'a pas été détecté. Réactivité croisée : Pas de réactivité pour *Aliarcobacter butzleri*, *Helicobacter cinaedi* et *H. pullorum*. LOD : la concentration minimale pour un résultat positif au seuil spécifique du test était de 4 à 17 millions d'UFC/mL ; le LOD se situait entre 10⁶ et 10⁷ UFC/mL.

Conclusion : Le test Sofia-C-FIA a montré une forte corrélation avec la culture et la PCR et aucune réactivité croisée avec des espèces phylogénétiques apparentées. La corrélation linéaire de la fluorescence avec les UFC/mL était élevée. Sa capacité à détecter les antigènes de diverses espèces de *Campylobacter* peut contribuer à un diagnostic précoce. Toutefois, la non-détection de *C. fetus* doit être prise en considération.

Ces résultats seront présentés en poster au congrès de l'ECCMID en avril 2014 à Barcelone. Un article scientifique est en cours d'écriture.

-Évaluation des performances du kit GI Bacterial PLUS ELITE MGB Kit® dans le diagnostic des infections bactériennes intestinales. Collaboration avec les laboratoires Elitech.

Contexte : Le diagnostic bactériologique des infections bactériennes intestinales repose historiquement sur la culture sur milieux gélosés mais cette dernière a été supplantée ces dernières années par les PCR dites

syndromiques plus rapides et plus sensibles. Notre objectif était d'évaluer les performances cliniques du GI Bacterial PLUS ELITE MGB Kit® sur la plateforme automatisée ELITE InGenius (ELITechGroup S.p.A.) pour la détection de bactéries entéropathogènes dans le cadre de diarrhées aiguës communautaires.

Matériels et méthodes : 220 selles de la collection du CNRCH ont été incluses rétrospectivement dans cette étude. Toutes, sauf une, étaient positives à la fois en culture et par PCR à au moins un pathogène entérique. Elles ont été testées sur plateforme automatisée ELITE InGenius à l'aide du GI Bacterial PLUS ELITE MGB Kit® qui détecte *Campylobacter sp*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Yersinia sp* et *Clostridioides difficile*. En cas de discordance avec le résultat attendu, les selles ont été testées une deuxième fois sur plateforme automatisée ELITE InGenius et les ADN extraits testés par différentes PCR temps réel (maison ou commerciaux).

Résultats : Sur les 220 échantillons, 100 étaient attendus positifs à *Campylobacter sp* (*C. jejuni* ou *C. coli*), 56 à *Salmonella spp*, 31 à *Shigella spp* et 39 à *Yersinia enterocolitica*. Seules 3 discordances ont été répertoriées sur GI Bacterial PLUS ELITE MGB: 3 faux positifs dont 1 à *Salmonella* (avec Ct très tardif >40 cycles), 1 à *Campylobacter* (Ct tardif >35) et 1 à *Shigella* (Ct tardif >35). Globalement pour *Campylobacter*, *Salmonella*, et *Shigella*, les sensibilités et les spécificités allaient de 99 à 100%. La détection de *Yersinia* était parfaite avec une sensibilité et une spécificité de 100%.

Conclusion : Les performances cliniques du kit GI Bacterial PLUS ELITE MGB Kit® sont excellentes. Il peut être utilisé comme un outil de routine dans le diagnostic rapide des gastro-entérites bactériennes.

Ces travaux ont été présentés lors du congrès de la RICAI 2023 par P Lehours dans le cadre d'un symposium organisé par les laboratoires Elitech.

-Evaluation du milieu Campy-BAP de BD pour l'isolement de Campylobacter dans les selles

Cette évaluation est rétrospective sur 29 selles conservées à -80°C reçues au laboratoire en 2020 et positives en culture (+PCR) à *C. jejuni* ou *C. coli*.

Ces 29 selles ont été utilisées pour évaluer l'isolement de *Campylobacter* et la présence de contaminants sur le milieu Campy-BAP (BD Campylobacter Agar with 5 Antimicrobials and 10 % Sheep Blood) de Becton Dickinson (référence 254001). Le milieu utilisé en routine au CNRCH et au laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux est Campylosel (CAM) de bioMérieux.

Les 29 selles ont été ensemencées à la fois sur le milieu CAM et le milieu Campy-BAP, et mises à incuber en microaérobiose jusqu'à 72h.

Sur 29 selles, 20 selles étaient positives sur les 2 milieux testés à *C. jejuni* ou *C. coli*, et 6 négatives sur les 2 milieux à la fois. Trois selles étaient positives uniquement sur le milieu CAM.

La sensibilité calculée pour le milieu Campy-BAP était de 69% et pour le milieu CAM de 79,3%.

Pour 22 selles, la présence de contaminants était plus importante sur le milieu Campy-BAP par rapport au milieu CAM.

Cette évaluation montre une performance supérieure du milieu CAM de bioMérieux par rapport au milieu Campy-BAP de BD.

Ces résultats ont été en particulier transmis au laboratoire de Biologie du CH de La Roche Sur Yon, qui nous avait interpellé sur un chute du nombre d'isolements à *Campylobacter* secondaire à un changement de gélose.

Travaux relatifs aux infections à *Helicobacter sp*

-Le CNR n'a pas été sollicité par des industriels en 2023 pour évaluer de nouveaux tests diagnostic.

-Evaluation des performances du milieu sélectif *Helicobacter pylori* commercialisé par Becton Dickinson.

Introduction : L'isolement en culture de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques nécessite l'ensemencement de milieux de culture gélosés sélectifs. La majorité des laboratoires utilisent un milieu commercial prêt à l'emploi. Le laboratoire Becton Dickinson commercialise la gélose BD Helicobacter Agar. Cette gélose est préparée sur une base Columbia, avec du sang de cheval lysé et une combinaison d'agents antimicrobiens.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la performance de cette gélose par rapport au milieu sélectif « maison » à base de sang humain (gélose Pylo) utilisé en routine au CNRCH depuis de nombreuses années.

Matériel et méthodes : 39 biopsies reçues en routine et positives par PCR temps réel pour *H. pylori*, durant la période de septembre 2023, ont été après broyage ensemencées en parallèle sur géloses BD Helicobacter Agar et Pylo, puis incubées maximum 10 jours à 37°C en atmosphère microaérobie. La rapidité de croissance, l'abondance en colonies, leur aspect et la présence éventuelle de contaminants ont été relevés toutes les 48h.

Résultats : Sur 39 biopsies positives à *H. pylori*, 76,9% étaient positives en culture sur gélose Pylo et 71,8% sur gélose BD Helicobacter. Les temps de pousse étaient identiques entre les 2 milieux, soit de 5 jours. Les colonies bactériennes étaient globalement plus petites sur BD Helicobacter que sur gélose Pylo mais néanmoins facilement repérables. La présence de colonies contaminantes était légèrement plus fréquente sur gélose Pylo que sur BD Helicobacter.

Conclusion : La gélose BD Helicobacter Agar présente donc des performances tout à fait satisfaisantes pour isoler en culture *H. pylori* à partir de biopsies gastriques. Le délai jusqu'à péremption est généralement de 4 semaines.

-Adaptation de la technique de capture d'ADN au diagnostic par NGS sur biopsie gastrique de l'infection à *H. pylori*. Collaboration avec les laboratoires Agilent.

Contexte : Le diagnostic bactériologique de l'infection par *H. pylori* à partir de biopsies gastriques nécessite soit une PCR, soit une culture. La culture échoue parfois en raison de la fragilité et de la croissance complexe de la bactérie. Le séquençage NGS, à partir d'échantillons primaires, est une solution pour étudier le résistome bactérien. Nous décrivons ici la mise en œuvre d'une nouvelle technique qui enrichit la biopsie en ADN d'intérêt, améliorant ainsi la qualité du séquençage NGS pour permettre l'étude du résistome et du virulome de la bactérie.

Matériels et méthodes : 37 extraits d'ADN de biopsies gastriques, conservés à -80°C, ont été utilisés. La majorité de ces patients souffraient de gastrite ou d'épigastalgies. Pour ces patients, l'âge moyen était de 50,3 ans, avec un sex-ratio H/F de 0,32. Tous les ADN étaient positifs pour *H. pylori* par PCR en temps réel. Sur ces 37 biopsies, 21 étaient positives en culture et 16 étaient négatives.

Le protocole SureselectXT de Agilent a été adapté pour être utilisé sur automate Magnis (50 à 100ng d'ADN). Le séquençage NGS a été réalisé sur le séquenceur Iseq100 (Illumina). Les sondes ARN utilisées sont celles du virulome (*cagA* et *vacA*), du résistome (*ADNr 23S*, *ADNr 16S*, *gyrA*, *rpoB*, *pbp1*, *rdxA*, *frxA*, *fdxb*) et du typage MLST. Les mêmes gènes ont été amplifiés par PCR en point final et séquencés par Sanger à partir des 21 ADN génomiques de souches de *H. pylori* isolées en culture. Ces séquences ont été comparées à celles obtenues par capture d'ADN.

Résultats : Sur les 37 ADN testés, 32 étaient analysables en DNA capture. La limite de détection a été estimée à approximativement 10⁴5 UFC/mL. Les mutations de l'ADNr 23S associées à la résistance aux macrolides et celles de la QRDR de *gyrA* associées à la résistance à la lévofloxacine, celles associées à la résistance aux rifamycines sont correctement détectées. La classification MLST obtenue par cette technique est cohérente avec celle obtenue après analyse des séquences Sanger. Le gène *cagA* est bien détecté, ainsi que les génotypes de *vacA*.

Conclusion : Nos résultats montrent que la technique de DNA capture permet un accès fiable au résistome et au virulome de *H. pylori* directement à partir de biopsies. Cette approche sera proposée par le CNRCH sur un nombre limité de biopsies gastriques. Un nouveau jeu de sondes est en cours de test.

Un article scientifique est en cours d'écriture.

La partie développement des outils bioinformatiques d'analyse des résultats de DNA capture sera présentée dans la partie NGS de ce rapport.

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 Hélicobacters.

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 2023, nous avons répondu à 19 demandes d'envoi représentant 114 isolats (97 souches de *Campylobacters*) et 17 souches de *H. pylori*) et 101 prélèvements (87 broyats de biopsies gastriques, 7 selles et 7 extraits d'ADN de biopsies gastriques).

Date	Destinataire	Nature	Nombre
31/01	CHU Grenoble, Bactériologie	Aliquots selles Ag <i>H. pylori</i>	7
01/02	CHU Trousseau Tours, Bactériologie	Souches <i>H. pylori</i>	2
20/02	CH d'Aix, Bactériologie	Souche <i>H. pylori</i>	1
14/03	LENYS BIOGROUP Colmar	<i>H. pylori</i> : broyats biopsies	30
13/04	CHU de Lyon, Bactériologie	Souches <i>H. pylori</i>	6
19/04	CHU de Lyon, Bactériologie	Souche <i>H. pylori</i>	1
11/05	BioMérieux, Support Application Bactériologie	Souches de <i>C. jejuni</i> discordance identification MALDI-TOF	3
24/05	CHU de Lyon, Bactériologie	Souches <i>H. pylori</i>	4
18/07	U996 Inserm, Orsay	Souches <i>H. pylori</i>	2
24/07	Laboratoires BIOASTER, Lyon	Souches de <i>Campylobacters</i>	89
06/09	CH Avranches, Bactériologie	Souche de référence <i>C. jejuni</i>	1
10/10	CH Perpignan, Bactériologie	Broyats de biopsies gastriques	30
03/11	R-Biopharm AG, Darmstadt - Allemagne	Broyats de biopsies gastriques	15
14/11	Institut Pasteur Collection Paris	Souches <i>C. lutetiae</i>	2
14/11	University of Infectious disease Götterborg Sweden	Souches <i>C. lutetiae</i>	2
05/12	CH Valenciennes, Bactériologie	ADN estomac bloc FFPE, test PCR	4
05/12	Anne-Gaëlle RANC, HCL, Bactériologie	ADN estomac bloc FFPE, test PCR	3
13/12	Laboratoire NOVABIO	Broyats de biopsies gastriques	12

2.4 Collections de matériel biologique

En 2023, nous avons transféré 307 souches de *Campylobacter sp* de l'année 2019 vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux : 160 issues d'hôpitaux et 147 de laboratoires privés.

Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants et habituels (cf tableau ci-dessous).

Les répartitions exactes du nombre de souches pour 2023 sont :

Critères	Laboratoires privés	Hôpitaux
Espèces autres que <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	52	73
<i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> issus d'hémocultures	12	30
Prélèvements autres que selles et hémocultures	0	4
<i>Campylobacters</i> résistants à l'érythromycine	17	14
Souches séquencées par NGS	66	39
Total	307	

L'organisation, les conditions de stockage etc... seront présentées en Annexe 1.

2.5 Activités d'expertises

Activités d'expertises concernant les *Campylobacters*

Notre CNR travaille avec un réseau de 148 laboratoires actifs (versus 137 en 2022) : 60 laboratoires privés appartiennent à des groupements de laboratoires et 88 laboratoires hospitaliers, participent respectivement aux réseaux Campy.COM et Campy.HOP. Ces laboratoires nous envoient leurs souches par un système de transport organisé par le CNR ou par leur propre organisation.

29 de ces correspondants dont 16 hôpitaux (8 CHU, 8 CH et CHG) saisissent 90% des souches isolées directement via un accès sécurisé et intégré au site internet du CNR (réseau Campy.Internet). Ces correspondants n'envoient que 10% de leurs souches 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 2023

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy-Internet	TOTAL
Nb.	1654	3343	5761	10758

363 souches n'ont pas pu être subcultivées à l'arrivée au CNR.

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 pour les correspondants ne disposant pas d'une adresse mail sécurisée type MSSanté ou apicrypt).

Activités d'expertises concernant *H. pylori*

Le CNR travaille avec un réseau de correspondants du CHU de Bordeaux (3%), de la région bordelaise (72,9%) et extérieurs à la région bordelaise (24,1%) : 42 CH/CHU et 16 laboratoires privés. Le laboratoire Eurofins Biooffice de Lormont/Bordeaux Nord est le plus gros correspondant pour *H. pylori*.

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de prélèvements reçus en 2023 par type de correspondants et par type de prélèvements.

	CHU de Bordeaux			Externes			TOTAL
	Biopsies gastriques, souches, ADN	Sérologies	Selles	Biopsies gastriques, souches, ADN	Sérologies	Selles	
Nb.	76	491	10	2557	37	23	3194
%	2,4%	15,3%	0,3%	80,1%	1,2%	0,7%	100%

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 pour nos correspondants préférant la voie postale).

En 2023, le CNR a reçu 2606 prélèvements (hors sérologie) pour recherche de *H. pylori*. Ces prélèvements provenaient du CHU de Bordeaux et de 44 hôpitaux français (stable par rapport à 2022) ainsi que de 16 correspondants extérieurs dont 12 laboratoires privés et 3 hôpitaux privés. Nous avons également reçu 528 demandes de sérologies *H. pylori* non traitées par le CNR (versus 547 en 2023) dont 92,2 % venant du CHU de Bordeaux. Ces sérologies sont réalisées sur automate Liaison XL sur le Plateau Automatisé de Biologie Médicale (PABIM) du pôle de Biologie et Pathologie du CHU de Bordeaux.

2.6 Activités de séquençage

Depuis la mise en place de séquençage haut-débit au CNRCH en 2017 et jusqu'à début 2024, un total de 1724 souches a été séquençé. Au total, ce sont 1577 génomes d'espèces de *Campylobacter* stockés et disponibles à tout moment dans notre base de données, dont : 911 *C. jejuni*, 645 *C. coli*, 7 *C. fetus*, 3 *Campylobacter* sp non identifiés à ce jour, 3 *C. lanienae*, 2 *C. lari*, 2 *C. rectus*, 2 *C. upsaliensis* et 1 souche de *C. showae*, et *C. ureolyticus*. Nous disposons également de 44 génomes de *Aliarcobacter butzleri*, 3 *A. cryaerophilus* et 1 *Aliarcobacter* sp non identifié. Pour ce qui est des bactéries du genre *Helicobacter*, une importante variété d'espèces a été séquençée pour une centaine de génomes. Nous avons ainsi à disposition des génomes de souches de *H. pylori* (les plus représentées avec 62 génomes), *H. cinaedi*, *H. caesarodunensis*, *H. canis*, de nouvelles espèces telles *H. burdigaliensis* et *H. labetoulli* mais aussi des espèces rares comme par exemple *H. muridarum*, *H. pametensis* ou bien *H. fennelliae*.

Notre base de données de séquences contient également une liste de gènes ou mutations associés à la résistance aux antibiotiques couramment utilisés pour le traitement des infections à *Campylobacter* et *Helicobacter*. Cette dernière est utilisée en routine et compte pas moins d'une centaine de mécanismes décrits dans la littérature ou identifiés au CNRCH. Les plus représentés sont : les mutations dans la région QRDR de la GyrA (résistance aux fluoroquinolones), les mutations dans l'ADNr 23S et l'expression de méthyltransférases *erm(B)* et *erm(N)* (résistance aux macrolides), une multitude de variants d'aminoglycoside-phosphotransférases de type APH, AAC, ANT (résistance aux aminoglycosides) et gène *tet* (pour les tétracyclines). Sont également représentées des mutations plus rares notamment dans la séquence de la protéine Pbp1 (amoxicilline) ou bien RpoB (rifampicine). Nous disposons également des séquences de plusieurs gènes et mutations permettant de réaliser du typage moléculaire ainsi que de l'attribution de source de contamination : 7 gènes pour *H. pylori*, 22 pour *C. jejuni* et 259 mutations pour *C. coli*. Est finalement stockée sur notre serveur une base exhaustive de génomes de référence (n=142) permettant de réaliser l'identification des différentes espèces que nous séquençons, avec également les séquences de la protéine GyrA et ADNr 16S correspondantes.

-Activité globale de séquençage en 2023

Un total de 6 runs de séquençage, comptabilisant 356 souches, a été effectué en 2023. Trois runs ont été effectués à partir du séquenceur ISeq 100 disponible au CNRCH (n=68 souches) et trois autres runs via la société Integragen et le séquenceur NovaSeq 6000 (n=288 souches).

Tableau. Total des runs et des souches séquençées depuis 2017. En rouge sont indiqués les runs de 2023.

Nom du run	Génomes	N de génomes
0001-HELIXIO-2017-P1	00001 ➡ 00096	96
0002-HELIXIO-2017-P2	00097 ➡ 00236	140
0003-HELIXIO-2017-P3	00237 ➡ 00249	13
0004-INTEGRAGEN-2018-P1	00250 ➡ 00345	96
0005-INTEGRAGEN-2019-P1	00346 ➡ 00441	96
0006-INTEGRAGEN-2019-P2	00442 ➡ 00537	96
0007-INTEGRAGEN-2020-P1	00538 ➡ 00633	96
0008-INTEGRAGEN-2020-P2	00634 ➡ 00729	96
0009-INTEGRAGEN-2020-P3	00730 ➡ 00825	96
0010-CNRCH-2020-P1	00826 ➡ 00849	24
0011-CNRCH-2020-P2	00850 ➡ 00873	24
0012-CNRCH-2020-P3	00874 ➡ 00893	20
0013-INTEGRAGEN-2021-P1	00894 ➡ 00989	96
0014-INTEGRAGEN-2021-P2	00990 ➡ 01085	96
0015-CNRCH-2021-P1	01086 ➡ 01109	24
0016-CNRCH-2021-P2	01110 ➡ 01132	23
0017-CNRCH-2022-P1	01133 ➡ 01156	24
0018-CNRCH-2022-P2	01157 ➡ 01178	22
0019-INTEGRAGEN-2022-P1	01179 ➡ 01274	96
0020-INTEGRAGEN-2022-P2	01275 ➡ 01370	96
0021-CNRCH-2023-P1	01371 ➡ 01394	24
0022-CNRCH-2023-P2	01395 ➡ 01414	20
0023-CNRCH-2023-P3	01415 ➡ 01438	24
0024-INTEGRAGEN-2023-P1	01439 ➡ 01534	96
0025-INTEGRAGEN-2023-P2	01535 ➡ 01630	96
0026-INTEGRAGEN-2023-P3	01631 ➡ 01726	96

Tableau. Evolution du nombre de souches séquencées depuis 2017 au CNRCH.

Année	No. de souches séquencées
2017	249
2018	96
2019	192
2020	356
2021	239
2022	238
2023	356
prévision 2024	2000-2500

● Autres ● *Campylobacter coli* ● *Campylobacter fetus* ● *Campylobacter jejuni*
 ● Autres *Campylobacter* ● *Helicobacter sp*

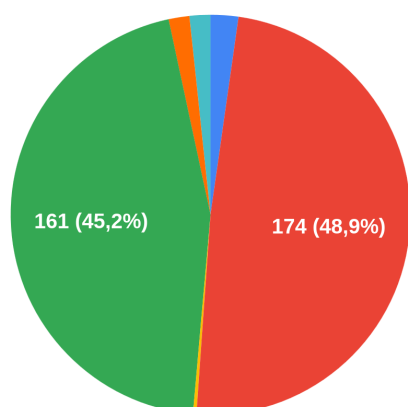


Figure. Bactéries séquencées en 2023 au CNRCH.

Autres=Espèces apparentées (*Aliarcobacter sp.*), ou espèces non identifiées au MALDI-TOF (total 2,2%); Autres *Campylobacter* = *C. lanienae*, *C. rectus*, *C. upsaliensis* et *C. ureolyticus* (total 1,7%); *C. fetus*=1 souche séquencée.

Par rapport aux deux années précédentes et en lien avec la nouvelle stratégie de séquençage du CNRCH, le nombre de souches séquencées a significativement augmenté. Cela comprend principalement des souches de *C. jejuni* et *C. coli* en nombre équivalent.

En 2024, nous pouvons enfin mettre en place notre stratégie de séquençage massif de *Campylobacters*. Nous prévoyons entre 2000 et 2500 génomes.

-Le CNR a actualisé en 2023 son «pipeline» d'analyse automatisé des génomes de *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Aliarcobacter*.

En 2023, plusieurs modifications ont été apportées au pipeline d'analyses bioinformatiques des données NGS. Elles ont été effectuées pour répondre à des besoins de performance (rapidité) et de pertinence des résultats.

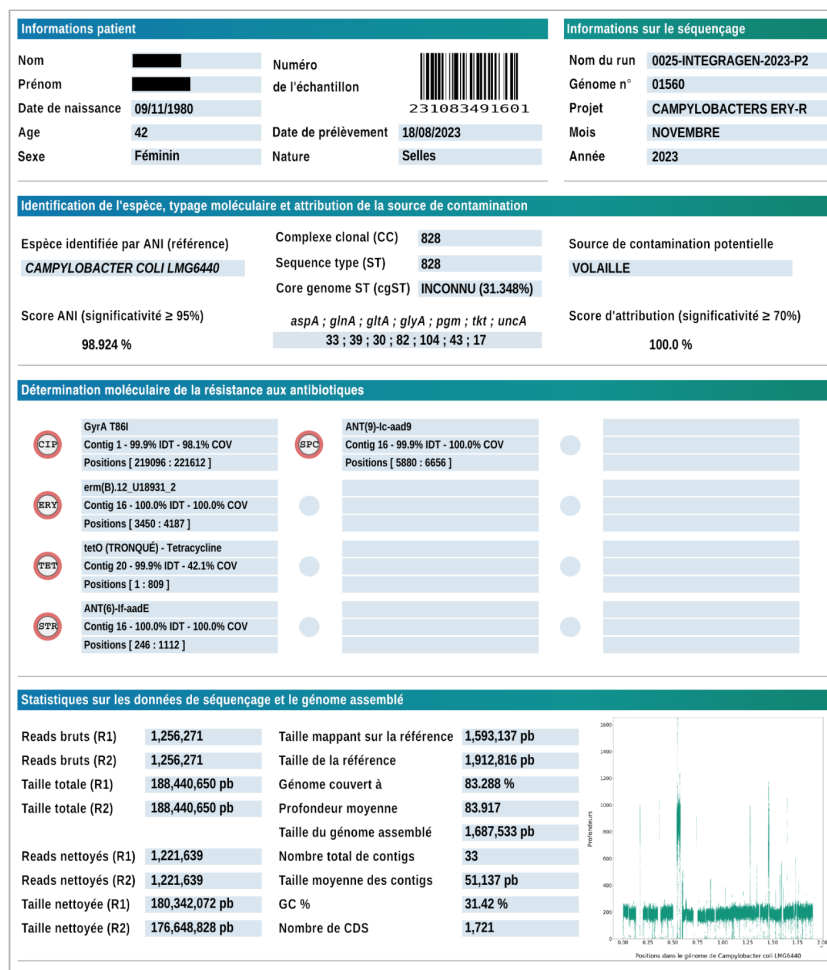
```

qjehanne@cnrchws:~/pipeline — /bin/bash ./exec_skesa.sh
>> CNRCH CAMPYLOBACTER ANALYSIS PIPELINE <<
RUN "0028-HENRIMONDOR-2024-P0" ISOLATE 01789 (4/10)
02/09/24 14:09:26 Step 1 Data cleaning ...
02/09/24 14:10:00 Step 2 Genome assembly ...
02/09/24 14:17:31 Step 3 Plasmids detection ...
02/09/24 14:19:13 Step 4 Resistance finding ...
02/09/24 14:19:34 Step 5 Species identification ...
02/09/24 14:20:09 Step 6 Molecular typing ...
02/09/24 14:20:15 Step 7 Core genome molecular typing ...
02/09/24 14:26:03 Step 8 Source attribution ...
02/09/24 14:30:54 Step 9 Data statistics ...
02/09/24 14:42:20 Step 10 Generating results file ...
  
```

Figure. Version 2024 du pipeline avec les différentes nouvelles étapes et temps de calcul correspondants.

Parmi les modifications majeures nous pouvons noter :

- Une nouvelle méthode d'assemblage du génome bactérien : Cette étape était initialement réalisée avec l'outil SPAdes. Cet outil, bien que performant, présentait quelques défauts dont un assemblage demandeur en puissance de calcul et des résultats sur la détection de gènes et mutations parfois incorrects. Pour pallier ces problèmes, l'outil SKESA, dédié spécifiquement à l'assemblage de génomes bactériens, a été testé et a montré des résultats convaincants. Ce dernier est plus rapide (temps d'assemblage divisé par deux) et permet de trouver des marqueurs de résistance de manière plus pertinente.
- Détection de la résistance aux antibiotiques plus rapide : L'outil utilisé pour détecter les marqueurs de résistance aux antibiotiques reste le même, c'est-à-dire blastn. Cependant, les paramètres de l'outil ont été revus pour améliorer la rapidité de détection. Cette étape recherche maintenant plus de 20,000 gènes et mutations au sein d'un génome en 10 à 15 secondes contre 5 minutes avec la version précédente du pipeline. La qualité des résultats n'est pas impactée.
- Détection de l'ADN d'origine plasmidique : La version précédente du pipeline ne donnait aucune indication concernant l'origine d'une séquence d'ADN, à savoir chromosomique ou plasmidique. L'outil RFPlasmid a été ajouté au pipeline pour pallier ce manque. Le pipeline informe maintenant si un gène de résistance peut-être partagé entre les différentes souches de *Campylobacter* ou de *Helicobacter* si celui-ci est trouvé au sein d'un plasmide.
- Détection du core-genome MLST (cgMLST) : Dans le but d'améliorer la détection de clones parmi les souches de *Campylobacter* circulant sur le territoire, l'analyse par cgMLST a été intégrée au pipeline. Similaire à l'analyse MLST déjà présente et permettant d'identifier un clone bactérien à partir de 7 gènes de ménage, l'analyse cgMLST se base sur l'identification de plus de 1500 gènes issus du core-genome de *C. jejuni* et est donc plus précise. Cette analyse n'est pas incompatible avec l'étude des génomes de *C. coli* mais pourrait être affinée (voir derniers points).
- Ajout des gènes *cdt* dans l'analyse de la virulence : Régulièrement mis en avant lors de l'analyse de la virulence des souches de *Campylobacter* et de *Helicobacter*, les gènes codant pour la « Cytolethal distending toxin » (CDT) étaient très faiblement représentés dans les bases de données utilisées par le pipeline. Plus de 35 différents allèles de *cdtA*, *cdtB* et *cdtC* ont donc été ajoutés dans la base de résistance et virulence du CNRCH.
- Nouveau rapport et intégration GLIMS : Le rapport affichant tous les résultats obtenus pour une souche, après les différentes analyses bioinformatiques a été de nombreuses fois modifié en 2023. Les différentes modifications apportées sont les suivantes :



Rapport généré par le Centre National de Référence des Campylobacters & Hélicobacters à Bordeaux le 24/01/2024 à 16:26:14

Figure. Version 2024 du rapport d'analyse des données NGS.

- Ajout du numéro de dossier de la souche avec génération du code barre pour simplifier la consultation du dossier si le rapport est imprimé.
- Ajout du numéro de génome de la souche et du nom du projet pour lequel celui-ci a été séquençé.
- Suppression de l'information sur la virulence : l'analyse est toujours effectuée mais les données étaient trop conséquentes pour être affichées sur le rapport.
- Suppression des données d'antibiogrammes : en lien avec la nouvelle stratégie de séquençage du CNRCH, les données antibiogrammes ne seront pas toujours disponibles lorsqu'une souche est séquençée et ne seront désormais affichés que les résultats de détection moléculaire des mécanismes.
- Affichage plus précis de la détection de la résistance : dans la version précédente du rapport, certains mécanismes de résistance étaient affichés en second plan voire masqués. Tous les mécanismes et tous les antibiotiques (même secondaires) sont maintenant affichés.

Enfin, le rapport est maintenant automatiquement stocké au format TIF (image) à la fin de l'analyse dans la base de données GLIMS, permettant un suivi amélioré du dossier-patient et un transfert automatisé des informations génomiques au laboratoire correspondant. Une copie des résultats est également effectuée sur les lecteurs réseaux du CHU.

- Création d'un jeu de données test : Afin de pouvoir valider chaque mise à jour majeure du pipeline et identifier tout éventuel problème, un jeu de données test a été créé. Il contient les données brutes de 6 souches portant une liste exhaustive de mécanismes de résistance. Si une version mise à jour du pipeline est capable de retrouver ces différents mécanismes, alors elle peut être déployée en routine. Dans le cas contraire, les différents bugs sont identifiés avant déploiement.

Cette version du pipeline sera utilisée en routine en 2024 en lien avec la nouvelle stratégie de séquençage du CNRCH.

Pour plus de détails : cf projets 2024.

-Pipeline d'analyse des résultats par stratégie NGS-DNA capture

(étude du résistome et du virulome de *H. pylori* au sein de biopsies gastriques)

À l'issue du séquençage, les reads sont filtrés par alignement sur le génome humain (Bowtie2), et nettoyés en suivant une multitude de paramètres (longueur minimale, qualité moyenne des bases, trimming 5' et 3', queues poly-X) en utilisant les outils fastp et AGeNT trim de la suite d'outils bioinformatiques d'Agilent Technologies. Ces reads sont ensuite alignés sur un génome de référence de *H. pylori* (BWA) puis dédupliqués (AGeNT CReak). À l'issue de ces étapes d'alignement, une séquence consensus de chacune des cibles est générée et une série d'analyses spécifiques est réalisée.

Pour la détection de marqueurs de résistances, chaque région du résistome est parcourue, et chaque mutation induisant un phénotype de résistance présente dans le génome bactérien est relevée.

Pour l'analyse du virulome, nous étudions en détail les génotypes de *vacA* et *cagA*. On cherche tout d'abord à détecter la présence ou l'absence de l'îlot *cag*, en s'assurant que le gène ait été séquençé, puis le cas échéant, les différents motifs de phosphorylation EPIYA insérés dans la séquence du gène sont identifiés.

Pour caractériser le génotype *vacA* de l'échantillon, les domaines p33 et p55 sont extraits de la séquence du gène et alignés sur des séquences de références, représentant respectivement s1, s2 et i1/m1, i1/m2, i2/m2. En classant ces différents génotypes par score d'alignement, nous pouvons caractériser le génotype de *vacA*.

Enfin, pour le typage, un ensemble de gènes (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *urel*, *yphC*) est utilisé comme schéma de MLST. Leurs séquences sont alignées contre une base de données de séquences mises à disposition sur PubMLST afin d'obtenir un « sequence type ». Les séquences sont ensuite concaténées. Le programme STRUCTURE est utilisé pour affecter à chaque séquence de chaque échantillon une des populations définies par les travaux de Falush *et al.* (hpAfrica, hpEurope, hpNEAsia, ...).

Après avoir collecté toutes les données nécessaires à la caractérisation de nos échantillons, un rapport PDF imprimable est généré, résumant toutes les informations pertinentes dans un format universel et formaté sur le même modèle que pour le pipeline *Campylobacter*.

-Développement d'une plateforme interne de génomique

En 2023, nous avons initié le développement d'une interface web (hébergée sur le réseau interne de l'hôpital) permettant d'afficher l'intégralité des données bio-informatiques du laboratoire.

Cette plateforme est accessible depuis chaque ordinateur du laboratoire et est sécurisée par le biais de comptes utilisateurs personnels.

Tous les génomes des souches séquençées jusqu'à ce jour au sein du CNRCH y sont centralisés et chaque utilisateur autorisé peut ainsi consulter les résultats d'antibiogramme réalisés en routine, les comparer aux éventuels marqueurs de résistance détectés par analyse bioinformatique, détecter d'éventuelles discordances au niveau de l'identification de l'espèce ou encore suivre l'évolution des marqueurs de résistance détectés dans le temps parmi les prélèvements d'un même patient. L'utilisateur peut effectuer des requêtes sur la base de données de la plateforme afin de sélectionner des souches parmi un ensemble de paramètres précis, et consulter les différents graphiques réalisés automatiquement.

L'accès à cette plateforme est uniquement réservé aux utilisateurs et machines autorisées au sein de l'équipe.

Pour répondre aux efforts de séquençage importants menés depuis le début de cette année 2024, la plateforme sera continuellement maintenue et mise à jour, pour garantir un accès rapide et simple aux données génomiques.

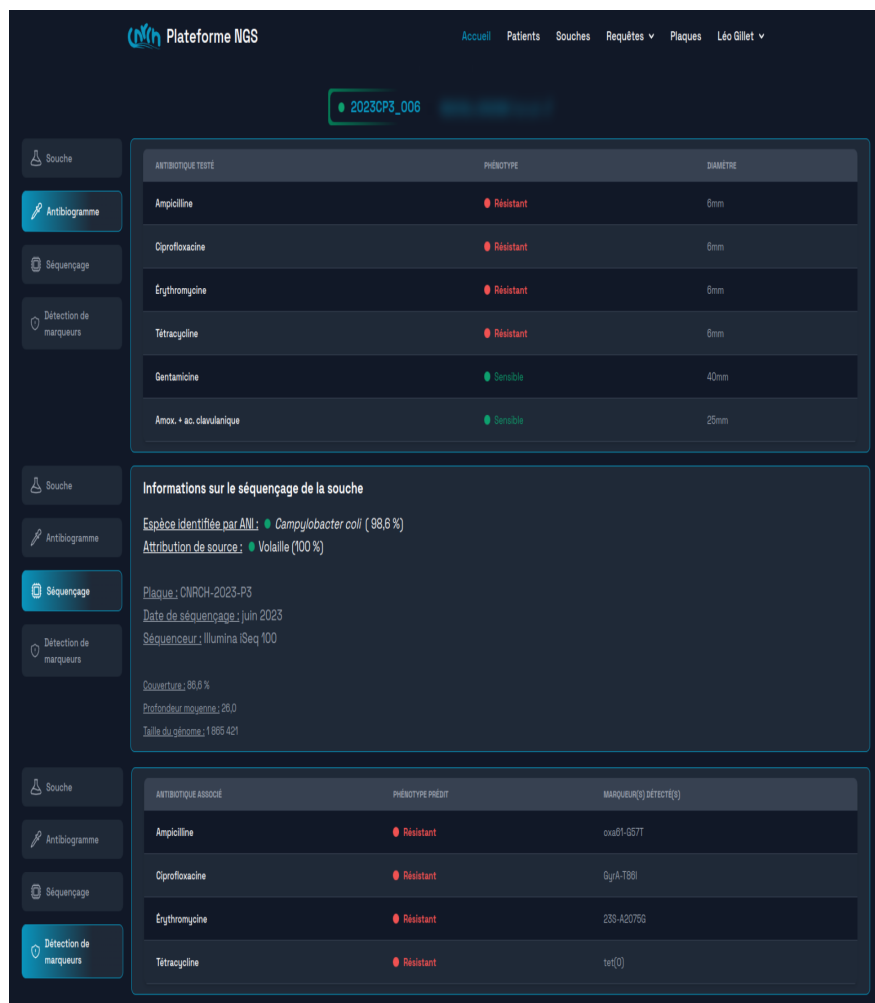


Figure: Consultation des données de routine et de séquençage pour une souche

Campylobacter coli ST: 825, CC: 828										
ANTIBIOTIQUE	14/02/2022	25/04/2022	16/05/2022	25/11/2022	25/11/2022	16/12/2022	16/12/2022	06/01/2023	10/03/2023	26/04/2023
Ciprofloxacine	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I
Ampicilline										
Tétracycline	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)	tet(O)
Érythromycine		23S-A2075G								
Gentamicine				16S-A1358G		16S-A1358G	16S-A1358G	16S-A1358G		

Figure: Étude de l'évolution chronologique de marqueurs d'une infection récidivante à *C. coli*

Une fonctionnalité de requêtes est implémentée afin de pouvoir interroger la base de données et sélectionner les souches selon un ensemble complet de filtres (informations du patient, espèce identifiée, marqueur(s) détecté(s), sensibilité aux antibiotiques, source d'attribution, ...). Les résultats obtenus sont ensuite facilement exportables.

-Suivi par génomique des sources de contamination à *C. jejuni* et *C. coli*

Pour *C. jejuni* : Dans le but de suivre l'évolution des réservoirs et en fonction de l'invasivité de ce pathogène, 96 nouvelles souches ont été séquencées, provenant de cas cliniques issus de l'année 2022. Les génomes ont été obtenus auprès de la société Integragen, sur séquenceur Novaseq 6000 d'Illumina. Afin d'attribuer chaque souche à un réservoir, des analyses bio-informatiques à partir des génomes ont été réalisées au CNRCH en se basant sur le logiciel STRUCTURE et les données décrites par Thépault *et al.* 2017 (doi: 10.1128/AEM.03085-16).

Pour les souches invasives, les réservoirs volailles et ruminants restent majoritaires avec respectivement 69% et 29% d'attribution. Une forte augmentation des souches issues des volailles et une forte baisse de la proportion du

réservoir ruminant sont notables, mettant fin à la tendance en hausse de ce réservoir. La proportion du réservoir environnement reste toujours très faible.

Pour les souches non invasives, les données sont relativement stables pour le réservoir volaille par rapport à l'année 2021, avec 64% de nos souches attribuées à celui-ci (contre 61% en 2021) et de la même manière que pour les souches invasives, le réservoir ruminant subit une baisse significative avec 28% d'attributions (contre 36% en 2021). Deux souches environnementales ont également été déterminées. Trois souches non invasives n'ont pas pu être attribuées à un réservoir spécifique.

Durant l'année 2023, 35 nouveaux génomes de *C. jejuni* invasifs ont été séquencés et pour les souches non invasives, 61 nouveaux génomes ont été séquencés.

Tableau. Total des souches séquencées pour le projet *C. jejuni* invasifs/non invasifs, depuis 2009.

Année	Invasifs	Non invasifs
2009	-	39
2011	17	-
2012	18	-
2013	33	-
2014	35	-
2015	-	83
2016	37	32
2017	45	56
2018	36	40
2019	33	22
2020	16	26
2021	26	70
2022	+35	+61
TOTAL	364	429

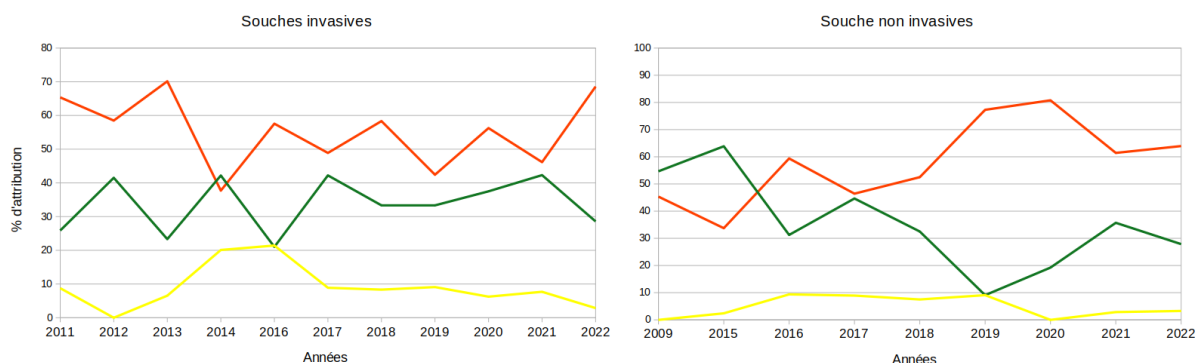


Figure. Évolution des proportions (%) pour chaque réservoir, volaille en orange, ruminants en vert et environnement en jaune, en fonction des années (de 2009 à 2022).

Pour *C. coli* : En 2019, 259 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) permettant de discriminer les populations volaille, ruminant et porc ont été déterminés à partir de plus de 400 souches disponibles dans les bases de données publiques (doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01787-20>). Ces marqueurs discriminants sont appliqués chaque année sur les souches cliniques de notre laboratoire.

En 2023, 96 génomes de *C. coli* isolés chez des patients de 2022 ont donc été séquencés dans le but de suivre l'évolution de la répartition des réservoirs. 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*. Une fois de plus cette année, le réservoir volaille reste majoritaire avec environ 90% des souches cliniques attribuées. La proportion pour le réservoir porc reste également stable avec 10% d'attribution et toujours aucune souche provenant du réservoir ruminant n'a été détectée jusqu'à aujourd'hui.

Tableau. Total des souches séquencées pour le projet d'attribution de source de *C. coli* depuis 2015.

Année	No. de souches séquencées
2015	49
2016	49
2017	49
2018	23
2019	59
2020	96
2021	48
2022	+96
Total	325

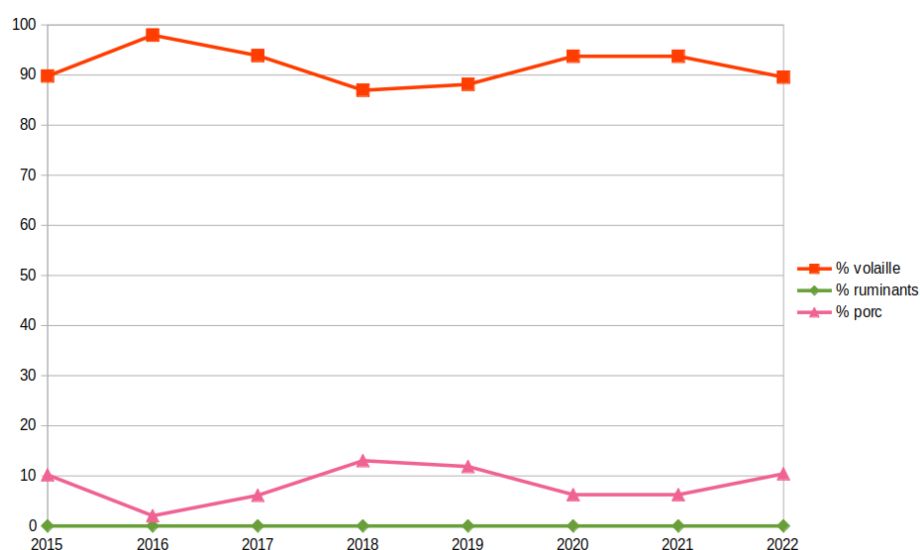


Figure. Évolution des proportions (%) pour chaque réservoir, volaille en bleu, ruminant en orange et porc en jaune, en fonction des années (de 2015 à 2022).

Ces résultats sont cruciaux et doivent être mis à jour chaque année.

-Suivi des méthylases bactériennes associées à la résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter* sp

Les macrolides sont généralement les molécules de première intention pour les campylobactérioses. La résistance aux macrolides reste en effet faible avec comme principal mécanisme les mutations dans la séquence de l'ARNr 23S. En 2019, l'utilisation du séquençage a permis d'identifier des souches de *C. coli* exprimant des érythromycine méthyltransférases ayant la capacité de «méthyliser» l'ARNr 23S réduisant ainsi l'activité de l'érythromycine.

Deux gènes *erm* ont été identifiés: *erm(B)*, méthylase d'origine chinoise et décrite seulement deux fois en Europe dans le réservoir animal (en 2015 en Espagne par Florez-Cuadrado *et al.*, doi: 10.1093/jac/dkv383 et en 2019 en Belgique par Elhadidy *et al.*, doi: 10.1111/tbed.13046) ; *erm(N)*, une nouvelle version décrite seulement une fois dans la littérature, au Canada en 2018 (Greninger A. *et al.*, doi: 10.1093/cid/ciz1060). Ce gène a la particularité d'être à chaque fois retrouvé inséré dans l'opéron CRISPR-cas9.

Depuis cette identification, les souches de *Campylobacter* résistantes à l'érythromycine que nous recevons au laboratoire sont systématiquement séquencées afin de suivre l'évolution de ces gènes en France.

Tableau. Total des souches positives à *erm(B)* et *erm(N)* séquencées de 2016 à 2023 (n=28).

Souche	Gène	Espèce	Score ANI (%)	Source	CC	ST
2018-QUEBEC (référence)	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.87	Porc	828	9840
2016-0429H	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.60	Volaille	828	899
2016-0940	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.70	Volaille	828	899
2016-2392	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.64	Volaille	828	9840
2017-0180	<i>erm(B)</i>	<i>C. coli</i>	98.75	Volaille	828	872
2018-1149	<i>erm(B)</i>	<i>C. coli</i>	99.02	Porc	N/A	N/A
2019-0051	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.72	Volaille	N/A	N/A
2019-0733	<i>erm(B)</i>	<i>C. coli</i>	98.71	Volaille	860	828
2019-0191	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.78	Volaille	828	9840
2019-2001	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.84	Porc	828	9840
2020-DJN	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	97	Porc	21	21
2021-SCG	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.70	Porc	828	1556
2021-LEC	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.80	Porc	828	1556
2022-MDP	<i>erm(B)</i>	<i>C. coli</i>	98.62	Volaille	828	5507
2022-BLO	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.66	Volaille	828	899
2022-NOU	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.73	Porc	828	9840
2022-DUP	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.78	Volaille	828	9840
2022-ZOU	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.50	Volaille	828	889
2022-GAU	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.77	Volaille	828	899
2022-HRY	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.73	Volaille	828	1550
2023-BAS	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.63	Volaille	828	899
2023-CUI	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.67	Volaille	828	899
2023-GUY	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.81	Porc	-	-
2023-HAJ	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.83	Porc	828	854
2023-MAR	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.82	Porc	828	825
2023-NGM	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.82	Volaille	828	899
2023-RON	<i>erm(N)</i>	<i>C. coli</i>	98.71	Volaille	828	899
2023-DAH	<i>erm(B)</i>	<i>C. coli</i>	98.92	Volaille	828	828
2023-DEC	<i>erm(B)</i>	<i>C. jejuni</i>	97.54	Volaille	353	10025

ANI = Average Nucleotide Identity; CC = Complex Clonal; ST = Sequence Type.

Environ 13% des souches de *C. coli* ou *C. jejuni* résistantes à l'érythromycine qui ont été séquencées (soit un total d'environ 200 souches) possèdent l'un des deux gènes.

En 2023, 7 nouvelles souches de *C. coli* exprimaient *erm(N)* contre 6 en 2022 (2 ont été obtenues début 2023, en rouge dans le tableau). Deux souches positives à *erm(B)* ont également été identifiées, dont une souche de *C. jejuni* : il s'agit de la première souche de *C. jejuni* exprimant une méthylase de type *erm* en France.

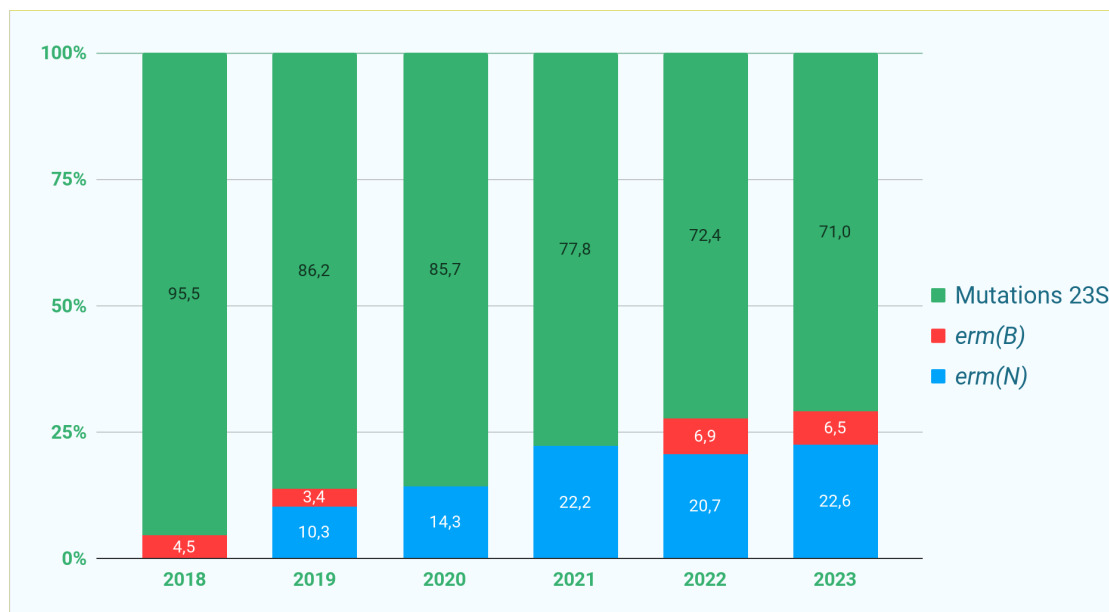


Figure. Evolution des proportions des mécanismes de résistance à l'érythromycine sur une période de 6 ans en France.

L'augmentation du nombre de souches positives à *erm(N)* ou *erm(B)* est très préoccupante. En effet, si la tendance se confirme, nous estimons que 50% des souches de *Campylobacter* résistantes à l'érythromycine exprimeront l'un des deux gènes dans 5 à 10 ans.

Le CNRCH encourage fortement tous les laboratoires d'analyses médicales et hôpitaux à continuer d'envoyer toute souche clinique de *Campylobacter* résistante à l'érythromycine. Le réservoir aviaire semblant être incriminé dans la dissémination de ces marqueurs de résistance, la surveillance à l'échelle vétérinaire doit également être mise en place dans les laboratoires correspondants.

Ces travaux ont été présentés en congrès lors de la RICAI 2023 et font l'objet d'un article scientifique en cours de rédaction.

-Contrôle qualité (EEQ) du pipeline bioinformatique du CNR

Ainsi, en 2023, 2 contrôles qualité ont été proposés et effectués : le premier (A) à partir de 3 extraits d'ADN de 3 souches de *C. coli* et le second (B) directement à partir des fichiers de séquençage .fastq de 5 souches de *C. jejuni* ou *C. coli*.

Lors du test (A), après réception des ADN, les génomes ont été séquencés à partir du séquenceur Illumina Iseq 100 du CNRCH et les séquences obtenues ont été analysées à partir du pipeline d'analyse bioinformatique version 2023 (voir rapport CNRCH 2023 sur activités 2022).

Tableau. Gènes et mutations identifiés à partir des souches du contrôle qualité (A) (séquençage des génomes + analyses NGS).

	Souche 1	Souche 2	Souche 3
ST attendu	888	1586	872
CNRCH	888	1586	872
Espèce attendue	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
CNRCH	<i>C. coli</i> (98.9%)	<i>C. coli</i> (98.7%)	<i>C. coli</i> (98.8%)
*ERY attendu	23S mutation A2075G	<i>erm(B)</i>	23S mutation A2075G
CNRCH	23S mutation A2075G	<i>erm(B)</i>	23S mutation A2075G
*AMP attendu		<i>blaOXA-193</i>	<i>blaOXA-489</i>
CNRCH		Nouveau promoteur OXA-193	Promoteur OXA mutation G57T
*CIP attendu	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I
CNRCH	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I
*GEN attendu		<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aph(2'')-If</i>	
CNRCH		<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> ; <i>aph(2'')-If</i>	
*TET attendu	<i>tet(O)</i>	<i>tet(O-M-O)</i>	<i>tet(O)</i>
CNRCH	<i>tet(O)</i>	<i>tet(O-M-O)</i>	<i>tet(O)</i>
*STR attendu	<i>aad(E)</i>	<i>aad(E)</i>	<i>aad(E)</i>
CNRCH	<i>ant(6)-Ig</i>	<i>ant(6)-If-aad(E)</i>	<i>ant(6)-Ig</i>
*CAP attendu		Plasmide catA13	
CNRCH		Plasmide C589	
*KAN attendu		<i>aph(3')-IIIa</i>	
CNRCH		<i>aph(3')-IIIa</i>	
*SPC attendu		<i>aad(9)</i>	
CNRCH		<i>ant(9)-Ic-aad(9)</i>	

*résistances moléculaires attendues : ERY=érythromycine, AMP=ampicilline, CIP=ciprofloxacine, GEN=gentamicine, TET=tétracycline, STR=streptomycine, CAP=chloramphénicol, KAN=kanamycine, SPC=spectinomycine. Les cellules en vert indiquent les résultats strictement identiques.

Les résultats du test (A) ont été très concluants. En effet, les sequence-types (ST), espèces et résistances moléculaires obtenus à l'aide du pipeline d'analyse du CNRCH ont été concordants avec ce qui était attendu. On peut toutefois noter des discordances avec certains mécanismes de résistance, notamment :

- la résistance à l'ampicilline (jaune) : comme l'année précédente, le consensus établi pour ce CQ concernant les pénicillines est que n'importe quelle version d'une bêta-lactamase suffit pour confirmer la résistance. Hors, il est bien connu maintenant que pour les espèces du genre *Campylobacter*, le promoteur joue un rôle crucial. Le pipeline du CNRCH recherche plus précisément la présence d'une mutation (Zeng X. *et al.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014) ou de séquences promotrices nouvelles (ici souche 2).

- les résistances à la streptomycine, à la spectinomycine et au chloramphénicol (cyan) : les résultats de ce CQ montrent de fortes discordances dans les gènes de résistance trouvés pour ces 3 antibiotiques. Comme l'année précédente, il s'agit ici d'un problème de nomenclature : les séquences étant tout à fait identiques. Sauf création d'une base de données communes aux différents laboratoires européens, ce type de discordances entre les noms de gènes restera fréquent.

Les résultats obtenus pour ce contrôle qualité (B) sont similaires à ceux du test (A). En effet, les différents ST et les différentes espèces ont été retrouvés pour chaque souche. De plus, les mêmes concordances et discordances dans l'analyse de la résistance sont visibles : de parfaites concordances pour l'érythromycine, la ciprofloxacine, la gentamicine, la kanamycine et la lincomycine (vert). Les mêmes discordances pour cause de nomenclatures différentes ont été retrouvées pour la streptomycine, la spectinomycine et le chloramphénicol (cyan). Pour la résistance aux pénicillines, ce contrôle qualité attend une nouvelle fois l'information sur la présence ou absence de bêta-lactamase et non la présence de mutations dans la région promotrice (jaune). Enfin, une erreur au niveau de la détection de la résistance aux tétracyclines pour la souche 4 a été détectée : le gène *tet(O-32-O)* attendu n'a pas été retrouvé faute d'un assemblage du génome bactérien incorrect dans la région d'intérêt (orange). Ce type

d'erreur sera moins fréquent dans le futur grâce à un changement d'outil d'assemblage de génomes (voir la partie concernant la version 2024 du pipeline d'analyses de données NGS).

Tableau. Gènes et mutations identifiés à partir des fichiers du second contrôle qualité (B) (analyses NGS seulement).

	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5
ST attendu	9263	257	7433	572	12073
CNRCH	9263	257	7433	572	12073
Espèce attendue	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
CNRCH	<i>C. coli</i> (99.1%)	<i>C. jejuni</i> (97.6%)	<i>C. jejuni</i> (97.6%)	<i>C. jejuni</i> (97.6%)	<i>C. coli</i> (98.6%)
*ERY attendu					<i>erm(B)</i>
CNRCH					<i>erm(B)</i>
*AMP attendu	<i>blaOXA-193</i>	<i>blaOXA-461</i>	<i>blaOXA-193</i>	<i>blaOXA-193</i>	<i>blaOXA-461</i>
CNRCH	Pas de mutation	Pas de mutation	Nouveau promoteur	Mutation G57T	Pas de mutation
*CIP attendu	GyrA mutation T86I		GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I
CNRCH	GyrA mutation T86I		GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I	GyrA mutation T86I
*GEN attendu			<i>aph(2'')-If</i>		
CNRCH			<i>aph(2'')-If</i>		
*TET attendu	<i>tet(O-32-O)</i>		<i>tet(O)</i>	<i>tet(O-32-O)</i>	<i>tet(O-32-O)</i>
CNRCH	<i>tet(O-32-O)</i>		<i>tet(O)</i>	<i>tet(O-M-O)-tronqué</i>	<i>tet(O-32-O)</i>
*STR attendu	<i>aad(E)</i>			<i>aad(E); SAT-4</i>	<i>aad(E); SAT-4</i>
CNRCH	<i>ant(6)-lg; ant(6)lf-aad(E)</i>			<i>ant(6)lf-aad(E); SAT-4</i>	<i>ant(6)lf-aad(E); SAT-4</i>
*CAP attendu			Plasmide catA13		Plasmide catA
CNRCH			Plasmide C589		Plasmide pC194
*KAN attendu			<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
CNRCH			<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
*SPC attendu	<i>aad(9)</i>		<i>aad(9)</i>		<i>aad(9)</i>
CNRCH	<i>ant(9)-lc-aad(9)</i>		<i>ant(9)-lc-aad(9)</i>		<i>ant(9)-lc-aad(9)</i>
*LNC attendu	<i>lnu(C)</i>				
CNRCH	<i>lnu(C)</i>				

*résistances moléculaires attendues : ERY=érythromycine, AMP=ampicilline, CIP=ciprofloxacine, GEN=gentamicine, TET=tétracycline, STR=streptomycine, CAP=chloramphénicol, KAN=kanamycine, SPC=spectinomycine, LNC=lincomycine. Les cellules en vert indiquent les résultats strictement identiques.

Le projet «FWDAMR-RefLabCap» arrivant à échéance, s’est posée la question de mettre en place un nouveau contrôle qualité du pipeline d’analyses NGS du CNRCH.

Ainsi, en collaboration avec le laboratoire référence des Campylobacters au Portugal (Institut National de la Santé Ricardo Jorge à Lisbonne) dirigé par le Dr Mónica Oleastro, des échanges de souches seront régulièrement effectués pour tester respectivement les outils et méthodes des deux laboratoires. Un total de 6 souches cliniques du CNRCH a été envoyé au Portugal en 2023, et ce même nombre de souches a été envoyé du Portugal au CNRCH. Les souches portugaises ont été séquencées par les méthodes classiquement employées au CNRCH dans le but de valider par détection des mécanismes de résistance les différents profils obtenus par antibiogramme (réalisés au Portugal).

Tableau. Gènes et mutations identifiés à partir des souches du contrôle qualité du Portugal (culture + séquençage + analyses NGS).

	Souche 1	Souche 2	Souche 3	Souche 4	Souche 5	Souche 6
Espèce attendue	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
CNRCH	<i>C. jejuni</i> (97,6%)	<i>C. coli</i> (98.7%)	<i>C. jejuni</i> (97,5%)	<i>C. jejuni</i> (97,5%)	<i>C. coli</i> (98,8%)	<i>C. jejuni</i> (97,6%)
Profil AMP*	S	R	S	R	R	R
CNRCH	-	OXA61-G57T	-	OXA61-G57T	OXA61-G57T	OXA61-G57T
Profil CIP*	S	R	R	R	R	R
CNRCH	-	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I	GyrA-T86I
Profil ERY*	S	S	S	S	S	S
CNRCH	-	-	-	-	-	-
Profil TET*	S	S	R	R	R	R
CNRCH	-	-	tet(O)	tet(O)	tet(O-32-O)	tet(O-32-O)
Profil GEN*	S	S	S	S	S	S
CNRCH	-	-	-	-	-	-

*résistances phénotypiques observées par le laboratoire de référence portugais : AMP=ampicilline, CIP=ciprofloxacine, ERY=érythromycine, TET=tétracycline, GEN=gentamicine.

Parmi les différents profils de résistance in vitro, tous les mécanismes moléculaire de résistance correspondants ont été identifiés. Le séquençage et les analyses bioinformatiques réalisés au CNRCH ont une nouvelle fois parfaitement et précisément répondu à cet exercice.

L’ensemble de ces CQ nous permettent d’être confiant pour le déploiement en routine des analyses de résistome de Campylobacter prévus dès 2024 (cf projet NGS 2024).

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

☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	En 2023, 288 ADN de souches cliniques ont été envoyés pour WGS à la société Integragen (Evry) sous forme de 3 plaques de 96 puits. Cette société est privilégiée pour les activités de séquençage conséquentes, tel le suivi des sources de contamination chez <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>. Les séquençages urgents sont eux effectués en interne au CNRCH et au total 68 souches ont été séquencées de cette manière (3 runs de séquençage). Société Integragen (Evry) et Iseq100 pour séquençage interne au CNRCH

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

☐ NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
☒ OUI	L'expertise bio-informatique est réalisée en interne par un bio-informaticien à plein temps (Mr Quentin Jehanne) et à mi-temps par Mr Léo Gillet (50% partagé avec le CNR IST) -Pipeline l'analyse de génomes de <i>Campylobacter sp</i> et <i>Aliarcobacter sp</i> L'analyse des données de NGS est effectuée à partir d'un pipeline maison développé et exécuté sous Linux. Il est composé de divers outils gratuits et open-source ainsi que plusieurs scripts Python maison. Parmi lesquels : -Sickle : suppression des nucléotides de mauvaise qualité en amont et en aval des séquences. -SKESA : assemblage <i>de novo</i> des génomes. -Blast : identification des mécanismes de résistance et virulence (à partir des bases de données du CNRCH, de NCBI, CARD, ResFinder et VirulenceFinder) et des gènes MLST et cgMLST. -RFPlasmid : identification de plasmides au sein de la bactérie séquencée. -STRUCTURE : attribution de la source de contamination probable. -FastANI : identification de l'espèce. -Scripts Python MLST / cgMLST : identification du cluster épidémiologique. -Module Python PyPDF : génération du rapport PDF. -Plateforme interne de génomique afin de centraliser toutes les données de NGS et de pouvoir facilement exploiter les données obtenues. -Pipeline d'analyse des résultats obtenus par DNA Capture (étude du résistome, du virulome de <i>H. pylori</i> au sein de biopsies gastriques).

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

☐ NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
☒ OUI	Le séquençage des génomes des souches cliniques est réalisé lors de cas groupés d'infections ou pour le suivi des mécanismes de résistance aux antibiotiques problématiques et/ou émergents et en cas de discordance d'identification bactérienne entre nos correspondants et le CNR.

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

Les analyses suivantes sont réalisées systématiquement à partir des génomes séquencés :

- identification de l'espèce bactérienne,
- annotation des génomes,
- détermination moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques et de la virulence,
- typage MLST pour *Campylobacter sp*,
- attribution de la source de contamination (*C. jejuni* : volaille, ruminants, environnement ; *C. coli* : volaille, ruminants, porcs).

Selon les besoins, les analyses complémentaires suivantes sont également effectuées :

- cgMLST pour *Campylobacter*,
- wgSNP (comparaison des mutations ponctuelles au sein d'un génome par rapport à une référence)
- phylogénie.
DNA capture sur biopsies gastriques pour *H. pylori*.

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

Le recours au WGS est requis lors de cas groupés d'infections. En effet, lorsque plusieurs souches issues par exemple d'une contamination familiale ou d'un même établissement sont envoyées au CNRCH, les analyses ANI, cgMLST et wgSNP sont effectuées à partir des génomes séquencés. Cela permet ainsi d'identifier des foyers épidémiques.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Le séquençage est utilisé en routine pour surveiller la propagation des différentes souches de *Campylobacter* au sein du territoire (MLST et cgMLST) ainsi que l'évolution des mécanismes de résistance aux antibiotiques, plus particulièrement certains mécanismes émergeant tels les gènes de résistance à l'érythromycine (*erm(B)* et *erm(N)*).

Durant l'année 2023, les génomes de 356 souches de *Campylobacter*, *Helicobacter* et *Aliarcobacter* ont été séquencés. Les souches sont issues de différentes années, en majorité des souches de l'année précédente, et projets :

Année	n	%
2014	2	0,56
2022	192	53,93
2023	162	45,61

Projets	n	%
C. jejuni invasifs et non-invasifs, attribution de source	96	26,97
Campylobacters résistants (ERY particulièrement)	84	23,6
C. coli , attribution de source	63	17,7
Cas groupés	26	7,3
Discordances d'identification	26	7,3
Infections récidivantes	23	6,46
Projets divers	15	4,21
Campylobacters résistants à la gentamicine	7	1,97
Demande des ARS	5	1,4
Espèces non identifiables par MALDI-TOF	5	1,4
Contrôle qualité NGS	3	0,84
Campylobacters multi-résistants	2	0,56
Souches de référence	1	0,28

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

Dans les bases de données fermées : Un grand nombre des génomes des souches cliniques du CNRCH est disponible sur la plateforme de l'université d'Oxford : PubMLST.

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadonnées associées : Certaines souches associées aux différentes publications du CNRCH sont disponibles dans la base de données américaine GenBank. La diffusion de l'intégralité des séquences sur l'ENA est envisageable.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Les séquences spécifiques associées aux différentes publications du CNRCH (tels les gènes de résistance aux antibiotiques ou *ADNr 16S*) sont disponibles dans la base de données américaine GenBank. Elles sont également partagées sur simple demande.

3. Activités de surveillance

Éléments clés en matière de surveillance pour l'année 2023

Le volume d'activité du CNR pour *Campylobacter sp* a continué d'augmenter. Le réseau de surveillance des *Campylobacters* a évolué en 2023 : le nombre de laboratoires participants a augmenté par rapport à 2022. Nous continuons à couvrir l'intégralité des départements de l'hexagone. L'activité privée pour *H. pylori* est restée globalement stable par rapport à 2022.

Les trois principales espèces retrouvées chez l'homme sont *C. jejuni*, *C. coli* puis *Aliarcobacter butzleri*. En quatrième position on retrouve *C. fetus*. Le nombre absolu de souches de *C. jejuni* isolées de flacon d'hémoculture est plus important que *C. fetus*. Les résistances aux antibiotiques chez *Campylobacter sp* sont globalement stables par rapport à 2022 malgré l'augmentation en % chez *C. coli* des souches résistantes aux macrolides possédant une érythromycine méthyltransférase.

Le pourcentage de résistance primaire à la clarithromycine chez *H. pylori* réaugmente en 2023 après plusieurs années de baisse lente mais régulière. De rares cas de résistance à l'amoxicilline et à la rifampicine ont été identifiés et caractérisés.

3.1 Description du réseau de partenaires

Description du réseau de partenaires *Campylobacter*

-Description des partenaires, répartition par type d'activités

Comme indiqué précédemment, le CNR travaille avec un réseau de 148 laboratoires actifs (versus 137 en 2022) : 60 laboratoires privés appartenant à des groupements de laboratoires et 88 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 ou par leur propre organisation.

29 de ces correspondants dont 16 hôpitaux (8 CHU, 8 CH et CHG) saisissent 90% de leurs souches isolées directement via un accès sécurisé et intégré au site internet du CNR (réseau Campy.Internet). Ces 29 correspondants n'envoient que 10% de leurs souches au CNR comme contrôle de qualité. Ce système est fonctionnel depuis 2012 avec accord de Santé Publique France (SpFrance).

Comme chaque année, les campagnes de sensibilisation et d'information effectuées par le CNR auprès des laboratoires privés et des hôpitaux, nous ont permis d'intégrer 21 correspondants.

Les nouveaux CHU et CH nous permettent de renforcer notre couverture et notamment sur les départements des Landes, de la Loire, de l'Yonne et de Haute-Savoie. Huit laboratoires privés, intégrés à de grands groupes, ont quitté le réseau (représentant 9% des souches *Campylobacter sp* en 2022).

-Répartition géographique et couverture nationale

Au total, nous répertorions 10758 souches de *Campylobacters* et bactéries apparentées. La carte de France ci-dessous montre la répartition par département.

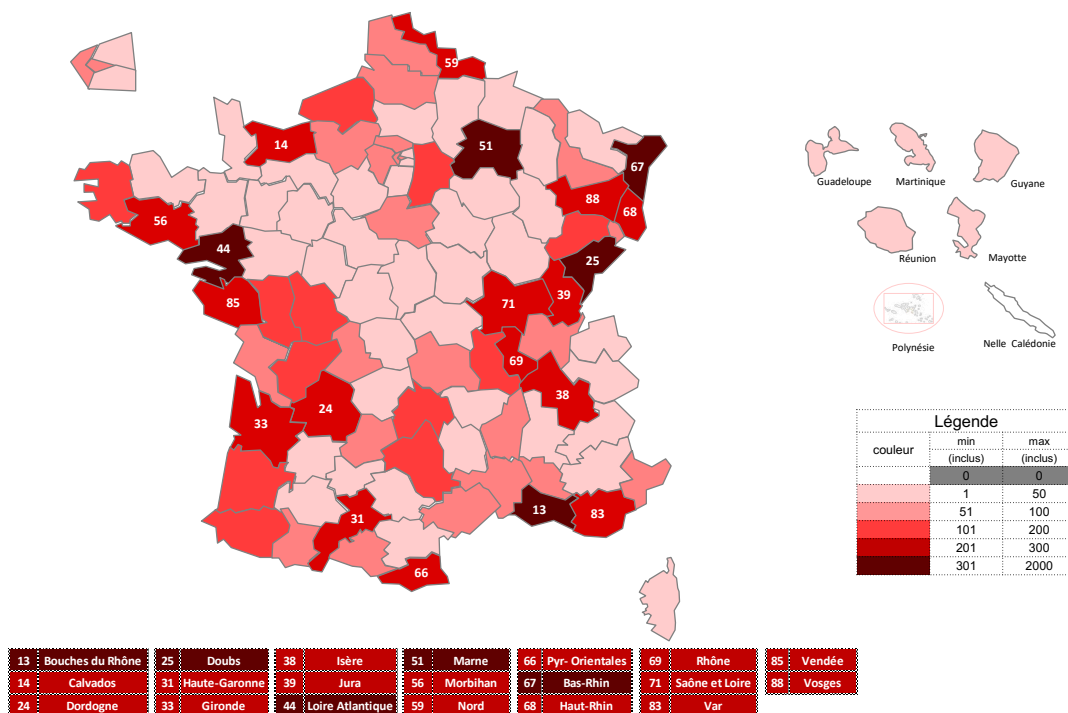


Figure. Répartition par département des souches de *Campylobacters* reçues au CNR en 2023 des réseaux Campy.COM, Campy.HOP ou déclarées en ligne par le réseau Campy-Internet. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de souches. Les noms des principaux départements participant au réseau sont indiqués.

-Evolutions du réseau par rapport à l'année 2022 :

Nous couvrons grâce à l'amplitude de répartition de nos correspondants toutes les régions de France dans leur définition. Pour 2023, tous les départements métropolitains sont couverts, 5 départements d'outre-mer (Guadeloupe, Guyane, Martinique, Mayotte et La Réunion) ainsi que La Polynésie française.

Le nombre de souches reçues en 2023, viables ou non, a augmenté de 2,5% par comparaison à 2022 (cf. Tableau ci-dessous). L'activité Campy.HOP augmente fortement alors que celle du réseau Campy.COM baisse légèrement.

	Campy.HOP	Campy.COM	Campy-Internet	TOTAL
Nb. en 2023	1654	3343	5761	10758
Nb. en 2022	1118	3431	5949	10498
Evolution en %	+47,9	-2,6	-3,2	+2,5

-Laboratoires privés .COM :

Un de nos adhérents du département de l'Aveyron a quitté notre réseau au cours de l'année 2023 suite à son rachat et réorganisation, dépendant du plateau technique régional de Muret dans le département 31. Le laboratoire de Rodez représentait en 2022, 4% des souches référencées au CNRCH et couvrait à lui seul le département de l'Aveyron. 386 souches ont été référencées dans ce département en 2022 *versus* 129 en 2023. Sur ces 129 souches, 92 provenaient des derniers envois de LXBIO Rodez, 26 du groupement Inovie ayant intégré LXBIO, 11 de laboratoires de départements limitrophes. Le département de l'Aveyron rural avec une densité de population certes faible, a longtemps été parmi les plus représentés. Ce département passe dans la catégorie des départements « isolés » avec une couverture quasi inexistante.

Cependant, suite à l'intégration de LXBIO Rodez dans le groupe Inovie, Philippe Lehours a contacté Yannick Rouquet, représentant du Groupe, lui signalant la perte d'un adhérent majeur. Sur la thématique d'une « enquête auprès d'un échantillon de population et sur une période sensible », Dr Anne Bruno nous a adressé 100 souches d'excellente qualité en septembre 2023. Un bilan des résistances a été transmis par courrier en décembre 2023. Nous espérons pouvoir conserver une surveillance dans le département de l'Aveyron et avons formulé notre demande pour 2024.

Ces regroupements et rachats ont provoqué également le départ de 8 autres laboratoires référents qui demeuraient pour certains les seuls représentants de leur département. En outre, ces laboratoires représentaient en 2022, 9% des souches envoyées. C'est pourquoi, la cartographie représentant la couverture nationale des infections

recensées au CNR voit des départements en nette baisse résultant de ces rachats ou fusions et départ du réseau du CNRCH.

Certains groupements ou réseaux indépendants privilégient l'initiative de biologistes spécialisés en maintenant leur participation très active et régulière.

Des laboratoires privés nous ont rejoint situés sur de nouvelles métropoles et notamment les laboratoires MLab à Saran (Orléans) département 45. Onze Laboratoires privés, appartenant pour la plupart à des groupements régionaux, ont vu leur participation augmenter fortement allant de 15 à 140%. Les laboratoires des Carmes à Caen couvre le département côtier du Calvados. Le Groupe Biopole à Pau-Orthez couvre pratiquement seul le département 64. Le Groupe Biolab-Unilabs, Aquibio à Dax consolide notre couverture dans le département des Landes avec le CH de Dax. Synlab Auvergne à Aurillac et à Cournon couvrent cette région centrale. Le LBM Bioptima à Vézeron dans le département de l'Isère consolide fortement notre réseau hospitalier sur ce département avec le GHD Bourgoin-Jallieu. Le Groupe Unilabs à Barentin co-représente notre réseau dans le département côtier de Seine-Maritime avec le CHI d'Elbeuf-Louviers.

Nos partenaires du réseau Campy-Internet voient également leur participation augmenter ou se maintenir à des niveaux importants et notamment : LBM CBM 25 à Besançon ; LBM BIOXA-GILLARD à Bezannes (Reims) ; LABM NOVABIO à Notre Dame de Sanilhac (Dordogne) couvrant les départements limitrophes ; LABM BIO-VSM à Vaires-sur-Marne ; Groupe B2A, région Grand-Est ; Groupe OUILAB, Région Grand Est ; Synlab Bioliance avec une couverture étendue à la région des Pays-de-Loire.

Au sein de notre réseau communautaire, le Laboratoire de Saint-Benoit - Pôle Sanitaire est notre correspondant sur l'île de La Réunion et le réseau CERBALLANCE notre correspondant pour la Martinique.

-Laboratoires hospitalier .HOP :

Contrairement à l'année 2022, les envois en provenance des laboratoires hospitaliers ont progressé de façon très importante, + 48 %. Quatre centres hospitaliers voient leur activité diminuer depuis deux ans malgré une activité constante. Vingt nouveaux correspondants hospitaliers participent activement au réseau Campylobacter et notamment les CH de Dax et de Sens, les CHU de Besançon, St Etienne. Quinze CH et CHU voient leur activité augmenter fortement allant de 30 à 160% et notamment les CH Bretagne-Sud à Lorient, Montélimar, La Roche-sur-Yon, Aubagne, Antibes, Laval, GH Nord Dauphine, Grasse, Quimper, Elbeuf-Louviers, Aix-en-Provence, Angoulême, Le Mans et Bayeux, ainsi que les CHU de Nantes, Nancy et Limoges.

Les DOM-TOM sont représentés par le CH de Mayotte et l'Institut Marlardé de Papeete nouvellement entré dans le réseau Campylobacter.

-Adhérents Campy-Internet :

Ce réseau comportait 30 adhérents en 2023 : 16 CH-CHU et 14 laboratoires privés. L'envoi d'une souche sur 10 est globalement respecté. Les souches du CHU de Toulouse sont bien arrivées mais non intégrées au recueil de 2023 car arrivées après la clôture pour l'établissement de ce rapport.

Nous retrouvons la même progression que nos correspondants NON Campy-Internet : les hôpitaux sont majoritaires dans la progression des données. Huit CH-CHU et 4 laboratoires privés ont une progression de 10 à 153% par rapport à 2022. Nous notons moins de déclarations pour 2 CHU : Lyon et Reims.

-Correspondants pour la sérologie *C. jejuni* :

Cinq nouveaux laboratoires en 2023 ont sollicité le CNR pour la réalisation de sérologies *C. jejuni*. L'activité de sérologie *C. jejuni* a représenté 217 analyses en 2023, dont 44,7 % provenaient de correspondants extérieurs au CHU de Bordeaux : CHU de Strasbourg, Lille, Lyon, AP HP Bichat, Cochin, Tenon, Saint Antoine et Armand Trousseau, les CH de Laval et Nord Mayenne, Montargis, Saint-Etienne, Saintonges et Valence. La moyenne d'âge des patients était de 43,7 ans avec un sex-ratio H/F de 1,16. Seules 12% étaient positives, 65,9% négatives, 8,8% douteuses et 13,4% n'ont pas pu être réalisées (non-conformité de la demande ou du prélèvement).

Les pathologies associées à ces sérologies positives étaient : un syndrome de Guillain Barré (n=19), un déficit neurologique non étiqueté (n=2), un syndrome de Miller Fisher (n=2), des troubles de la vision (n=1), et non renseigné pour 2 patients.

Description du réseau de partenaires *Helicobacter pylori*

-Description des partenaires et répartition par type d'activités :

Comme mentionné précédemment, le CNR travaille avec un réseau de correspondants du CHU de Bordeaux (3%), de la région bordelaise (72,9%) et extérieurs à la région bordelaise (24,1%) : 42 CH/CHU et 16 laboratoires privés. Le laboratoire Eurofins Biooffice de Lormont/Bordeaux Nord est le plus gros demandeur en 2023. Notre réseau de correspondants est réparti sur le territoire comme suit : 16 en Nouvelle Aquitaine (dont 7 à Bordeaux et région bordelaise), 11 en Ile de France, 7 dans le Grand Est, 6 en Bretagne, 5 en Occitanie, 5 en Provence Alpes Côte d'Azur, 4 en Bourgogne France Contée, 4 dans Le Nord, 4 en Pays de Loire, 3 en Auvergne Rhône Alpes, 2 en Normandie, 2 en Centre Val de Loire et 1 en Guyane.

Nous avons mis en place en juin 2023, un nouveau réseau déclaratif on-line pour *H. pylori* : le réseau Hélico-net. Ce réseau a été construit sur le modèle du site Campy-Internet. Vingt-sept laboratoires se sont portés volontaires en 2023 pour participer, 20 ont saisis des données (2 CH, 12 CHU et 6 laboratoires privés).

La description de la mise en place de ce réseau et des principales informations recueillies au cours des 6 premiers mois de fonctionnement seront présentées dans la partie 3.5 de ce rapport.

Au total, de juin à décembre 2023, 834 dossiers issus de Hélico-net sont analysables. Les données patients et les données microbiologiques ont été fusionnées dans ce rapport à celles obtenues sur les prélèvements reçus au CNR.

Prélèvements	2022	2023
Biopsies	2888 (97,9%)	2571(96%) + 834 Hélico-net = 3405
Souches	38 (1,3%)	48 (1,8%)
Selles	23 (0,8%)	33 (1,2%)
ADN	2 (0,07%)	14 (0,5%)
Total	2951	3500 (+18,6%)

Les 834 patients Hélico-net représentent 24% des prélèvements (Biopsies, souches, selles et ADN) et 24,5% des analyses sur biopsie. La baisse de biopsies reçues au CNR est liée à une baisse des envois en provenance du CH de Pau, Poissy et St Nazaire et de l'hôpital Franco-Britannique qui a stoppé ses envois en cours d'année depuis son rachat et réorganisation. Certains laboratoires ont également mis en place la PCR *H. pylori*. En effet, 22 contacts ont été pris auprès du CNRCH pour un avis ou soutien pour la mise en place de la PCR *H. pylori*. A l'inverse, le CH de Metz et Vesoul voient leurs demandes d'analyses augmenter.

Concernant le CHU de Bordeaux, les envois de biopsies des services de Pellegrin restent stables (50 par an), ceux en provenance du site de Haut Lévêque chutent encore en 2023.

-Répartition géographique et couverture

La carte de France ci-dessous montre la répartition par département des biopsies reçues en 2023 au CNR pour recherche d'infection à *H. pylori* et des saisies dans Hélico-net. Nos correspondants étaient répartis sur 78 départements en 2023 versus 40 en 2022, plus 3 DOM-TOM dont le CH de Cayenne (Dr Vincent Sainte Rose).

Répartition par département des analyses sur biopsies - *Helicobacter pylori*
France - 2023

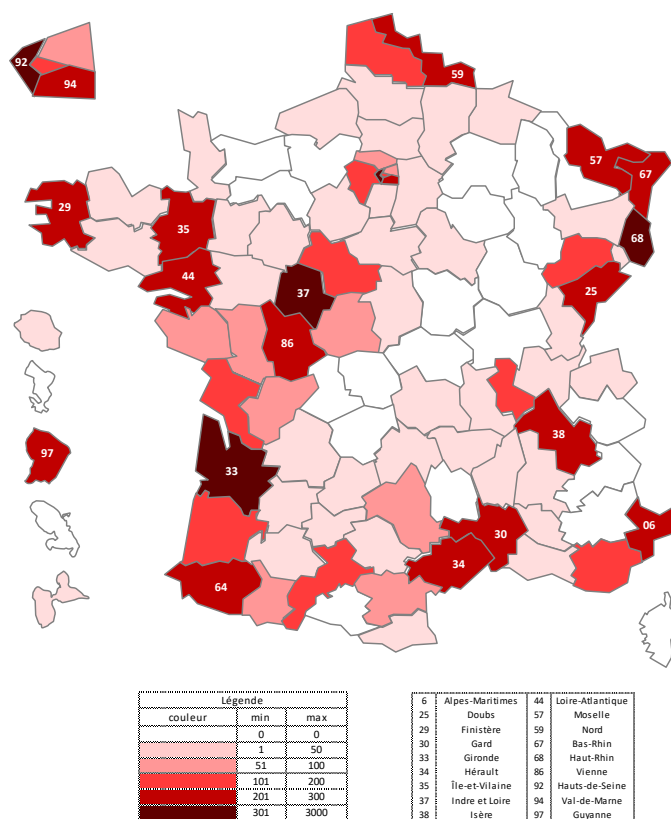


Figure. Répartition par département des biopsies reçues au CNR et saisies dans le réseau Hélico-net en 2023 pour recherche d'infection à *H. pylori*. L'échelle de couleur a été choisie en fonction du nombre de biopsies (n=3405 au total).

-Evolution du réseau par rapport à l'année 2022 :

Par comparaison à 2022, notre activité concernant la recherche de *H. pylori* par culture et PCR s'est stabilisée à un niveau élevé.

Nombre de biopsies	CHU de Bordeaux	Externes	TOTAL
Nb. en 2022	89 (3,3%)	2594 (96,7%)	2683
Nb. en 2023	76 (3%)	2495 (97%)	2633 (-1,9%)

Notre activité est liée à celles des correspondants externes au CHU de Bordeaux qui représentent 97,1% en 2023. Nous recevons essentiellement des biopsies gastriques (96,4%), rarement des souches isolées (1,8%). Le CNR propose également la recherche de *H. pylori* à partir de selles (test antigénique). En 2023, 33 demandes ont été reçues dont 10 internes au CHU de Bordeaux, avec 21,2% testées positives, moyenne d'âge des patients 37,7 ans, et un sex ratio H/F de 1,5.

Nous réalisons en première intention, sur biopsies gastriques, une PCR de détection de *H. pylori* et des mutations associées à la résistance aux macrolides. La culture n'est réalisée que si la PCR est positive. Les résultats suivants correspondent au nombre de patients dont les prélèvements ont été analysés : pour 99 patients, deux prélèvements antre et fundus ont été envoyés, soit 2498 patients.

Nombre de patients (par technique)	2022	2023-CNRCH	2023-Helico-net
Culture + PCR	629 (24,4%)	556 (22,3%)	561 (67,3%)
PCR seule	1948 (75,5%)	1940 (77,7%)	33 (3,96%)
Culture seule	0	0	240 (28,8%)
Quantité insuffisante	4 (0,2%)	2 (0,08%)	0
Total (Culture et/ou PCR)	2581	2498	834

Si nous nous basons sur les résultats de la culture et/ou de la PCR sur biopsies gastriques, 30,1% des patients étaient positifs en 2023 pour *H. pylori*. Ceci est stable par rapport à 2022. Pour le réseau Hélico-net, seuls les cas positifs par PCR et /ou culture ont été saisis.

Nombre de patients (biopsies)	<i>H. pylori</i> positif 2022	<i>H. pylori</i> positif 2023
Par culture et PCR*	597/604 (98,8%)	512/512 (100%)
Par PCR seule	151/1944 (7,8%)	193/1939 (9,95%)
Total	748/2548 (30,0%)	705/2451(28,8%)

*mise en culture seulement des cas positif en PCR.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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 :

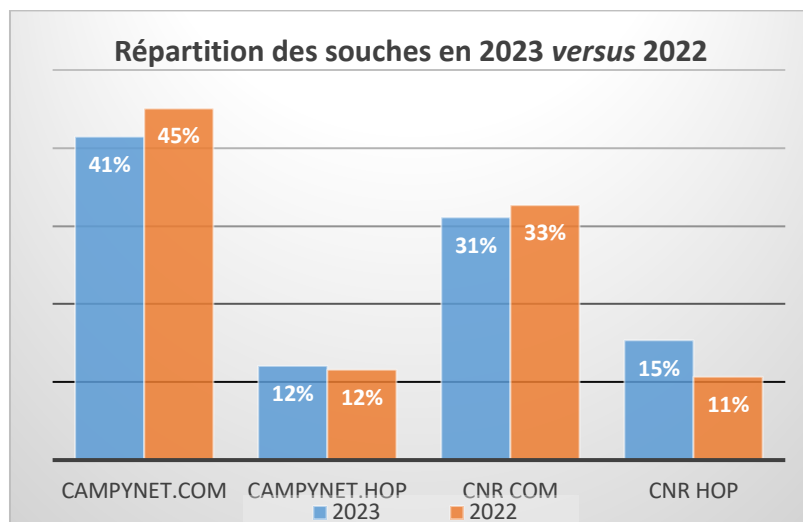
Nombre de souches répertoriées (viables ou non) : 10758*

Nombre de souches ayant pu être étudiées dans les locaux du CNR : 4634

* 5761 dossiers saisis sur Campy-Internet.

331 souches sur 4634 (7,83 %) n'ont pas donné de subculture, quasiment identique à l'an dernier (7,30%).

La représentativité des saisies Campy-Internet en 2023 est en légère baisse au profit des envois direct au CNR. Les hôpitaux ont quant à eux été très actifs en 2023.



- Répartition par espèce et par nature de prélèvements :

Cette répartition est basée sur 10395 isolats (viables et en incluant les doubles populations).

Les trois principales espèces répertoriées sont *C. jejuni* (77%), *C. coli* (11,5%), *Aliarcobacter butzleri* (0,9%). *C. fetus* (0,7%) arrive en 4^{ème} position en 2023 (Tableau 1 et Tableau 2). *C. jejuni* et *C. coli* sont majoritairement isolés de selles : 98,3% et 97,4% respectivement. *C. jejuni* dépasse en nombre absolu *C. fetus* comme première espèce isolée de flacons d'hémocultures même si cela ne concerne que 1,5% des isolats de *C. jejuni* versus 60,5% des *C. fetus*. *A. butzleri* est majoritairement isolé de selles (97,8%).

Les isolats de *C. lari* sont rares et dans 75% des cas isolés de selles. Quatre *Helicobacter* sp (2 *H. pullorum* isolés de selles, 1 *H. cinaedi* isolé de selles et 1 bactériémie à *H. canis*) ont été répertoriés en 2023.

Nous observons également en 2023 une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 63 espèces rares ou nouvelles : 35 *C. ureolyticus*, 13 *C. rectus*, 5 *C. upsaliensis*, 5 *C. gracilis*, 5 *C. curvus*, 4 *C. hyointestinalis* et 1 *C. armoricus*. Nous notons que 97% de ces espèces rares proviennent des laboratoires du réseau de surveillance hospitalier qui participent au suivi de cas d'infections plus complexes.

935 *Campylobacter* sp ont été saisis dans Campy-Internet sans identification faute de subculture. *C. ureolyticus* est majoritairement isolé de pus et de sang. Ce *Campylobacter* anaérobie est un ancien *Bacteroides*.

Nous isolons pour la première année, 3 *Aliarcobacter lanthieri* (isolés de selles) et 1 *Aliarcobacter* sp (isolé de selles en Polynésie Française).

La proportion de *C. fetus* diffère en fonction des réseaux : elle est de 2,04% pour le réseau Campy.HOP alors qu'elle n'est que de 0,22% pour le réseau Campy.COM.

La proportion de souches invasives de *C. jejuni* est également plus importante au sein du réseau Campy.HOP, 3,87%, contre 0,16% pour Campy.COM.

Lorsque l'information était disponible, nous avons relevé 52 discordances (1,04%) entre l'identification fournie par le correspondant et celle du CNRCH obtenue par MALDI-TOF Bruker, proportion stable par rapport à 2022 (1,38%).

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.

Tableau 1 : Répartition par espèce et par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2023.

Quatre *Helicobacter* sp (2 *H. pullorum* isolés de selles, 1 *H. cinaedi* isolé de selles et 1 bactériémie à *H. canis*) sont répertoriés en 2023. Nous observons également en 2023 une diversification des espèces du genre *Campylobacter* avec notamment 63 espèces rares ou nouvelles : 35 *C. ureolyticus*, 13 *C. rectus*, 5 *C. upsaliensis*, 5 *C. gracilis*, 5 *C. curvus*, 4 *C. hyointestinalis* et 1 *C. armoricus*. 935 *Campylobacter* sp ont été saisis dans Campy-internet sans identification faute de subculture. Nous isolons pour la première année 3 *Aliarcobacter lanthieri* (isolés de selles) et 1 *Aliarcobacter* sp (isolé de selles en Polynésie Française).

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. ureolyticus</i>	<i>Campylobacter</i> sp	<i>Helicobacter</i> sp	<i>Aliarcobacter</i> sp	Total
Sang	122	30	46		3		11	6	1		219
Selles	7867	1161	20	91	9	7	1	941	3	4	10104
Biopsie	8		1	1			3	1			14
Abcès & pus	1		0				14	12			27
Liquide	5	1	4				2	8			20
Autres	1		5	1			4				11
Total	8004	1192	76	93	12	7	35	968	4	4	10395
%	77,0	11,5	0,7	0,9	0,1	0,1	0,3	9,3	0,0	0,0	100,0

Tableau 2 : Répartition en pourcentage des espèces par nature de prélèvements des Campylobacters et bactéries apparentées pour l'année 2023.

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. ureolyticus</i>	<i>Campylobacter</i> sp	<i>Helicobacter</i> sp	<i>Aliarcobacter</i> sp	Moy%
Sang	1,5	2,5	60,5	0,0	25,0	0,0	31,4	0,6	25,0	0,0	2,1
Selles	98,3	97,4	26,3	97,8	75,0	100,0	2,9	97,2	75,0	100,0	97,2
Biopsie	0,1	0,0	1,3	1,1	0,0	0,0	8,6	0,1	0,0	0,0	0,1
Abcès & pus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	1,2	0,0	0,0	0,3
Liquide	0,1	0,1	5,3	0,0	0,0	0,0	5,7	0,8	0,0	0,0	0,2
Autres	0,0	0,0	6,6	1,1	0,0	0,0	11,4	0,0	0,0	0,0	0,1

La tableau ci-dessous récapitule les principales discordances d'identification répertoriées en 2023 :

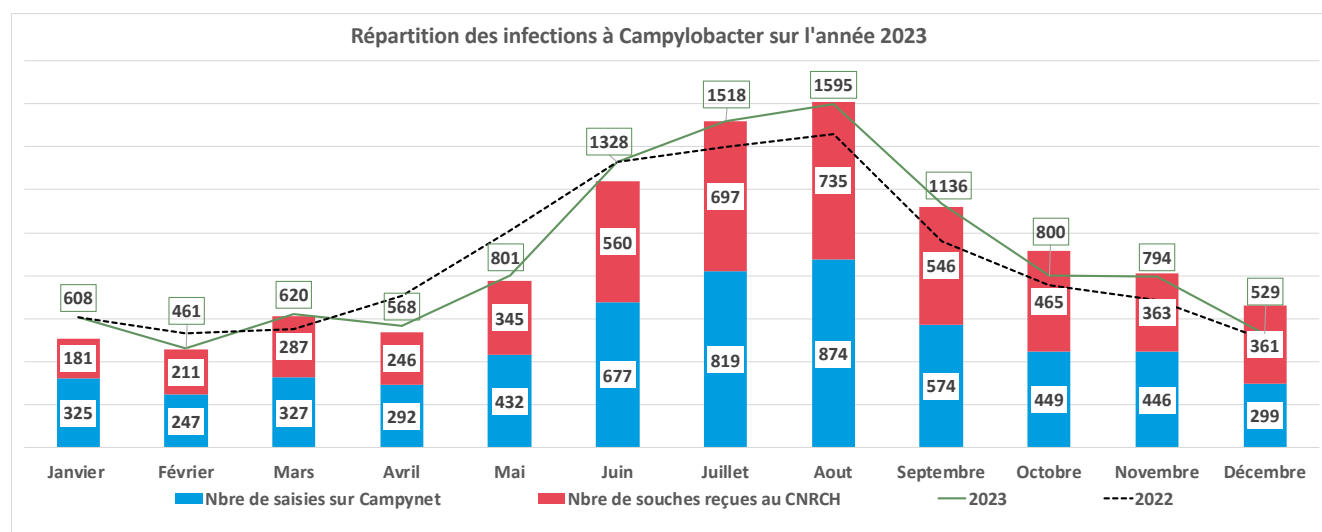
Correspondants	CNRCH	Nb.
<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	28
<i>C. jejuni</i>	<i>A. butzleri</i>	1
<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	15
<i>C. coli</i>	<i>A. butzleri</i>	3
<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	1
<i>C. fetus</i>	<i>H. pullorum</i>	1
<i>C. fetus</i>	<i>C. jejuni</i>	2
<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	1
		52

Nous avons également relevé 271 discordances d'antibiogramme (5,42%), en diminution par rapport à 2022 (6,13%), majoritairement pour la sensibilité à l'ampicilline, la ciprofloxacine et la tétracycline.

Discordance ATB	Nombre discordances	%par rapport au total des discordances	% par rapport au total des envois
Ampicilline	97	35,8%	1,9%
Amoxicilline-ac.clav.	10	3,7%	0,2%
Gentamicine	12	4,4%	0,2%
Erythromycine	13	4,8%	0,23%
Ciprofloxacine	81	29,9%	1,6%
Tétracycline	58	21,4%	1,2%
Total discordances 2023	271		
Total envois 2023	4997		

- Répartition mensuelle des souches isolées :

Le graphique ci-dessous indique le nombre de souches répertoriées au cours de l'année 2023.

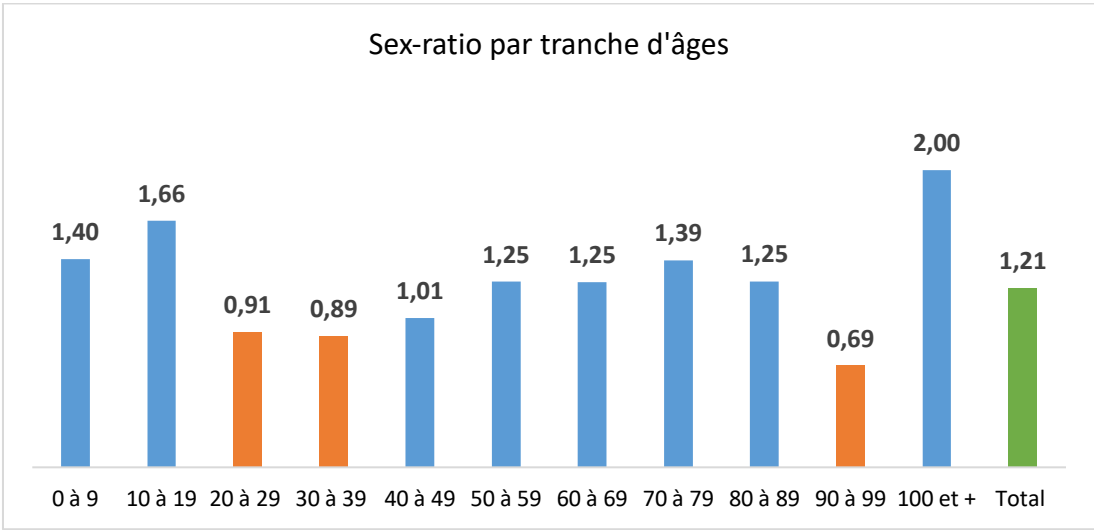


Ces données confirment la saisonnalité habituelle des infections à Campylobacters. Même si nous recevons des souches tout au long de l'année, les mois de Mai à Septembre regroupent 59,3% des souches répertoriées en 2023.

- Répartition par sexe :
Les chiffres ci-dessous tiennent compte des 10758 souches.

Sexe féminin	4871	45,3%
Sexe masculin	5887	54,7%

La prédominance masculine est toujours marquée avec un sex-ratio H/F de 1,21 en moyenne. Cette répartition est valable pour de nombreuses tranches d'âge sauf pour les 20-29 ans, 30-39 ans, et 90-99 ans (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	5871	75,2	1984	67,2	7855	73,2
Enfants, <15 ans et ≥1 an	1848	23,7	814	27,6	2662	24,74
Nourrissons <12 mois et ≥1 mois	71	0,91	125	4,2	196	1,82
Nouveaux nés <1 mois	14	0,18	31	1,05	45	0,42
Total (Nb.)	7804		2954		10798	

Les infections à Campylobacters touchent toutes les tranches d'âge avec 29,98% de cas pédiatriques (<15 ans). La proportion de nourrissons (<12mois) est plus importante au sein du réseau Campy.HOP (4,23% *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. L'âge moyen en 2023 est de 37,1 ans *versus* 36,1% en 2022.

Tranches d'âge	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109
Total (%)	20,84	13,22	14,88	9,52	7,12	8,24	9,5	9,92	5,32	1,39	0,06
Campy. COM (%)	18,8	13,56	16,18	11,06	8,12	8,91	9,16	9,39	4,02	0,76	0,04
Campy. HOP (%)	26,24	12,32	11,44	5,45	4,47	6,47	10,39	11,31	8,73	3,08	0,10

La proportion de cas âgés (supérieurs à 60 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 50% 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 10758 cas).

Hospitalisation	n=1917	17,82%
Consultation	n=6597	61,32%
Non précisé	n=2444	20,86%

-Analyse des bactéries identifiées par tranches d'âge et pour les 4 pathogènes majeurs

Nous présentons pour la première fois ces chiffres.

Tranche d'âge	Nb.	<i>C. jejuni</i> %	<i>C. coli</i> %	<i>A. butzleri</i> %	<i>C. fetus</i> %
0 à 9	2166	90,8	8,9	0,3	-
10 à 19	1374	89,6	10,3	0,1	-
20 à 29	1554	89,1	10,9	0,1	-
30 à 39	984	86,2	13,6	0,2	-
40 à 49	739	83,3	16,1	0,3	0,3
50 à 59	861	82,6	15,6	0,7	1,2
60 à 69	989	80,9	16,1	1,2	1,8
70 à 79	1025	76,4	17,7	3,3	2,6
80 à 89	550	76,8	13,9	5,4	3,9
90 à 99	148	66,1	16,9	10,5	6,5
100 et +	8	60,0	20,0	-	20,0

De manière intéressante, la proportion d'infection à *C. fetus* augmente chez les patients très âgés ainsi que les infections à *A. butzleri* au détriment des infections à *C. jejuni*.

L'étude rétrospective des caractéristiques épidémiologiques des infections à *A. butzleri* fait partie des projets 2024 du CNR.

-Voyage à l'étranger : Une notion de voyage à l'étranger a été renseignée (Oui/Non) dans 5469 cas sur 10758 cas. Le pays, ou la région du monde, a été précisé dans 506 cas. Les principales régions concernées étaient l'Europe et l'Afrique (cf tableau ci-dessous).

Régions du monde	Nombre de cas	Détails
Europe	182	dont Europe du sud (145)
Afrique	175	dont Afrique du Nord (142)
Proche et Moyen Orient	41	
Inde Indonésie	30	
Asie	29	
Iles de l'océan indien	15	
Amérique du Sud et Centrale	12	
Amérique du Nord	11	
Caraïbes	8	
Océanie	3	
TOTAL	506	

- Contexte épidémique :

Cas isolés	5866	54,53%
Cas groupés*	277	2,57%
Non précisé	4615	42,9%

*251 cas familiaux (96,1%), 26 cas en collectivités (9,4%).

Les infections à *Campylobacters* et bactéries apparentées sont donc principalement des cas isolés (lorsque l'information est disponible). Les cas groupés sont essentiellement familiaux (en augmentation par rapport à 2022), 65% d'entre eux surviennent entre mai et septembre : à noter qu'en 2023, 48,3% de ces cas groupés ont été signalés en juin et août.

En 2023, 10 cas groupés ont été analysés par biologie moléculaire. Trois ont été typés par RAPD, 7 par NGS : 6 se sont révélés de vrais cas groupés à *C. jejuni* et 2 à *C. coli* (8 cas familiaux) ; 2 se sont révélés de faux cas groupés à *C. jejuni* (1 cas familial et 1 cas de TIAC).

-Origine supposée de la contamination : L'origine alimentaire est précisée dans 382 cas sur 10758 (soit 3,6%, identique à l'an dernier). A ces cas rapportés, nous avons ajouté dans ce rapport 154 origines alimentaires estimées à l'aide de nos marqueurs d'attribution de sources pour *C. jejuni* et *C. coli* (données NGS). Les origines alimentaires auto-déclarées ont été corrigées après analyse NGS.

Ainsi, sur un total de 536 dossiers, (5% de nos dossiers) nous retrouvons : les viandes (57,8% dont 29,3% de la volaille), des plats préparés et restauration (14,1%), des produits de la mer (20,0%).

La répartition par espèce est présentée dans le tableau ci-dessous.

Origine alimentaire	Nb	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>	<i>A. butzleri</i>	NI ou autres	%
Volaille	154	74	74			6	29,3%
Produit de la mer	105	80	11			14	20,0%
Plats préparés, restauration	74	58	7		1	8	14,1%
Viande	64	52	8			4	12,2%
Ruminant	44	39	2			3	8,4%
Porc	32	7	25				6,1%
Produit laitier	24	17	3			4	4,6%
Charcuterie	10	5	1			4	1,9%
Eau	8	7	1				1,5%
Œuf	5	5					0,9%
Environnement	4	4					0,8%
Fruits et légumes	2	1				1	0,4%
Total	526	349	132	0	1	44	100,00%

NI : non identifié

La majorité était des cas isolés.

Origine alimentaire signalée et type de cas		
Cas groupé	76	20,0%
Cas isolé	364	95,3%
Inconnu	84	22,5%
	526	

Les bactéries concernées étaient les suivantes :

Origine alimentaire signalée et identification		
<i>C. jejuni</i>	349	66,4%
<i>C. coli</i>	132	25,1%
<i>A. butzleri</i>	1	0,2%
Sans identification	44	8,4%
	526	

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*

Nous incluons ici les données du CNR (biopsies, souches et ADN) et celles collectées dans le réseau Hélico-net. La majorité des cas positifs avait entre 30 et 69 ans (68%), majoritairement des femmes dans la quasi intégralité des tranches d'âge.

Âges	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80-89	Total
Homme	21	63	63	94	121	149	106	73	27	717
Femme	6	70	63	142	144	171	128	73	21	818
Total	27	133	126	236	265	320	234	146	48	1535
Ratio H/F	3,5	0,9	1	0,7	0,8	0,9	0,8	1	1,3	0,9

Les sérologies *H. pylori* ne sont pas réalisées par le personnel du CNRCH mais réalisées sur la chaîne automatisée du PABIM du CHU de Bordeaux à l'aide des réactifs Diasorin sur automate Liaison XL. 528 sérologies (93% en provenance du CHU de Bordeaux) ont été réalisées en 2023 : moyenne d'âge 53 ans, sex ratio 1,34 ; vs 56,7 ans en 2022 et un sex ratio de 1,23. 40,2 % d'entre elles étaient positives vs 34,3 % en 2022, 0,9 % équivoques, 56,6 % négatives et 2,3 % non réalisées pour raisons diverses.

Nous avons reçu 33 selles pour recherche d'antigènes de *H. pylori* (84,8% en provenance du CHU de Bordeaux) : sex ratio 1,54, moyenne d'âge 37,7 ans. Pour ces selles, 28 étaient négatives (84,8%), 7 positives (21,2%) et 1 n'a pu être testé (3%).

-Corrélation culture et PCR : La culture de *H. pylori* est réalisée sur gélose sélective préparée au CNR et en cas de contrôle sur gélose commerciale Pylori bioMérieux et depuis fin 2023 après évaluation sur gélose BD Helicobacter Agar (Becton Dickinson). La PCR est réalisée selon la technique publiée en 2003 (Oleastro M *et al.*, J Clin Microbiol). Nous utilisons depuis mars 2019 des barrettes préparées par Eurogentec et prêtes à l'emploi (cf rapport 2019, et Bénégat *et al.*, Helicobacter 2021). La concordance entre culture et PCR pour les biopsies gastriques reçues au CNR, est montrée ci-dessous pour 2023.

Pour 2023, nous avons identifié 13 correspondants qui nous font parvenir des biopsies ou des broyats de biopsies pour lesquels nous avons des doutes sur les conditions préanalytiques (transport-congélation/décongélation, ou de préparation/conserver des broyats). Ces 13 laboratoires ont en effet des % de faux négatifs par culture *versus* PCR de plus de 40%.

Culture	PCR	Nombre de patients 2023*	%
+	+	333	15,8
-	+	66	3,1
non réalisée	+	3	0,14
-	-	1 (HH)**	0,05
non réalisée	-	1699	80,9

*les données de 13 laboratoires ont été retirées (cf explications ci-avant)

**HH : 1 cas d'infection à *Helicobacter* du groupe Heilmannii

La culture de *H. pylori* a sous-estimé 16,5% des infections par rapport à la PCR (stable par rapport à 2022). 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. Malheureusement 13 correspondants n'arrivent pas à respecter ces conditions malgré nos conseils répétés.

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

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 48h (ou 72h) 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 fourni par le correspondant est indiquée sur le compte rendu final.

Un CQ est effectué tous les 15 jours. Une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb et répertoriée dans la base de données du secteur 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 2023. Nous indiquons les résultats obtenus pour les principales espèces identifiées en 2023 : *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*, *Campylobacter sp* et *Helicobacter sp*. Pour *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* et *Aliarcobacter sp* (Tableaux 3-8), nous présentons seulement les résultats pour l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ciprofloxacine et la gentamicine. En l'absence de «cut-offs» épidémiologiques adaptés pour catégoriser l'érythromycine et la tétracycline (Jehanne *et al.*, Microbiol Spectr. 2022), ces données ne sont pas présentées dans ce rapport.

Les valeurs obtenues pour les réseaux Campy.COM et Campy.HOP (en incluant pour chacun les données Campy-Internet) sont indiquées ainsi que les pourcentages 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* (34%) et *C. coli* (28,4%) : comme par le passé, la résistance est plus élevée chez *C. jejuni*. *C. fetus* reste parfaitement sensible (1,4%). Ceci est conforme aux années précédentes, tout comme la quasi absence de résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique excepté chez les bactéries du genre *Aliarcobacter*.

La résistance à la ciprofloxacine pour *C. jejuni* (64,8%) est presque aussi élevée que pour *C. coli* (66,2%). Il n'y a pas de différence entre les réseaux Campy.COM et Campy.HOP. Nous observons depuis 2016 un « rattrapage de cette résistance chez *C. jejuni* par rapport à *C. coli* avec une tendance à l'augmentation lente depuis cette période pour les deux espèces. La résistance de *C. fetus* à la ciprofloxacine est de 10,8%, en baisse par rapport à 2022. La résistance chez *C. lari* est élevée (91,7%) probablement liée à l'utilisation d'un « cut-off » inadapté pour cette espèce.

La résistance à l'érythromycine reste à un niveau très faible pour *C. jejuni* (0,5%), *C. coli* étant comme par le passé plus résistant (7,2%). Les souches de *C. coli* du réseau Campy.HOP sont plus résistantes (10,2%) que celles du réseau Campy.COM (5,9%).

La résistance à la tétracycline reste à un niveau très élevé (et semble stagner) notamment pour *C. coli* (78,9%) et pour *C. jejuni* (44,1%).

La résistance à la gentamicine reste anecdotique pour *Campylobacter sp* mais peut être rencontrée pour *C. jejuni* (0,4%) et *C. coli* (3%).

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

Phénotypes	<i>C. coli</i> (n=1001)*	<i>C. jejuni</i> (n=6554)*
Sensible à tous les ATB	94 (9,4%)	1323 (20,2%)
Erythromycine et Ciprofloxacine-R	65 (6,5%)	28 (0,4%)
Résistant à tous les ATB**	10 (1,0%)	0 (0%)

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

Ces chiffres sont globalement stables par rapport à 2022.

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

**Campylobacter sp* : 935 *Campylobacter sp* , 35 *C. ureolyticus*, 13 *C. rectus*, 5 *C. upsaliensis*, 5 *C. gracilis*, 4 *C. curvus*, 4 *C. hyointestinalis*, et 1 *C. armoricus*.

**Helicobacter sp* : 2 *H. pullorum*, 1 *H. canis*, 1 *H. cinaedi*.

Ampicilline											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	2986	512	17	8	2	3	0	1	0	1	3530
Résistant	1538	187	0	23	3	1	0	0	0	1	1753
Total	4524	699	17	31	5	4	0	1	0	2	5283
Résistance en %	34,0%	26,8%	0,0%	74,2%	60,0%	25,0%		0,0%		50,0%	33,2%
Non testé c.com	1387	185	1	2	0	0	1	697	0	0	2273
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	1293	200	55	18	1	2	24	24	4	1	1622
Résistant	667	96	1	39	6	1	10	2	0	1	823
Total	1960	296	56	57	7	3	34	26	4	2	2445
Résistance en %	34,0	32,4	1,8	68,4	85,7	33,3	29,4	7,7	0,0	50,0	33,7
Non testé c.hop	133	12	2	3	0	0	0	244	0	0	394
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	4279	712	72	26	3	5	24	25	4	2	5152
Résistant	2205	283	1	62	9	2	10	2	0	2	2576
Total	6484	995	73	88	12	7	34	27	4	4	7728
Résistance en %	34,0%	28,4%	1,4%	70,5%	75,0%	28,6%	29,4%	7,4%	0,0%	50,0%	33,3%
Non testé total	1520	197	3	5	0	0	1	941	0	0	2667

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

Amoxicilline-ac. clav.											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	4519	699	17	14	5	4	1	697	0	2	5958
Résistant	0	0	0	17	0	0	0	1	0	0	18
Total	4519	699	17	31	5	4	1	698	0	2	5976
Résistance en %	0,0%	0,0%	0,0%	54,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%		0,0%	0,3%
Non testé c.com	1392	185	1	2	0	0	0	0	0	0	1580
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	2035	302	57	32	7	3	24	26	4	2	2492
Résistant	0	0	0	26	0	0	10	0	0	0	36
Total	2035	302	57	58	7	3	34	26	4	2	2528
Résistance en %	0,0%	0,0%	0,0%	44,8%	0,0%	0,0%	29,4%	0,0%	0,0%	0,0%	1,4%
Non testé c.hop	58	6	1	2	0	0	0	244	0	0	311
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	6554	1001	74	46	12	7	25	723	4	4	8450
Résistant	0	0	0	43	0	0	10	1	0	0	54
Total	6554	1001	74	89	12	7	35	724	4	4	8504
Résistance en %	0,0%	0,0%	0,0%	48,3%	0,0%	0,0%	28,6%	0,1%	0,0%	0,0%	0,6%
Non testé total	1450	191	2	4	0	0	0	244	0	0	1891

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

Ciprofloxacine											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible FP	1579	235	17	26	0	2	0	1	0	2	1862
Résistant	2909	459	0	5	5	2	0	697	0	0	4077
Total	4488	694	17	31	5	4	0	698	0	2	5939
Résistance en %	64,8%	66,1%	0,0%	16,1%	100,0%	50,0%		99,9%		0,0%	68,6%
Non testé c.com	1423	190	1	2	0	0	1	0	0	0	1617
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible FP	726	103	49	44	1	1	10	19	2	2	957
Résistant	1329	202	8	12	6	2	12	7	1	0	1579
Total	2055	305	57	56	7	3	22	26	3	2	2536
Résistance en %	64,7%	66,2%	14,0%	21,4%	85,7%	66,7%	54,5%	26,9%	33,3%	0,0%	62,3%
Non testé c.hop	38	3	1	4	0	0	12	244	1	0	303
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible FP	2305	338	66	70	1	3	10	20	2	4	2819
Résistant	4238	661	8	17	11	4	12	704	1	0	5656
Total	6543	999	74	87	12	7	22	724	3	4	8475
Résistance en %	64,8%	66,2%	10,8%	19,5%	91,7%	57,1%	54,5%	97,2%	33,3%	0,0%	66,7%
Non testé total	1461	193	2	6	0	0	13	244	1	0	1920

FP : forte posologie

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

Erythromycine											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	4512	657	17		5			1			5192
Résistant	10	41	0		0			0			51
Total	4522	698	17		5			1			5243
Résistance en %	0,2%	5,9%	0,0%		0,0%			0,0%			1,0%
Non testé c.com	1389	186	1	33	0	4	1	697	0	2	2313
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	2032	274	57		7		21	23	1		2415
Résistant	21	31	0		0		1	3	1		57
Total	2053	305	57		7		22	26	2		2472
Résistance en %	1,0%	10,2%	0,0%		0,0%		4,5%	11,5%	50,0%		2,3%
Non testé c.hop	40	3	1	60	0	3	12	244	2	2	367
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	6544	931	74		12		21	24	1		7607
Résistant	31	72	0		0		1	3	1		108
Total	6575	1003	74		12		22	27	2		7715
Résistance en %	0,5%	7,2%	0,0%	Non testé	0,0%	Non testé	4,5%	11,1%	50,0%	Non testé	1,4%
Non testé total	1429	189	2	93	0	7	13	941	2	4	2680

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

Tétracycline											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	2522	150	16		5			1			2694
Résistant	1969	544	1		0			0			2514
Total	4491	694	17		5			1			5208
Résistance en %	43,8%	78,4%	5,9%		0,0%			0,0%			48,3%
Non testé c.com	1420	190	1	33	0	4	1	697	0	2	2348
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	1137	61	43		7		21	23	1		1293
Résistant	922	245	14		0		1	3	0		1185
Total	2059	306	57		7		22	26	1		2478
Résistance en %	44,8%	80,1%	24,6%		0,0%		4,5%	11,5%	0,0%		47,8%
Non testé c.hop	34	2	1	60	0	3	12	244	3	2	361
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	3659	211	59		12		21	24	1		3987
Résistant	2891	789	15		0		1	3	0		3699
Total	6550	1000	74		12		22	27	1		7686
Résistance en %	44,1%	78,9%	20,3%	Non testé	0,0%	Non testé	4,5%	11,1%	0,0%	Non testé	48,1%
Non testé total	1454	192	2	93	0	7	13	941	3	4	2709

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

Gentamicine											
C.COM	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. ureolyticus	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	3798	599	17	31	5	4		1		2	4457
Résistant	8	13	1	0	0	0		0		0	22
Total	3806	612	18	31	5	4		1		2	4479
Résistance en %	0,2%	2,1%	5,6%	0,0%	0,0%	0,0%		0,0%		0,0%	0,5%
Non testé c.com	1420	190	1	33	0	4	1	697	0	2	2348
C.HOP	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	1868	274	56	55	7	2	22	22	3	2	2311
Résistant	17	14	0	0	0	0	0	2	1	0	34
Total	1885	288	56	55	7	2	22	24	4	2	2345
Résistance en %	0,9%	4,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%	25,0%	0,0%	1,4%
Non testé c.hop	208	20	2	5	0	1	12	246	0	0	494
TOTAL	C. jejuni	C. coli	C. fetus	A. butzleri	C. lari	A. cryaerophilus	C. upsaliensis	*Campylobacter sp	*Helicobacter sp	Aliarcobacter sp	Total
Sensible	5666	873	73	86	12	6	22	23	3	4	6768
Résistant	25	27	1	0	0	0	0	2	1	0	56
Total	5691	900	74	86	12	6	22	25	4	4	6824
Résistance en %	0,4%	3,0%	1,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8,0%	25,0%	0,0%	0,8%
Non testé total	2313	292	2	7	0	1	13	943	0	0	3571

-Tendances évolutives sur une période de 37 ans (Figure ci-après). La résistance à la ciprofloxacine chez *C. coli* se stabilise depuis sa descente amorcée en 2012. Depuis 2019, la résistance à la ciprofloxacine est maintenant quasi identique chez *C. jejuni* et *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 avec néanmoins l'émergence chez *C. coli* de souches possédant *ermN* (cf bilan des approches 2023 NGS du CNR).

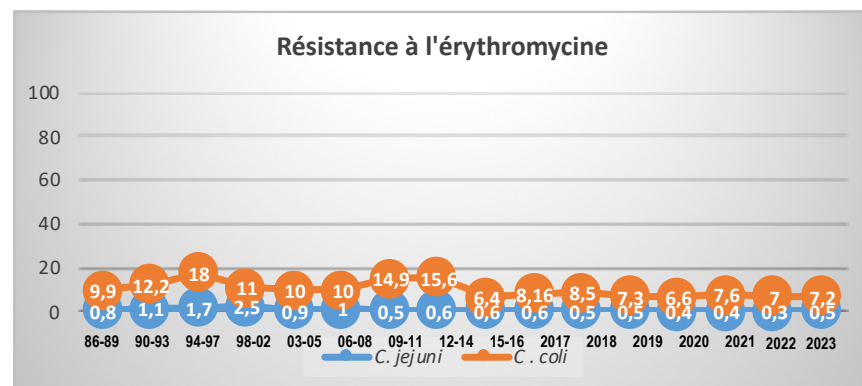
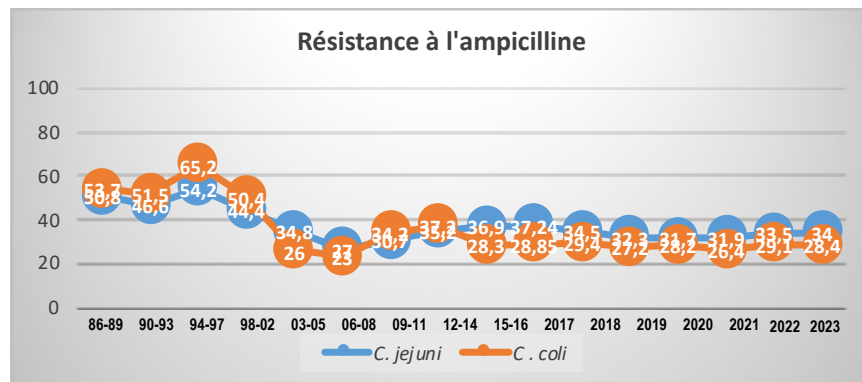
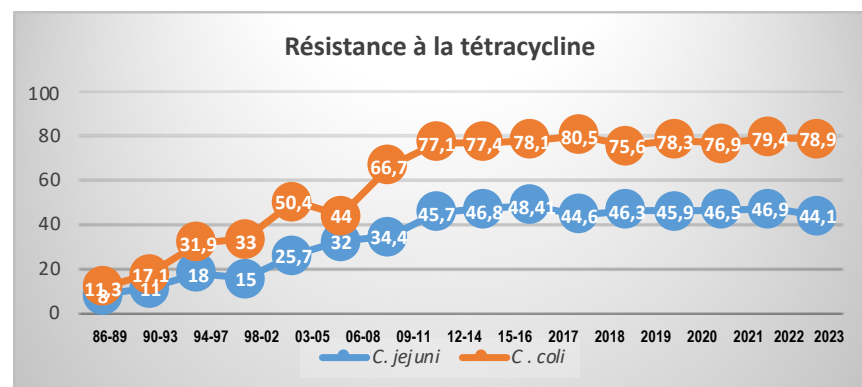
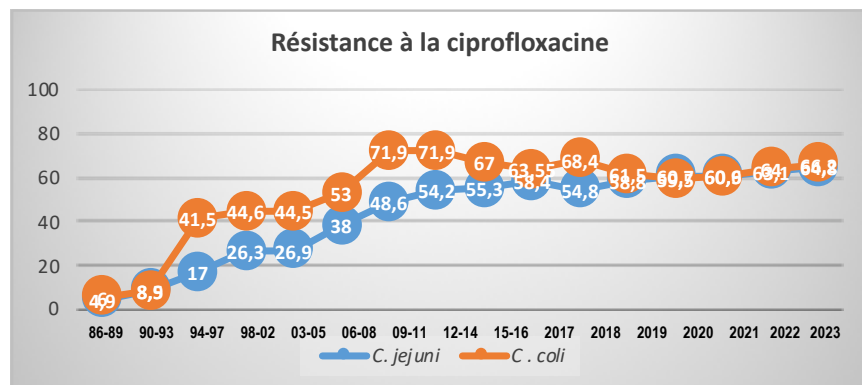


Figure. Evolution en France de la résistance aux antibiotiques chez *C. jejuni* et *C. coli* sur une période de 37 ans.

Les résultats sont exprimés en pourcentage.

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

Tous les antibiogrammes ont été réalisés par Etest selon les recommandations du CA-SFM 2023. Les milieux utilisés étaient pour 2023, soit le milieu MH-10% sang de cheval (préparé au CNR), soit la gélose Schaedler vit K1 soit la gélose MH-F (bioMérieux), avec un inoculum 3 McF, par inondation, incubation à 37°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 géloses, une trace des valeurs du CQ est stockée dans la base du serveur SIRWeb et dans la base de données du secteur qualité au CNRCH. Un biologiste vérifie systématiquement les valeurs lues.

Le CNR teste l'ensemble des molécules en liste principale et complémentaire tel que mentionné dans les recommandations du CASFM. Ce n'est pas le cas des participants du réseau Hélico-net. Aussi, les principaux phénotypes de sensibilité récapitulés dans le tableau ci-après sont ceux obtenus au CNR.

Nb.	%	Phénotype (résistant à)					
		A	C	L	M	R	T
164	41,5						Sensible à tous les antibiotiques testés
109	27,6				X		Métronidazole-R
23	5,8		X				Clarithromycine-R
12	3,0			X			Lévofloxacine-R
8	2,0	X	X				Clarithromycine-Lévofloxacine-R
40	10,1	X		X			Clarithromycine-Métronidazole-R
17	4,3			X	X		Lévofloxacine-Métronidazole-R
15	3,8	X	X	X			Clarithromycine-Lévofloxacine-Métronidazole-R
3	0,8				X	X	Métronidazole-Rifampicine-R
2	0,5		X		X	X	Clarithromycine-Métronidazole-Rifampicine-R
1	0,3	X	X	X	X	X	Amoxicilline-Clarithromycine-Lévofloxacine-Métronidazole-Rifampicine-R
1	0,3	X	X	X	X		Amoxicilline-Clarithromycine-Lévofloxacine-Métronidazole-R

A : amoxicilline ; C : clarithromycine, L : lévofoxacine ; M : métronidazole ; R : rifampicine, T : tétracycline.

La majorité des souches en France sont soit sensibles à tous les antibiotiques d'intérêt soit uniquement résistantes au métronidazole. Tous phénotypes confondus, seuls 6,4% des souches en 2023 sont résistantes à la fois à la Clarithromycine et à la Lévofoxacine (stable par rapport à l'année précédente).

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. Cela concerne 837 souches viables pour 2023 (données CNR + Hélico-net).

Phénotype clarithromycine	Génotype clarithromycine	2022 Nb. (%)	2023 Nb. (%)
Sensible	WT	356/490 (72,7%)	602/837 (71,9%)
	muté	8/490 (1,6%)	1/837 (0,12%)
	WT + muté		18/837 (2,15%)
Résistant	WT	5/490 (1,0%)	
	muté	87/490 (17,8%)	186/837 (22,2%)
	WT + muté	1/490 (0,2%)	30/837 (7,75%)
Total		490	837

Les discordances sont rares entre phénotype de sensibilité à la clarithromycine et génotype déterminé par PCR : 0,12% uniquement de discordance majeure due à 1 cas interprété Sensible *in vitro* mais de génotype muté par PCR. Ces données montrent l'intérêt de la PCR et la qualité des résultats obtenus *in vitro*.

La répartition du génotype de l'ADNr 23S déterminant la sensibilité à la clarithromycine déterminé par PCR s'établit comme ceci.

Génotype	Nombre de patients (par génotype) en 2022 et %	Nombre de patients (par génotype) en 2023 et %*
WT	583/777 (75%)	969/1336 (72,5%)
A2142-3G	136/777 (17,5%)	292/1336 (21,9%)
A2142C	1/777 (0,1%)	2/1336 (0,15%)
A2143C	0	0
A2142T + WT	0	1/1336 (0,07%)
A2142-3G + WT	56/777 (7,2%)	71/1336 (5,3%)
A2142C + WT	0	1/1336 (0,07%)
A2142-3G + A2142C	1/777 (0,1%)	0

*CNR+ réseau Hélico-net

Comme par le passé, la mutation A2142-43G est la plus fréquente. La proportion de double population (WT + muté) est en baisse en 2023 versus 2022 (5,4% versus 7,2%). Ceci est probablement lié à l'intégration des données Hélico-net cette année car la plupart des laboratoires participants utilisent des formats de PCR *H. pylori* en temps réel qui ne sont pas en mesure de détecter la présence de double population. La mutation A2142C reste anecdotique en France (0,1%). La mutation A2142T, que le CNR a participé à décrire par le passé, est retrouvée en 2023 dans un cas seulement.

Nous avons mis en place depuis 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 2023 et pour la sixième année consécutive, la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques pour les souches isolées de biopsies gastriques en routine au CNRCH. Nous fusionnons également cette année les données recueillies à l'aide du réseau Hélico-net.

Nous disposons pour 2023 des renseignements cliniques associés à 1535 biopsies positives en PCR ou en culture (données CNR+ réseau Hélico-net).

2023		
Pathologie	Nombre	% par pathologies
Non renseignée	401	26,1
Gastrite	328	21,4
Epigastralgies	239	15,6
Autres	164	10,7
Ulcères	95	6,2
Anémies (fer-B12)	95	6,2
Reflux	73	4,8
CB/Sleeve	44	2,9
Dyspepsie NU	32	2,1
Sérologie positive	30	2
Cancer (ou ATCD familial)	30	2
MALT	4	0,3
	1535	100

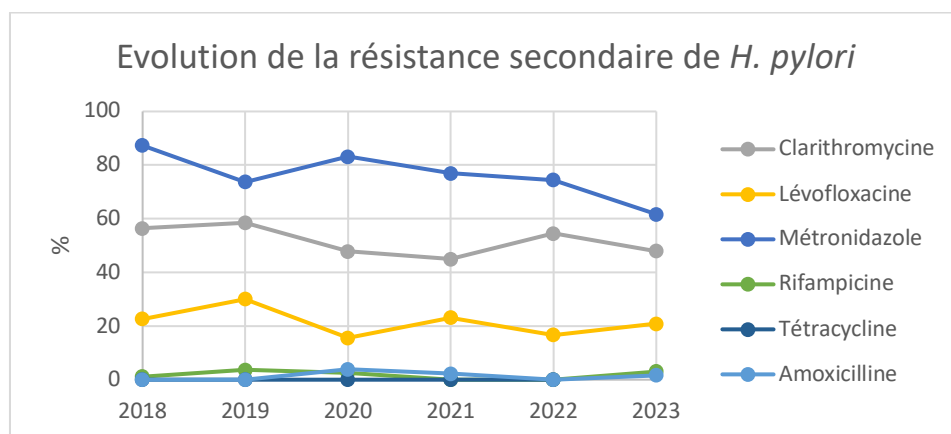
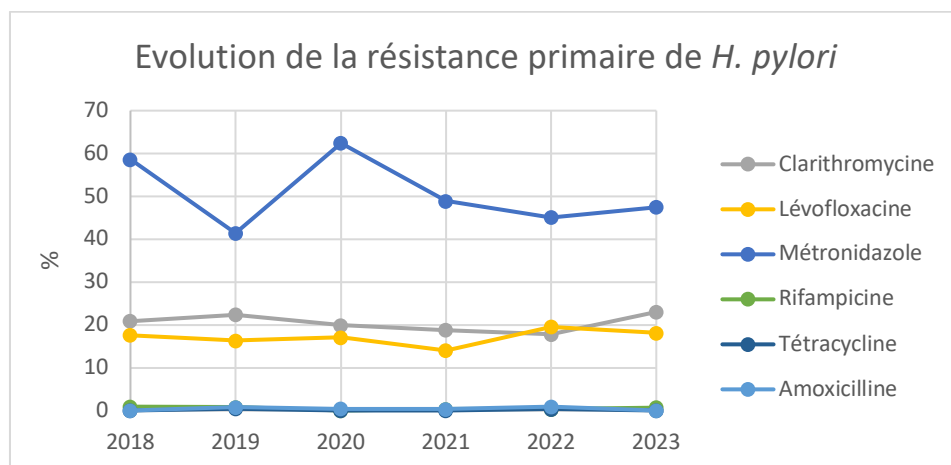
La résistance à la clarithromycine conditionne soit l'utilisation de cette molécule dans la stratégie thérapeutique soit les chances de succès thérapeutiques en cas de traitement empirique. En 2023, le pourcentage de résistance primaire aux macrolides était de 23% versus 48% en secondaire. La résistance primaire à la clarithromycine était en baisse régulière depuis 2020 de environ 1% par an mais restait néanmoins supérieure au seuil de 15% au-delà duquel cette molécule ne peut être utilisée en probabiliste. Cette ré-augmentation est brutale passant de 17,8% en 2022 à 23% en 2023. Les pourcentages de résistance primaire à la clarithromycine sont les mêmes au CNR et au sein du réseau Hélico-net (données non montrées). Il sera intéressant de comparer nos données à celles des CNR *H. pylori* européens et aux données des prochaines années. Le CNR *H. pylori* belge n'observe pas d'augmentation pour 2023 mais signale des variations de 2 à 3% occasionnelles entre chaque année.

La résistance primaire à la lévofloxacine reste, elle aussi, à un niveau élevé en 2023 (18,1%) mais sans réelle évolution depuis 2018. Nous ne constatons pas non plus d'augmentation significative de la résistance chez les patients en échec de traitement d'éradication. La lévofloxacine n'est en effet pas utilisée en traitement probabiliste.

	Résistance primaire (%)							Résistance secondaire (%)					
	2018	2019	2020	2021	2022	2023		2018	2019	2020	2021	2022	2023
Amoxicilline	0	0,8	0,4	0,3	0,9	0		0	0	3,9	2,2	0	1,6
Clarithromycine*	20,9	22,4	19,9	18,8	17,8	23		56,4	58,5	47,8	45	54,5	48
Lévofloxacine	17,6	16,3	17,1	14	19,5	18,1		22,7	30	15,6	23,1	16,7	20,9
Métronidazole	58,6	41,4	62,4	48,9	45,1	47,5		87,3	73,7	83,1	76,9	74,4	61,7
Rifampicine	0,9	0,8	0	0,3	0,3	0,7		1,2	3,7	2,6	0	0	3,1
Tétracycline	0	0,4	0	0	0,3	0		0	0	0	0	0	0

*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.



Conformément aux années passées, la résistance à l'amoxicilline, la rifampicine et la tétracycline est rare ou absente chez *H. pylori*.

La résistance au métronidazole reste à un niveau élevé à la fois chez les patients naïfs ou en échec de traitement d'éradication. Comme chaque année, la résistance à l'amoxicilline reste à un très faible niveau tout comme la résistance à la rifampicine qui doit rester un antibiotique de secours en cas d'éradication difficile.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Nous avons transmis, à la demande de Santé Publique France, nos bilans 2023 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

-Mise en place du réseau Hélico-net : un nouvel outil de surveillance épidémiologique des infections à *H. pylori* en France

Nous avons activé en juin 2023 un nouveau système de surveillance déclaratif des infections à *H. pylori* en France construit sur la base du site de saisie Campy-Internet.

L'objectif premier était d'élargir le réseau de surveillance des infections à *H. pylori* du CNR et si possible à l'ensemble du territoire national. L'objectif second était de faire un état des lieux des pratiques diagnostic au sein des laboratoires de biologie, notamment la place de la culture et de la PCR.

Nous avons contacté par mail (AZAY, ColBVH, syndicat des laboratoires privés, correspondants du réseau Campy-Internet) et par contacts directs (téléphone, congrès...) des laboratoires réalisant le diagnostic de l'infection à *H. pylori*.

Entre juin et décembre 2023, 27 laboratoires (14 CHU, 7 CH et 6 laboratoires privés) ont accepté de participer, 20 ont saisi des données dans le site Hélico-net. Ces laboratoires ont accès, via le site internet du CNR, à l'aide d'un login et mot de passe à un site de saisie. Seuls les cas d'infection à *H. pylori* sont saisis (par culture et/ou PCR).

Les principales données demandées sont :

- des données patients (anonymisées) : âge, sexe, code postal, pays de naissance ;
- nature et localisation des biopsies ;
- données cliniques : diagnostic, notion de traitement d'éradication antérieur ;
- données microbiologiques : PCR, culture, kit de PCR utilisé, géloses, données antibiogramme.

Sur 6 mois de saisies, 834 dossiers étaient analysables. Les données ont été intégrées dans le bilan épidémiologique 2023 pour *H. pylori*.

La répartition des données saisies dans Hélico-net est présentée dans la figure ci-dessus.

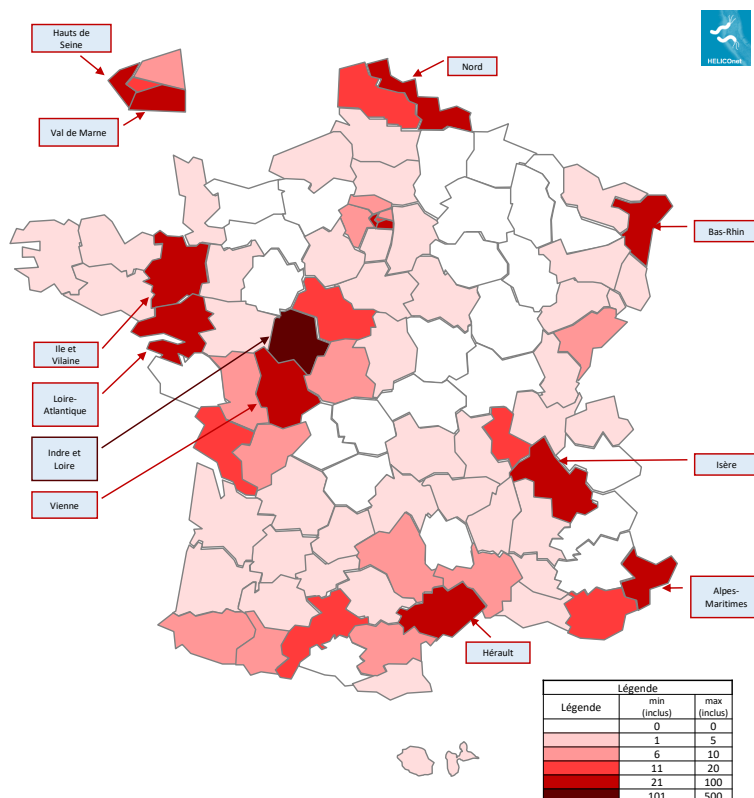


Figure. Couverture 2023 du réseau Hélico-net. Données basées sur 6 mois de saisie (834 dossiers) et sur l'origine géographique des patients.

Les départements les plus couverts sont ceux où un laboratoire a intégré le réseau. Cela montre que les CHU et CH ont un recrutement majoritairement local.

La moyenne d'âge des patients était de 46 ans (+/-20) avec un sex ratio de 0,93 (données similaires à celles du CNR).

Une notion de traitement était renseignée dans 65,3% des cas avec 355 patients naïfs de traitement et 190 patients en échec. Le détail des traitements était renseigné pour 91 dossiers sur 190 (47,9%) avec une notion de prescription de Pylera® dans 79,2% (seul ou associé à 1 ou 3 autres lignes de traitement).

Le format de PCR *H. pylori* majoritairement utilisé est le kit Rida®Gene *H. pylori* de Rbiopharm (63%) suivi du kit Allplex™ *H. pylori* Clari R assay de Seegene (19%). Ces deux kits ont par le passé été évalués au CNR. Quatre laboratoires utilisent Rida®Gene *H. pylori* en l'automatisant sur BD MAX ou Ingenius selon les protocoles publiés par le CNR.

La place de la culture par rapport à la PCR est très hétérogène, seuls 30% des laboratoires pratiquent la PCR en tenant compte des recommandations de la nomenclature officielle depuis décembre 2022.

La gélose pour primoculture est en majorité la gélose Pylo bioMérieux (82%). La gélose antibiogramme plébiscitée est la gélose MH-F (70%).

Les données antibiogrammes ont été évaluées à l'aide d'un EEQ envoyé aux laboratoires participants : 17 laboratoires/19 ont validé cet EEQ. Nous avons donc intégré leurs valeurs de CMI dans celles du CNR en 2023. Tout phénotype de résistance rare a été contrôlé à la demande du CNR (envoi des souches ou des ADN).

Les données PCR ont été analysées pour vérifier la concordance génotype/phénotype pour la résistance aux macrolides. Le CNR a demandé à chaque laboratoire d'envoyer l'ADN ou le reliquat de broyat au CNR pour vérification des quelques discordances.

Les données d'antibiorésistance ont été intégrées aux données 2023 du CNR.

Nous remercions chaleureusement les biologistes participant à ce nouveau réseau. Les données collectées sont d'excellente qualité. Notre CNR grâce à ce réseau améliore sa surveillance épidémiologique des infections à *H. pylori* en France. L'ensemble des objectifs fixés est atteint dès les 6 premiers mois de fonctionnement.

Le recrutement de nouveaux participants continue. L'intégration en janvier 2024 du laboratoire CERBA nous permettra d'augmenter la couverture de notre réseau.

-Analyses NGS de souches en provenance de Polynésie Française

Le laboratoire de biologie médicale de l'Institut Louis Malardé à Papeete (Tahiti) a contacté le CNRCH en 2023 dans le cadre de la surveillance épidémiologique des *Campylobacters* sur le territoire de la Polynésie Française (contact : Marine Deleume, mdeleume@ilm.pf). La Polynésie Française n'étant en effet pas couverte par le CNRCH, l'opportunité de recevoir des souches de ce territoire était très intéressante pour l'épidémiologie de cette région éloignée de la métropole. En 2022 et 2023, ce laboratoire a isolé un total de 17 souches. Un premier lot de 9 souches de *Campylobacter* (+ 1 *Aliarcobacter* sp) a été envoyé au CNRCH en Septembre 2023 pour analyses NGS et bioinformatiques.

Tableau. Informations sur les 9 premières souches de Polynésie Française reçues au CNRCH en Septembre 2023.

Id souche	Espèce MALDI	Sexe patient	Age	CP	Date de prélèvement	Nature
P01	<i>C. jejuni</i>	Féminin	3	98735	19/10/2022	Selles
P02	<i>C. jejuni</i>	Masculin	2	98735	07/12/2022	Selles
P03	<i>C. jejuni</i>	Féminin	1	98704	14/02/2023	Selles
P04	<i>C. jejuni</i>	Masculin	7	98728	04/08/2023	Selles
P05	<i>C. jejuni</i>	Masculin	67	98731	01/06/2023	Selles
P06	<i>A. butzleri</i>	Masculin	3	98702	06/01/2023	Selles
P07	<i>C. jejuni</i>	Masculin	9	98735	22/11/2022	Selles
P08	<i>C. jejuni</i>	Masculin	9	98735	08/11/2022	Selles
P09	<i>C. jejuni</i>	Féminin	29	98728	07/01/2023	Selles

Tableaux. Résultats bio-informatiques sur les génomes séquencés des 9 souches.

Id souche	Espèce ANI	Score ANI	CC	ST	Source de contamination	Score source
P01	<i>C. jejuni</i>	97.43		4325	Volaille	100
P02	<i>C. jejuni</i>	97.55			Volaille	100
P03	<i>C. jejuni</i>	96.64			Volaille	100
P04	<i>C. jejuni</i>	97.67	21	3528	Ruminant	100
P05	<i>C. jejuni</i>	97.75		8748	Volaille	99.7
P06	<i>A. cryaerophilus</i>	92.82				
P07	<i>C. jejuni</i>	97.73	48	2343		
P08	<i>C. jejuni</i>	97.64	21	3528	Ruminant	100
P09	<i>C. jejuni</i>	97.72	206	227	Ruminant	100

Id souche	AMP	CIP	ERY	GEN	TET
P01	S	S	S	S	S
P02	S	S	S	S	S
P03	S	S	S	S	S
P04	S	S	S	S	S
P05	S	GyrA-T86I	S	S	S
P06	S	S	S	S	S
P07	S	GyrA-T86I	S	S	S
P08	S	S	S	S	S
P09	S	S	S	S	S

Nos analyses montrent une faible diversité au niveau des espèces représentées. En effet, il s'agit quasi exclusivement de souches de *C. jejuni* et une espèce peu commune du genre *Aliarcobacter*. Au sein même de ce pool de souches de *C. jejuni*, une grande diversité de clones est visible. Chaque souche semble unique, hormis les souches P04 et P08 qui semble provenir d'un cluster commun (CC-21 et ST-3528, avec la source de contamination attribuée au réservoir des ruminants). Les souches sont dans l'ensemble sensibles aux antibiotiques. Seules les souches P05 et P06 se montrent résistantes à la ciprofloxacine. Concernant la souche de *Aliarcobacter* sp., une discordance a été observée entre l'identification de l'espèce par MALDI (*A. butzleri*) et par NGS (*A. cryaerophilus*, méthode ANI). Cependant, les scores d'identification sont non-significatifs dans les deux cas : il s'agirait ici d'une potentielle nouvelle espèce. Des analyses complémentaires seront menées en 2024. Si un nouvel isolat de cette espèce se présente, une publication scientifique sera être rédigée.

La description d'isolats de *Campylobacter* ou espèces apparentées en Polynésie Française est cruciale pour l'activité du CNRCH et la collaboration entre les deux laboratoires se poursuivra en 2024.

-ONERBA-DIG - Enquête trans-réseau de l'ONERBA en association avec le CNR des Campylobacters, le CNR des *E. coli*, *Shigella* et *Salmonella* et le CNR des yersinioses.

"Prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à tropisme digestif en France"

Objectif – Introduction : Les données nationales concernant la résistance aux antibiotiques des bactéries à tropisme digestif telles *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* sont majoritairement colligées par chacun des CNR dédiés. Afin de renforcer ces données, une enquête a été menée auprès des laboratoires correspondant des réseaux de surveillance de l'ONERBA et des missions nationales portées par SPARES, PRIMO et PROMISE.

Matériels et méthodes : Chaque laboratoire volontaire a exporté anonymement ses données collectées en routine en 2019, 2020, 2021 et 2022 sur la résistance aux antibiotiques des souches de *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* isolées de prélèvements à visée diagnostique. Les données d'identification et d'antibiogramme étaient celles fournies par le laboratoire. Les duplicas n'ont pas été considérés. Parallèlement, chaque laboratoire a rempli un questionnaire en ligne sur les pratiques de coproculture : nombre, référentiel, techniques utilisées, place des kits entériques.

Résultats : Au total, près de 70 laboratoires, dont 60% de laboratoires hospitaliers et 40% de plateaux techniques privés, ont envoyé leurs fichiers rassemblant des données de résistance de 23 843 *Campylobacter*, 11 565 *Salmonella*, 2 427 *Yersinia* et 1 257 *Shigella*. Pour plus de 90%, les données sont issues de coprocultures.

Les données de résistance globale, tous entéropathogènes confondus, indiquent une fréquence de la résistance de : 10% pour l'amoxicilline-acide clavulanique (40% pour l'ampicilline seule), 4 à 10% selon les céphalosporines de 3^{ème} génération, près de 50% de résistance aux fluoroquinolones (significativement associées à *Campylobacter* spp.), 11% pour le cotrimoxazole et de moins de 0.1% pour les carbapénèmes.

L'analyse du questionnaire indique l'usage de la PCR syndromique pour 60% des coprocultures (86% des laboratoires de ville l'utilisant systématiquement) avec une place de plus en plus prépondérante à partir de 2020. La mise en culture des selles, quel que soit le résultat de la PCR, reste d'usage pour plus de 50% des laboratoires questionnés (significativement plus important pour les laboratoires hospitaliers). L'antibiogramme est alors systématiquement effectué sur les entéropathogènes isolés, excepté pour les pathovars de *Escherichia coli*.

La participation aux réseaux de surveillance des CNR reste active et plus prononcée pour les laboratoires de ville participants à cette enquête.

Conclusion : Les données de résistance aux antibiotiques pour les bactéries à tropisme digestif de ces 4 dernières années permettent de conforter la fréquence de résistance observée par les CNR. L'expertise et la surveillance de ces derniers apparaissent renforcées au fil de ces 4 dernières années, notamment avec l'avènement des PCR syndromiques. Il est important de mettre en perspective des données d'origine humaine avec les émergences actuelles signalées par les CNR, et celles trouvées chez l'animal, dans le cadre de la surveillance alimentaire et/ou dans l'environnement.

Perspectives : L'enquête a été construite fin 2022, les données ont été analysées fin 2023 et présentées en congrès au cours de la RICAI 2023. Les données collectées doivent être comparées à celles des CNR respectifs notamment en terme d'antibiorésistance. Le CNRCH prendra bien entendu part à l'écriture d'un article scientifique à finaliser en 2024.

-Participation au PHRC REBALANCE (2019-2023) :

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.

Le bilan 2019-2023 est présenté ci-dessous.

Bilan REBALANCE						
	2019	2020	2021	2022	2023	Total
Nombre total de selles reçues	42	0	7	27	40	116
Nombre de selles positives à <i>Campylobacter</i> :	0	-	1	1	4	6
par culture	-	-	0	0	0	0
par PCR	-	-	1	2	4	6
par ELISA	-	-	0	0	1	1
Nombre de donneurs	23	-	7	13	16	56
Moyenne d'âge (par donneur)	25	-	30	26	25	26
Ratio H/F (par donneur)	1,6	-	1,3	0,9	1,26	1,43

Ce projet est terminé depuis fin 2023.

-Protocole CAMPYLODIP de recherche clinique interne au CHU de Bordeaux (2022-2024) :

L'objectif principal est de déterminer la prévalence du portage de *Campylobacter* sp dans les selles des patients atteints d'un déficit immunitaire.

Les objectifs secondaires sont :

- de définir la diversité des *Campylobacter* sp et leur profil de résistance aux antibiotiques ;
- d'identifier le profil immunologique des patients présentant un portage chronique de *Campylobacter* sp ;

-d'identifier d'éventuels facteurs de risque d'infection à *Campylobacter sp.*

Les patients sont suivis dans le service de Médecine Interne de l'Hôpital du Haut-Lévêque, patients affectés d'un déficit immunitaire primitif ou secondaire, humoral et/ou cellulaire et relevant d'une substitution par immunoglobulines polyvalentes.

Un recueil des données démographiques, cliniques et thérapeutiques de chacun des patients est effectué.

A chaque inclusion, une analyse de selles (2 analyses à 6 mois d'intervalle, V1 et V2) est réalisée incluant :

-une coproculture avec recherche de *Campylobacter sp* par PCR et réalisation d'un antibiogramme de *Campylobacter sp* (si culture positive) ;

-un dosage de calprotectine fécale ;

-un dosage d'IgA fécaux.

Un bilan biologique sanguin entrant dans le cadre du soin courant est également réalisé : CRP ; Électrophorèse des protéines sériques ; Dosage IgM, IgG, IgA ; Dosage des sous classes IgG ; Sous-populations lymphocytaires incluant un phénotypage B et T.

Des biopsies peuvent être analysées s'il y a nécessité d'effectuer une endoscopie digestive au patient (culture de bactéries entéropathogènes).

Les aspects éthiques de ce protocole entrent dans le cadre du soin courant du patient avec remise d'une note d'information au patient.

Le bilan 2023 est présenté ci-dessous.

Bilan Campylodip 2022-2023	
Nombre total de selles reçues	65 (54 en V1)
Données patients	25 H, 29 F, 58 ans +/- 17
Nombre de selles positives à <i>Campylobacter</i> ou <i>Aliarcobacter</i> :	8
par culture	4
uniquement par PCR	4
uniquement par ELISA	0

Les inclusions se termineront en mai 2024 en particulier avec l'envoi vers le CNR de prélèvements à 6 mois du premier (V2) afin de déterminer si les patients positifs en V1 sont toujours « infectés ». Le génome des souches isolées sera séquencé. Le bilan des données cliniques et biologiques est en cours.

Ce travail sera intégré au projet de thèse d'un interne en médecine interne du CHU de Bordeaux, Mr Basile Mecherdene.

-Surveillance des mutations associées à la résistance aux rifamycines, à la tétracycline et à l'amoxicilline *H. pylori*.

En 2023, le gène *rpoB* de 10 souches de *H. pylori* isolées au CNRCH ayant une CMI à la rifampicine supérieure à 4 mg/L a été séquencé afin de déterminer les mutations responsables de cette résistance.

Normalement, les mutations les plus représentées sont celles présentes au niveau des acides aminés 530 et 540 : substitution d'un D par N ou E pour la position 530 et substitution d'un H par L pour la position 540.

Souche	CMI Rifampicine (mg/L)	Mutation <i>rpoB</i>
1	>32	L547F
2	>32	H540N
3	32	D530E
4	32	I586I
5	>32	D530N
6	>32	D530E
7	>32	H540N
8	>32	I586L
9	>32	H540N
10	>32	D530N

Comme en 2022, une seule souche possède la mutation L547F. Cette mutation est connue et décrite par Heep *et al.*, dans AAC en 2020 et Hays *et al.*, dans Helicobacter en 2017. Deux souches possèdent la mutation I586L partiellement décrite par Wang *et al.*, dans AAC en 2021.

Aucune nouvelle mutation n'a été identifiée en 2023.

En 2023, aucune souche de *H. pylori* ne présentait de CMI à la tétracycline > à 1 mg/L.

En revanche, 2 souches présentaient une CMI à l'amoxicilline supérieure à 0,125 mg/L (CMI=0,5 mg/L pour les deux). Leur génome est en cours d'analyse. Le gène *pbp1*, codant pour la « penicillin-binding protein », est en effet proposé pour être responsable de la résistance à l'amoxicilline, mais les mutations en cause sont nombreuses et mal déterminées. Nous espérons finaliser en 2024, une collaboration en cours sur ce sujet avec le Dr Ivo G Boneca, spécialiste du peptidoglycane, à l'Institut Pasteur de Paris.

-Surveillance des mutations associées à la résistance aux rifamycines et aux fluoroquinolones chez *H. pylori* pour des biopsies positives en PCR mais négatives en culture

En 2023, 4 recherches de mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones et rifamycines ont été effectuées. Cela concernait des patients pour lesquels la recherche de *H. pylori* par culture a échoué (pas d'antibiogramme) et pour lesquels la PCR indiquait une résistance aux macrolides : sur 4 patients culture neg/23S muté, aucun n'était infecté par une souche résistante aux rifamycines, 2 étaient infectés par une souche résistante aux fluoroquinolones (mutation N87K déterminée sur la région QRDR).

Ce type d'approche va être développé en routine en 2024 au CNR à l'aide d'une approche NGS (DNA Capture).

4. Alertes

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.

Aucun événement majeur n'a été noté en 2023. Cependant, le CNR a été en contact avec certains ARS pour des suspicions TIAC via nos laboratoires partenaires :

-ARS Auvergne Rhône Alpes en mars 2023 – Suspicion de cas groupés au sein du personnel d'un Burger King (sans suite) ;

-Déclaration TIAC en juillet 2023 - par le LABM Verbizier Barrau St Giron, prélèvement du 25/7/2023. Non confirmé.

-ARS Rhône Alpes en novembre 2023 - via le CH Annonay

-ARS Hauts-de-France en novembre 2023 - site d'Amiens, TIAC à *Campylobacter* à Maubeuge après repas dans un KFC, non confirmé.

Nous suggérons que chaque ARS puisse adresser une lettre d'information à l'ensemble des laboratoires privés et hospitaliers sur la nécessité d'effectuer ou de coordonner les déclarations de TIAC mais surtout de conserver les souches ou prélèvements afin de les rendre disponibles. Cela nous permettrait en effet d'intervenir à temps afin de récupérer et de pouvoir confirmer ou non les cas groupés signalés.

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.

5. Activités de mise à disposition de l'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

-Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques

Master 2 : Léo Gillet (Université de Bordeaux) et Pierre Louis Maunet (Université de Tours). 6 mois de stage chacun.

BTS Analyses Biotechnologiques (Lycée de Blanquefort, Gironde : Juliette Gebhart, 12 semaines de stage.

Elève de 3^{ème}, stage d'observation : Hanaé Achard, 1 semaine.

-Internes en Biologie Médicale : Sahel Wandji et Quentin Beaufils. Travaux effectués dans le cadre de leur thèse d'exercice (direction P Lehours).

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

-P Lehours. Infections à *Campylobacter*. EMC - Biologie médicale 2023;1-10 [Article 90-05-0100-A]

-M Puges, P Lehours, G. Martin-Blondel. Infections à *Campylobacters*. Pilly. Mise à jour à paraître 2024.

-P Lehours. Les infections à *H. pylori* : diagnostic et traitement. Journal de Biologie Médicale Volume 12-Numéro 47Oct Déc 2023

-Organisation et participation à des webinaires

-4 mai 2023 Webinaire SFM Remic's : intervention sur *H. pylori* (P Lehours)

-10 mai 2023 Webinaire de la Section Microbiologie des Aliments de la SFM pour *Campylobacters*

Philippe Lehours : Épidémiologie des infections humaines à *Campylobacters* en France

Jasmina Vidic : Sensitive detection of *Campylobacter* in chicken meat

Rute Matos : A journey through the world of RNases in *Campylobacter jejuni* (intervention en anglais)

-24 Octobre 2023 webinaire du CNRCH pour ses correspondants

Dr Sophie Anne Gibaud (Bactériologie, CHU de Nantes) : Adaptation de la PCR *H. pylori* R-biopharm sur automate BD Max : la parole aux utilisateurs.

Dr Sahel Wandji (Bactériologie, CHU de Bordeaux) : Identification des *Helicobacters* non-*pylori* sur spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker.

Pr Philippe Lehours et Dr Quentin Jehanne (CNRCH, CHU de Bordeaux) : Antibiogrammes des *Campylobacters* version 2.0 : place au résistome. (10 min)

-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 des feuilles de demande y sont annoncées. Ces documents sont téléchargeables. 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 en lien avec notre CNR est remercié ou bien associé aux communications et publications (congrès ou articles).

Prise de contact en Juillet 2023 par email et téléphone avec les adhérents Campy-Internet et nouvelle sensibilisation pour les saisies déclaratives en période estivale. Point avec chacun d'entre eux par P Lehours.

Envoi en Aout 2023 d'un courrier de sensibilisation à l'ensemble du réseau CNRCH accompagné du Bilan d'activités condensé du CNRCH 2022.

-Information/formation des professionnels de santé

Comme précédemment évoqué, notre site internet (www.cnrch.fr) est mis à jour le plus régulièrement possible.

Sur l'année 2023, le site a accueilli environ 3458 visiteurs dont 1910 nouveaux visiteurs qui ont vu plus de 11000 pages (en augmentation *versus* 2022).

L'augmentation de la fréquentation et du nombre de pages visitées est due à la mise en ligne du site Hélico-net au cours du deuxième semestre 2023, à la mise à jour des feuilles de renseignements ainsi qu'à l'affichage des webinaires organisés par ou avec le CNRCH.

Les pages les plus consultées sont :

- Page d'accueil et actualités : 35,3%
- Catalogue des actes : 17,5%
- Fiches techniques : 8%
- Contact : 4,83%
- Bilans et Publications : 3,15%

La majorité des visiteurs proviennent de régions francophones : France 88% dont 0,78 % pour les départements d'Outre-Mer, suivi par les pays du Maghreb 2,15%.

Les principales mises à jour du site internet du CNRCH en 2022 sont listées ci-dessous :

- mise à jour de la feuille de renseignements Souche *Campylobacter*
- mise à jour des feuilles de renseignements *Helicobacter pylori* Biopsie et Souche
- mise à jour des publications scientifiques relatives aux travaux du CNRCH
- mise en ligne 2023 de tutos et présentations numériques en lien avec l'activité du CNRCH
- mise en ligne 2023 des bilans d'activités CNRCH par Santé Publique France
- information auprès de nos correspondants sur les congrès spécialisés 2023 auxquels le CNRCH participe.

-Activités de conseil aux professionnels de santé.

Des appels téléphoniques ainsi que des courriels sont reçus régulièrement, pour des conseils thérapeutiques en cas d'infection systémique et de situations particulières ou pour des avis techniques. Une réponse est systématiquement donnée.

Comme chaque année, un bilan des emails et des appels téléphoniques a été réalisé par le secrétariat du CNRCH. Seuls les contacts pour conseils thérapeutiques et/ou techniques ont été répertoriés : 258 contacts (versus 227 en 2022), 98 par téléphone et 160 par email.

L'activité des contacts est, cette année encore, en augmentation de 14% par rapport à 2022 (+ 49% par rapport à 2021, année COVID). Les contacts furent majoritairement destinés aux conseils techniques pour 62 % des contacts et 38 % pour les conseils thérapeutiques.

P Lehours participe également à la RCP du Groupe d'Etudes Français des Hélicobacters (www.helicobacter.fr). En 2023, il a participé à l'analyse 73% des 182 dossiers soumis, soit 133 avis émis.

Les emails sont adressés soit directement aux biologistes du CNR soit *via* le système de messagerie intégrée au site internet. Dans ce dernier cas, les biologistes du CNR (P Lehours et M Jauvain) 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 discussion 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*, *Aliarcobacter*, et *H. pylori*. Mise à jour également des valeurs de CQ pour ces bactéries.

-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 ...)

Le CNR n'a pas été sollicité en 2023.

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

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

Pour *Campylobacter*

-Etude microbiologique et génomique de cas d'infections chroniques à *Campylobacters*

Depuis 2022, 3 cas de bactériémies récidivantes à *C. coli* ou *C. jejuni* font l'objet d'attention particulière. En effet, chez ces 3 patients, le nombre de souches envoyées au CNRCH est important et l'adaptation de celles-ci aux différentes thérapies antibiotiques est inquiétante.

Deux des trois cas avaient été décrits pour la première fois dans le rapport précédent. Nous complétons ici les analyses sur de nouvelles souches.

A) Patiente JB

Pour les deux premiers cas, il s'agit de patientes immunodéprimées soignées au CHU de Lyon (Croix Rousse). Lors du dernier rapport du CNRCH, 8 souches de *C. coli* (identiques) et 2 souches de *C. jejuni* (identiques) ont été décrites pour la première patiente. En 2023, 2 nouvelles souches de *C. coli* (CC09 et CC10) et 3 nouvelles souches de *C. jejuni* (CJ03, CJ04 et CJ05) ont été isolées chez cette patiente. De plus, en analysant les anciennes données du CNRCH, 2 souches de *C. jejuni* de 2014 isolées chez cette patiente ont été identifiées (CJX et CJY), portant ainsi le nombre total de souches de *Campylobacter* à 17. Des analyses NGS ont ainsi été effectuées dans le but de déterminer si, tout comme l'année précédente, ces infections répétées sont le fruit d'uniques souches capables de s'adapter aux différents antibiotiques.

Tableau. Récapitulatif des différentes souches reçues pour cette patiente.

	N. de souche	Date de p.	Période	Source	Score	ST	CC	MLST	cgST	Score
CC01	221021949801	14/02/2022	Fev 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,77%
CC02	231008918501	25/04/2022	Avr 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,33%
CC03	231011471201	16/05/2022	Mai 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,33%
CC04	231002210603	25/11/2022	Nov 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,40%
CC05	231002210604	25/11/2022	Nov 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,46%
CC06	231006443301	16/12/2022	Dec 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,40%
CC07	231006443301	16/12/2022	Dec 2022	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,48%
CC08	231006444301	06/01/2023	Jan 2023	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,40%
CC09	231042933701	10/03/2023	Mar 2023	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,40%
CC10	231044731401	26/04/2023	Avr 2023	Volaille	100%	825	828	33.39.30.82.113.47.17	42671/93527	34,33%
CJX	2014/0241	26/03/2014	Mar 2014	Ruminant	100%	21	21	2.1.1.3.2.1.5	48178	99,70%
CJY	2014/0279	26/03/2014	Mar 2014	Ruminant	100%	21	12324	2.1.790.3.2.1.5	102207	99,70%
CJ01	231011471202	16/05/2022	Mai 2022	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.0.3.2.1.5	67992/72410	88,16%
CJ02	221104386201	07/07/2022	Juil 2022	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.0.3.2.1.5	67992/72410	86,45%
CJ03	231044731402	24/06/2023	Avr 2023	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.0.3.2.1.5	67992/72410	88,01%
CJ04	231042934901	10/03/2023	Mar 2023	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.0.3.2.1.5	67992/72410	88,2%
CJ05	231042935401	31/03/2023	Mar 2023	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.0.3.2.1.5	67992/72410	88,01%

Source=source potentielle de contamination; ST=Sequence Type; CC=Clonal Complex; MLST=Multi-Locus Sequence Typing; cgST=core-genome Sequence Type.

Tableau. Récapitulatif des mécanismes de résistance aux antibiotiques détectés parmi les différentes souches.

											CMI Carbapénèmes (mg/L)															
	AMP			CIP			ERY			TET			GEN			AMC			ETP			IMI			MER	
CC01	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,125	S	0,125	S	0,023					
CC02	S		R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,125	S	0,094	S	0,023					
CC03	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,25	S	0,125	S	0,047					
CC04	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	S		S		S		S	S	1,5	S	0,125	S	0,125					
CC05	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	R	16S A1358G	S		S		S	S	1,5	S	0,125	S	0,5					
CC06	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	R	16S A1358G	S		S		S	S	0,75	S	0,125	S	0,094					
CC07	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	R	16S A1358G	S		R	3	S	S	0,094	S	0,19							
CC08	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	R	16S A1358G	S		S		S	S	0,064	S	0,094	S	0,016					
CC09	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,25	S	0,064	S	0,023					
CC10	S		R	GyrA T86I	S		R	tet(O)	S		S		R	2	S	S	0,064	S	0,19							
CJX	S		R	GyrA D90N	S		S		S		S		S		S	S	0,002	S	0,032	S	0,006					
CJY	R	OXA61 G63T	R	GyrA D90G	S		S		S		S		S		S	S	0,003	S	0,023	S	0,004					
CJ01	R	OXA61 G63T	R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,008	S	0,032	S	0,012					
CJ02	R	OXA61 G63T	R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,003	S	0,012	S	0,004					
CJ03	R	OXA61 G63T	R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S		S		S	S	0,008	S	0,023	S	0,006					
CJ04	R	OXA61 G63T	R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S															
CJ05	R	OXA61 G63T	R	GyrA T86I	R	23S A2075G	R	tet(O)	S		S															

Ici les deux nouvelles souches de *C. coli* ont perdu leur résistance à la gentamicine et les nouvelles souches de *C. jejuni* ont gardé le même profil de résistance.

L'analyse génomique et les données de résistance confirment la présence d'une unique souche de *C. coli* entre 2022 et 2023 et d'une souche différente de *C. jejuni* en 2014 par rapport aux souches de 2022 et 2023 (ou possiblement une souche qui a fortement évolué en presque 10 ans). De nouveaux épisodes de bactériémies chez cette patiente se sont produits fin 2023, et les données sont en cours d'analyse.

B) Patiente MHT

Le deuxième cas de bactériémie récidivante détectée au CHU de Lyon concerne des infections répétées à *C. coli*. Un total de 3 souches identiques a été analysé en 2022 et début 2023. Dans le courant de l'année 2023, 2 nouvelles souches prélevées chez cette patiente ont été envoyées au CNRCH (souches T04 et T05). Dans le but de comparer ces souches aux précédentes, les génomes ont été séquencés avec le séquenceur Iseq 100 disponible au laboratoire.

Tableau. Récapitulatif des différentes souches reçues pour cette patiente, dont les deux nouvelles, T04 et T05.

	N. de souche	Date de p.	Période	Sequencieur	Source	Score	ST	CC	MLST	cgST	Score
T01	2019/0916H	07/06/19	Juin 2019	HiSeq 4000	Porc	100%	n/a	n/a	0.38.30.82.104.35.17	42671/93527	21,82%
T02	221061398101	07/06/22	Juin 2022	NovaSeq	Porc	100%	n/a	n/a	0.38.30.82.104.35.17	42671/93527	21,74%
T03	231006427601	05/01/23	Jan 2023	Iseq 100	Porc	100%	n/a	n/a	0.38.30.82.104.35.17	42671/93527	21,59%
T04	231022286201	21/02/23	Fév 2023	Iseq 100	Porc	100%	n/a	n/a	0.38.30.82.104.35.17	42671/93527	21,74%
T05	231042937101	27/03/23	Mar 2023	Iseq 100	Porc	100%	n/a	n/a	62.38.30.82.104.35.17	42671/93527	21,22%

Source=source potentielle de contamination; ST=Sequence Type; CC=Clonal Complex; MLST=Multi-Locus Sequence Typing; cgST=core-genome Sequence Type.

Tableau. Récapitulatif des mécanismes de résistance aux antibiotiques détectés parmi les différentes souches.

												CMI Carbapénèmes (mg/L)											
	AMP			CIP			ERY			TET			GEN			AMC		ETP		IMI		MER	
T01	R	OXA61 G63T		R	GyrA T86I		R	23S A2075G		R	tet(O)		S			S		S	0,064	S	0,125	S	0,094
T02	R	OXA61 G63T		R	GyrA T86I		R	23S A2075G		R	tet(O)		S			S		S	0,047	S	0,094	S	0,047
T03	R	OXA61 G63T		R	GyrA T86I		R	23S A2075G		R	tet(O)		R	16S G1435T		R	?	R	>32	S	0,125	R	>32
T04	R	OXA61 G63T		R	GyrA T86I		R	23S A2075G		R	tet(O)		S			S		S	0,047	S	0,125	S	0,064
T05	R	OXA61 G63T		R	GyrA T86I		R	23S A2075G		R	tet(O)		R	16S G1435T		S		S	0,19	S	0,38	S	0,5

Les données issues des deux nouveaux génomes montrent bien qu'il s'agit une fois de plus de bactériémies causées par la même souche depuis 2019. La même source de contamination est identifiée (réservoir porcin) ainsi que le même core-genome Sequence Type (cgST). L'analyse par MLST diffère cependant légèrement pour la dernière souche : quelques mutations ont en effet été identifiées chez celle-ci par rapport aux précédentes.

Ce potentiel «hyper-mutateur» propre à *C. coli* et plus particulièrement à cette souche est ici probablement une stratégie « d'échappement » aux différents traitements antimicrobiens, comme le montre l'adaptation rapide aux aminoglycosides (gentamicine) avec la mutation G1435T dans l'ADNr 16S qui apparaît ou disparaît.

C) Patient JD

Un nouveau cas de bactériémies récidivantes à *C. jejuni* a été détecté chez un patient de Chalon-sur-Saône (Centre Hospitalier William Morey). Les infections chez ce patient ont débuté en Juillet 2022 puis deux souches ont été prélevées à 3 jours d'intervalle en Mai 2023. Les 3 génomes ont été séquencés avec le séquenceur Illumina Iseq 100 ou NovaSeq 6000 puis comparés entre eux.

Tableau. Récapitulatif des différentes souches reçues pour ce patient.

	N. de souche	Date de p.	Période	Séquenceur	Source	Score	ST	CC	MLST	cgST	Score
J01	231015840701	07/11/22	Juil. 2022	Iseq 100	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.1.3.141.1.6	Inconnu	79,75%
J02	231046735801	02/05/23	Mai 2023	NovaSeq	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.1.3.141.1.6	Inconnu	80,64%
J03	231047618201	05/05/23	Mai 2023	NovaSeq	Ruminant	100%	n/a	n/a	2.1.1.3.141.1.6	Inconnu	79,90%

Source=source potentielle de contamination; ST=Sequence Type; CC=Clonal Complex; MLST=Multi-Locus Sequence Typing; cgST=core-genome Sequence Type.

Tableau. Récapitulatif des mécanismes de résistance aux antibiotiques détectés parmi les différentes souches.

	AMP		CIP		ERY		TET		GEN	
J01	R	OXA61 A59G	R	GyrA T86I	R	23S C2627A + RplD G70D	S		S	
J02	R	OXA61 A61G	R	GyrA T86I	R	RplD G70D	S		S	
J03	R	OXA61 A61G	R	GyrA T86I	R	23S C2627G + RplD G70D	S		S	

Tout comme les deux cas précédents, on distingue ici la présence d'une seule et unique souche depuis 2022. La source de contamination est identique ainsi que le profil MLST et cgST. On peut également identifier un haut potentiel mutationnel avec l'apparition et disparition de marqueurs de résistance dans la séquence de l'ARN ribosomal 23S.

Ces différents cas de bactériémies récidivantes avec des souches au fort pouvoir adaptatif feront également l'objet d'une publication scientifique en 2024.

-Modélisation tridimensionnelle de la porine PorA impliquée dans la résistance aux carbapénèmes

Dans le cadre de l'étude d'infections récidivantes à *C. coli* et *C. jejuni* des deux patients du CHU de Lyon, nous avons détecté une insertion dans la séquence peptidique de la protéine PorA, protéine majeure de la membrane externe, des différents isolats prélevés. Nous nous sommes interrogés sur une éventuelle corrélation entre la mutation de cette protéine et la CMI observée pour les carbapénèmes, notamment l'ertapénème.

Nous nous sommes en particulier intéressés à la conformation tridimensionnelle de PorA. La protéine PorA chez *C. coli* et *C. jejuni* est donc un homo-trimère, composé donc de trois tonneaux β de 18 feuillets, d'une ancre permettant l'assemblage de ces monomères, et d'une zone de constriction où se fixent des ions calcium Ca^{2+} (Andrew Waterhouse *et al.*, 2018).

En modifiant la structure de cette protéine et en perturbant la capacité de l'ion calcium à se fixer dans cette zone de constriction, dont la charge est essentielle au transport d'antibiotiques, notamment, nous pourrions décrire le rôle et l'implication de chacune de ces mutations dans la résistance de ces souches aux carbapénèmes.

Avec plus de 600 séquences consensus générées à partir de génomes séquencés, représentant 256 séquences de PorA uniques, un programme permettant la modélisation automatique de ces protéines a été développé.

Ce programme se centre autour de l'interface de programmation de SWISS-MODEL, un service web de modélisation de protéines par homologie très complet, fournissant différents modèles et scores permettant d'évaluer la confiance et la précision de chaque modélisation. D'autres outils de prédiction de structure 3D ont été évalués, tels qu'AlphaFold, mais ses prédictions étant identiques aux modélisations obtenues par homologie et son automatisation étant plus complexe, SWISS-MODEL a été choisi.

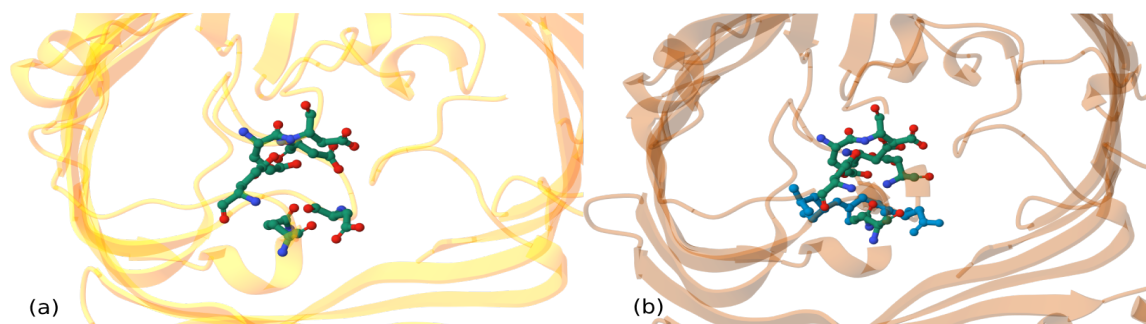


Figure. Représentation des structures protéiques de PorA.

Les résidus impliqués dans la fixation de l'ion calcium sont représentés en boules et bâtons (D116, D120, D155, E288, D289). Les deux structures représentées ont été séquencées à partir des souches d'un même patient présentant une infection récidivante à *C. jejuni* avec acquisition en 2023 une résistance aux carbapénèmes.

(a): Porine PorA de la souche isolée en 2022, sensible aux carbapénèmes; (b) Porine PorA de la souche isolée en 2023, avec une insertion de DGL en position 124, dont les résidus sont représentés en cyan.

Cette approche va nous permettre de mieux comprendre les différences naturelles de niveaux de CMI aux carbapénèmes entre souches.

-Finalisation de la description d'une nouvelle espèce proche de *Campylobacter lanienae*

En 2020 et 2022, les espèces de deux souches n'ont pas été identifiées avec certitude au MALDI-TOF, avec des scores proches mais non-significatifs (inférieurs à 2) pour *C. lanienae*. Le génome de ces deux souches a été séquencé afin d'identifier l'espèce avec plus de précision. Suite à de nombreuses analyses NGS non-significatives, à savoir l'alignement des gènes 16S et de la protéine GyrA, les analyses du génome entier ANI (Average Nucleotide Identity) et DDH (DNA-DNA Hybridization) et de l'étude de la séquence des gènes de virulence CDT (Cytotoxic Distending Toxin), il a été conclu qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce de *Campylobacter* proche de *C. lanienae* (résultats génomiques disponibles dans le rapport précédent du CNRCH). Cette nouvelle espèce a été nommée «*Campylobacter lutetiae*», en référence au nom latin de la ville où la souche a été isolée pour la première fois en France, Paris.

Une recherche bibliographique avait été effectuée en se basant sur quelques gènes composant le génome de cette nouvelle espèce pour identifier d'autres souches de celle-ci isolées aux USA en 2009 chez l'animal (chèvres et alpagas) et publiées dans l'étude suivante en 2017 : William G. Miller *et al.* «Comparative Genomic Analysis Identifies a *Campylobacter* Clade Deficient in Selenium Metabolism», *Genome Biology and Evolution*, <https://doi.org/10.1093/gbe/evx093>.

La publication associée décrivait des *Campylobacter*s également proches de *C. lanienae* pouvant être regroupés en 3 clades distincts, sans pour autant conclure à la présence d'une nouvelle espèce. Cette étude illustre qu'utiliser des méthodes traditionnelles d'identification de l'espèce qui ne se basent pas sur le génome dans son intégralité, tel l'alignement de séquences 16S, est source d'interprétations incertaines.

En plus des analyses génomiques, le CNRCH, en collaboration avec l'équipe INSERM U1312 de l'Université de Bordeaux et le professeur Victoria Korolik de l'université de Griffith (Australie), a en 2023 effectué une étude sur la toxicité de la bactérie en infectant des cellules épithéliales humaines (lignée Caco2 issue d'un adénocarcinome colorectal) lors d'expériences de co-cultures.

Ce travail complémentaire a montré un élargissement de la taille des noyaux ce qui est un signe représentatif d'une exposition à l'activité des CDT des *Campylobacters*.

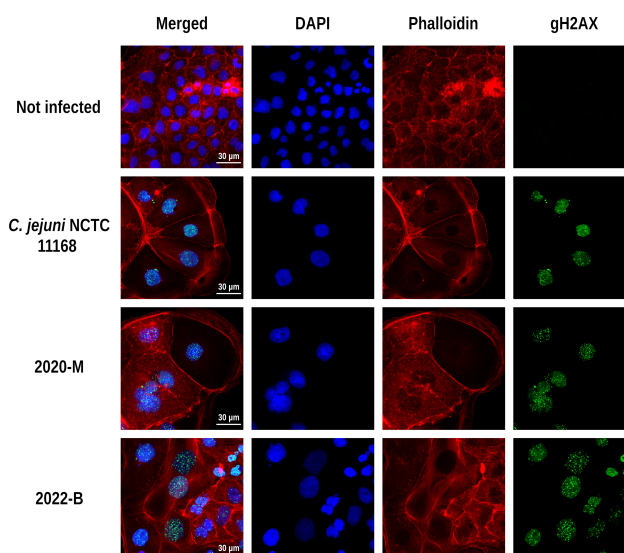


Figure. Résultats de l'expérience de co-culture. La fluorescence a été obtenue avec des anticorps primaires anti-gH2AX (vert), et des anticorps secondaires en complément de phalloïdine (rouge) et de DAPI (bleu) pour colorer respectivement les microfilaments d'actine et les noyaux. La ligne du haut montre les cellules Caco-2 non infectées.

Nous avons envoyé les deux isolats à deux collections de référence (Suède et France) et avons soumis l'article scientifique début 2024.

Pour *Helicobacter*

-Mise en place d'une détection dans des biopsies gastriques par NGS du résistome et du virulome de *H. pylori* :

En 2023, dans le but de continuer à développer les nouvelles technologies au CNRCH, un nouveau projet faisant appel au séquençage haut-débit a été initié avec pour objectif l'amplification d'un panel de gènes de *H. pylori* à partir de l'ADN extrait des biopsies reçues au CNRCH.

En collaboration avec la société Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA), cette technique dite de «DNA Capture» permet, en plus d'identifier ou non la présence du pathogène dans l'échantillon, de réaliser la détection de la résistance à plusieurs antibiotiques, d'effectuer un typage moléculaire, mais aussi d'identifier la virulence et ce sans avoir recours au séquençage du génome dans son intégralité.

C'est une technique qui pourrait à terme être appliquée systématiquement aux biopsies gastriques positives par PCR à *H. pylori* mais pour lesquelles la culture reste négative. Notre expérience montre que même si nous tentons de maîtriser les conditions préanalytiques et analytiques de transport et de culture de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques, 15-20% environ de biopsies positives en PCR restent négatives en culture.

En cas de résistance aux macrolides détectée par PCR, les cliniciens ne peuvent donc avoir accès au profil de sensibilité des autres antibiotiques utilisables dans le traitement d'éradication.

Parmi les gènes qui sont ciblés :

- 16S : utilisé pour la détermination de l'espèce ainsi que pour déterminer la résistance aux tétracyclines.
- 23S : certaines mutations (plus précisément aux positions 2142 et 2143) sont associées à la résistance aux macrolides.
- gyrA* : certaines mutations sont associées à la résistance aux fluoroquinolones.
- gyrB*, *hsp60* : peuvent être utilisés pour réaliser des analyses de phylogénie.

- vacA*, *cagA*, *htrA*: permettent d'étudier la virulence de la souche.
- pbp1* : certaines mutations peuvent être associées à la résistance à l'amoxicilline.
- rpoB* : certaines mutations peuvent être associées à la résistance à la rifampicine.
- frxA*, *fdxB*, *rdxA* : certaines mutations peuvent être associées à la résistance au métronidazole.
- atpA*, *mutY*, *yphC*, *ppa*, *efp*, *urel*, *trpC* : cette combinaison de gènes permet de réaliser l'analyse «MLST» (MultiLocus Sequence Typing), utilisée pour différencier les populations de *H. pylori* dans le monde.

L'adaptation de la stratégie « DNA Capture » en 2023 sur biopsie gastrique a été concluante. Quelques ajustements seront cependant nécessaires afin de disposer de résultats exploitables quelle que soit la concentration en *H. pylori* dans l'échantillon en particulier ceux avec des Ct tardifs (>30) en PCR. Ces données ont été présentées à l'oral lors du congrès de la RICAI 2023.

Nous allons proposer cette stratégie 2024 en routine à nos correspondants gastroentérologues et bactériologistes. Cette approche sera réservée aux patients en échecs de traitement avec une indication formelle d'éradication uniquement : ulcère, cancer gastrique localisé et lésion préneoplasique étendue, MALT et ATCD familiaux cancer gastrique de 1er degré.

Pour cela, une fiche de demande téléchargeable sur notre site internet est à envoyer complétée par mail à cnrch@chu-bordeaux.fr. Le CNRCH décidera en fonction des renseignements fournis si l'analyse NGS sera réalisée ou bien si le cas soumis sera orienté pour expertise vers la RCP du Groupe d'Etude Français des Hélicobacters.

L'analyse NGS sera réalisée, après l'envoi par un laboratoire d'analyses médicales au CNRCH :
 – soit sur ADN extrait de biopsie gastrique (envoi à température ambiante, +5°C ou -20°C).
 – soit sur reliquat de biopsie gastrique congelé (envoi à -20°C ou -80°C).
 L'analyse NGS pourra être réalisée également sur biopsies fraîches envoyées en milieu Portagerm Pylori (envoi à +5°C ou -20°C).

Si l'ensemble des conditions de réalisation de cette analyse sont réunies, l'analyse par NGS sera réalisée au prix d'une PCR temps réel *H. pylori* (B100 soit 25 euros).

-Evaluation rétrospective de cas d'infections à *Helicobacter* du groupe Heilmannii

Le CNR est régulièrement sollicité pour confirmer de potentielles infections gastriques à *Helicobacter* du groupe Heilmannii. Ces suspicions d'infections sont issues d'observations histologiques de bacilles très spiralés. En dehors de *H. pylori*, les bactéries du groupe Heilmannii (HH) qui infectent l'homme sont *H. bizzozeronii*, *H. felis*, *H. heilmannii sensu stricto*, *H. salomonis* et *H. suis*. Le CNR propose systématiquement suite à ces demandes d'envoyer au CNR les blocs en paraffine pour confirmer en interne le diagnostic.

Entre 2019 et 2023, six laboratoires ont envoyé au CNR un ou deux blocs en paraffine contenant un fragment de biopsie gastrique pour suspicion d'infection à HH. Le CNR a extrait l'ADN à partir de coupes issues des blocs avec le kit [QIAamp DNA FFPE Tissue Kit®](#) et a effectué deux PCR : une PCR en temps réel maison de détection de *H. pylori*, et une PCR conventionnelle 16S spécifique du genre *Helicobacter* pour identification bactérienne. Les PCR commerciales *H. pylori* de r-biopharm, Seegene et Mobidiag ont également été testées. Des amorces permettant le séquençage de la région de l'ADNr-23S et de la QRDR du *gyrA* des HH ont été utilisées afin de déterminer la présence de mutations potentiellement associées à la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones. En parallèle, des marquages par Immunohistochimie (IHC) et des colorations de GRAM ont été effectués.

Sur les 6 prélèvements, trois se sont révélés positifs à *H. pylori* par PCR en temps réel du CNR. Pour les 3 autres, le séquençage de l'ADNr-16S a permis d'identifier 2 *Helicobacter suis* et 1 *Helicobacter heilmannii sensu stricto*. Le séquençage de la région cible du 23S, classiquement décrite comme portant les mutations associées à la résistance aux macrolides, n'a pas identifié de mutation. Les colorations de GRAM et IHC pour les 3 blocs positifs à HH ont permis la visualisation de bacilles caractéristiques de ce groupe.

Ainsi, sur 6 cas de suspicion, seuls 3 cas d'infections à HH (2 *H. suis* et 1 *H. heilmannii* ss.) ont été confirmés, tous potentiellement sensibles aux macrolides. La PCR *H. pylori* du CNR ne croise pas avec ces HH contrairement aux PCR commerciales. Tout cas d'infection à HH diagnostiqué par histologie mérite d'être confirmé par biologie moléculaire dans des laboratoires spécialisés.

Nous remercions les biologistes du CH de Valenciennes (M Paluch, O Lesne) et du CHU de Lyon (Anne Gaelle Ranc, Tiphaine Gaillard, Hélène Salord, Yvonne Benito) pour cette collaboration.

Ces données ont été présentées à l'oral lors du congrès de la RICAI 2023.

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

Les noms des membres du CNR sont surlignés en gris. Les financements SPF du CNR sont systématiquement mentionnés dans les remerciements des publications nationales et internationales.

-Publications (n=8)

Publications internationales

-Roupie AL, Lafint E, Fraïtad S, Ferroni A, Boccara O, Bessède E, Lehours P, Lefrère F, Lortholary, O. Recurrent cellulitis revealing *Helicobacter cinaedi* bacteremia in a patient on Ibrutinab therapy. **Emerg Infect Dis.** 2023 Mar;29(3):640-641. doi: 10.3201/eid2903.221329.

-L Bénéjat A Ducournau, C Domingues Martins, E Bessède, P Lehours RIDA@GENE *Helicobacter pylori* PCR on the ELITe InGenius System. **Eur J Clin Microb Infect Dis** 2023 Mar 16. doi: 10.1007/s10096-023-04563-3.

-Tinézvez C, Lehours P, Ranc AG, Belaroussi Y, Cazanave C, Puges M, Velardo F, Dubois D, Neuwirth C, Pailhoriès H, Dorel M, Hery-Arnaud G, Join-Lambert O, Gras E, Corvec S, Codde C, Fournier D, Boijout H, Doat V, Bouard L, Lagneaux AS, Pichon M, Couzigou C, Letellier C, Lemaïgnen A, Bille E, Bérard X, Caradu C, Webster C, Neau D; Campylobacteremia Study Group. Multicenter Retrospective Study of Vascular Infections and Endocarditis Caused by *Campylobacter* spp., France. **Emerg Infect Dis.** 2023 Mar;29(3):484-492. doi: 10.3201/eid2903.221417. PMID: 36823023

-Gaspard Grouteau, Cédric Mignonat, Bruno Marchou, Guillaume Martin-Blondel, Olivier Glass, Claire Roubaud Baudron, Pauline Lansalot-Matras, Simon Alik, Laurent Balardy, Thomas De Nadaï, Lucie Bruhl, Quentin Jehanne, Alain Le Coustumier and Philippe Lehours. *Campylobacter fetus* foodborne illness outbreak in the elderly. **Front Microbiol.** 2023 Jul 6;14:1194243. doi: 10.3389/fmicb.2023.1194243. eCollection 2023.

-Alexandra Nunes, Mónica Oleastro, Frederico Alves, Nadia Liassine, David M Lowe, Lucie Bénéjat, Astrid Ducournau, Quentin Jehanne, Vítor Borges, João Paulo Gomes, Gauri Godbole, Philippe Lehours. Recurrent *Campylobacter jejuni* Infections with *In Vivo* Selection of Resistance to Macrolides and Carbapenems: Molecular Characterization of Resistance Determinants **Microbiol Spectr.** 2023 Jun 26;e0107023. doi: 10.1128/spectrum.01070-23.

- Merle S, Bland S, Bénéjat L, Ducournau A, Jehanne Q, Bessède E, Jauvain M, Heluwaert F, Lehours P. Description of a case of *Helicobacter pylori* infection with in vitro resistance to tetracycline: an exceptional event with no consequences? **Microb Drug Res.** 2023. Dec 7. doi: 10.1089/mdr.2023.0247. Online ahead of print. PMID: 38060816

- F Deforet, Q Jehanne, L Bénéjat, J Aptel, R Prat, C Desbiolles, A Ducournau, M Jauvain, R Bonnet, F Vandenesch, J Lemoine, P Lehours. A combined genomic-proteomic approach for the identification of a *Campylobacter coli* amoxicillin-clavulanic acid resistance mechanism in clinical isolates. **Front Microbiol** 2023. Nov 9;14:1285236. doi: 10.3389/fmicb.2023.1285236. eCollection 2023. PMID: 38029165

-Thorell K, Muñoz-Ramírez ZY, Wang D, Sandoval-Motta S, Boscolo Agostini R, Ghirotto S, Torres RC; HpGP Research Network; Falush D, Camargo MC, Rabkin CS. The *Helicobacter pylori* Genome Project: insights into *H. pylori* population structure from analysis of a worldwide collection of complete genomes. **Nat Commun.** 2023 Dec 11;14(1):8184. doi: 10.1038/s41467-023-43562-y. PMID: 38081806

En lien avec l'activité de recherche INSERM

-Sturm N, Lehours P, Genevay M, B. Huard. Spatial heterogeneity for APRIL production in the lower intestine. **J Leukoc Biol** 2023. Feb 7;qiad014. doi: 10.1093/leuko/qiad014. Online ahead of print. PMID: 36808499

-A Martin, E Bergsten, M Jauvain, V Demontan, P Lehours, C Barau, M Levy, C Rodriguez, I Sobhani, A Amiot. Gastric microbiota in patients with gastric MALT lymphoma according to *Helicobacter pylori* infection. **Clin Res Hepatol Gastroenterol.** 2023 Nov 17:102247. doi: 10.1016/j.clinre.2023.102247. Online ahead of print. PMID: 37981222

En lien avec l'activité de recherche hospitalière

-Gerard R, Lehours P, Boralevi F, Sarlangue J. Neonatal toxic shock syndrome-like exanthematous disease: A French case series. **Pediatr Dermatol.** 2023 Mar;40(2):349-351. doi: 10.1111/pde.15165. Epub 2022 Oct 28. PMID: 36305593

-Bothorel P., A. Patry, A. Labrunie, L. Renesme, P. Lehours, M. Benard, D. Dubois, L. Ponthier, S. Meyer, K. Norbert,

L. Villeneuve, P. Jouvencel, D. Leyssene, D. Chainier, S. Luce, C. Grélaud, M.C. Ploy, A. Bedu, F. Garnier. Dynamics of bacterial carriage and integron presence in gut of French preterm new-borns according to maternal colonization: the DAIR3N multicentric study. **Front Microbiol** 2023. Mar 14;14:1148319. doi: 10.3389/fmicb.2023.1148319. eCollection 2023. PMID: 36998410

-Puges M, Jauvain M, Vignals C, Dutronc H, Barthod L, Pereyre S, Lehours P, Cazanave C. Pseudomembranous necrotic pharyngotonsillitis: a microbiologic criminal conspiracy. **Clin Microbiol Infect**. 2023 Jun 2:S1198-743X(23)00259-8. doi: 10.1016/j.cmi.2023.05.035. Online ahead of print. PMID: 37271193

-Blanc P, Bonnet F, Leleux O, Perrier A, Bessède E, Pereyre S, Cazanave C, Neau D, Vareil MO, Lazaro E, Duffau P, Saunier A, André K, Wittkop L, Vandenhende MA; ANRS CO3 Aquivih-Nouvelle-Aquitaine Cohort Study Group. Severe Bacterial Non-AIDS Infections in Persons With Human Immunodeficiency Virus: The Epidemiology and Evolution of Antibiotic Resistance Over an 18-Year Period (2000-2017) in the ANRS CO3 Aquivih-Nouvelle-Aquitaine Cohort. **Clin Infect Dis**. 2023 May 24;76(10):1814-1821. doi: 10.1093/cid/ciac978. PMID: 36610063

Publications didactiques (n=2)

-P Lehours. Les infections à *H. pylori* : diagnostic et traitement. **Journal de Biologie Médicale** Volume 12-Numéro 47 / Oct-Déc 2023

-Bessède E, Mégraud F. Microbiota and gastric cancer. **Semin Cancer Biol**. 2022 Nov;86(Pt 3):11-17. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.05.001. Epub 2022 May 6. PMID: 35533800

-Chapitres de livres (n=1)

-P Lehours. Infections à *Campylobacter*. EMC - Biologie médicale 2023:1-10 [Article 90-05-0100-A]

-Communications nationales

Oraux

-M Jauvain. Effets de *Lactobacillus* spp. sur la carcinogenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori* » Congrès du Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), 21 mars 2023 (Strasbourg)

-M Jauvain, G Lepied, C Varon, P Lehours, E Bessède. Study of *Lactobacillus* spp. effects on gastric carcinogenesis in the context of *Helicobacter pylori* infection » Microbiology Day, 16 mai 2023, Univ. Bordeaux

-M Jauvain, G Lepied, C Varon, P Lehours, E Bessède. Effets de *Lactobacillus* spp. sur la carcinogenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori* » 21^{ème} congrès Groupe d'Etudes Français des Helicobacter (GEFH), 15 juin 2023 (Lille)

- Bruhl L, Sifré E, Ducournau A, Aptel J, Giese A, Jehanne Q, Jauvain M, Bessède E, Lehours P. Heilmannii or not Heilmannii, telle est la question. 21^{ème} congrès Groupe d'Etudes Français des Helicobacter (GEFH), 15 juin 2023 (Lille)

-Heluwaert F, Merle S, Bland S, Bruhl L, Ducournau A, Bessède E, Jauvain M, Lehours P. Un événement exceptionnel : description d'un cas d'infection à *H. pylori* résistant à la tétracycline. 21^{ème} congrès Groupe d'Etudes Français des Helicobacter (GEFH), 15 juin 2023 (Lille)

-M Jauvain. Une endocardite à *Klebsiella pneumoniae* hypervirulente » (flash présentation) Journée scientifique du pôle de Biologie Pathologie, 19 octobre 2023, CHU de Bordeaux

-P Lehours. Épidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* en France : données 2017-2021. JFHOD 2023, Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD) 2023 (16 au 19 mars 2023) Paris.

-Bénéjat L, Sifré E, Ducournau A, Aptel J, Giese A, Jehanne Q, Jauvain M, Bessède E, Lehours P. Infection à *H. pylori* ou à *Helicobacter* du groupe Heilmannii ? Six cas concrets. RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

-Jehanne Q, Bénéjat L, Ducournau A, Aptel J, Jauvain M, Bessède E, Lehours P. Emergence en France des méthylases bactériennes associées à la résistance à l'érythromycine chez *Campylobacter* sp ? RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

Posters

-M. Jauvain, G. Lepied, C. Varon, P. Lehours, E. Bessède. «Study of probiotics effects on gastric carcinogenesis in the context of *H. pylori* infection » Doctoral School Day, 25 avril 2023 (Bordeaux)

-M. Jauvain, G. Lepied, C. Varon, P. Lehours, E. Bessède. « Effets de *Lactobacillus* spp. sur la carcinogenèse gastrique induite par *Helicobacter pylori* » Congrès de la Société Française de Microbiologie, 4-6 octobre 2023 (Rennes)

-F Deforet, Q Jehanne, L Bénéjat, R Prat, C Desbiolles, A Ducournau, R Bonnet, F Vandenesch, J Lemoine, P Lehours. Identification of *Campylobacter* amoxicillin-clavulanic acid resistance mechanism using genomics and proteomics. ECCMID 2023 (15-18 avril). Congrès de la Société Française de Microbiologie, 4-6 octobre 2023 (Rennes)

-Bruhl L, Sifré E, Ducournau A, Aptel J, Giese A, Jehanne Q, Jauvain M, Bessède E, Lehours P. Heilmannii or not Heilmannii, telle est la question. Congrès de la Société Française de Microbiologie, 4-6 octobre 2023 (Rennes)

-S. Wandji, L. Bénéjat, A. Ducournau, J. Aptel, M. Jauvain, E. Bessède, Q. Jehanne, P. Lehours. « Caractérisation

microbiologique et génomique des *Helicobacters non-pylori*» RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

-Q. Jehanne, R. Nové Josserand, N. Bénéch, A. Conrad, C. Levi, L. Gillet, L. Bénéjat, A. Ducournau, J. Aptel, M. Jauvain, E. Bessède, E. Beausoleil, O. Dauwalder, P. Lehours. « Infections récurrentes à *C. jejuni* et *C. coli* : apport de la génomique dans la caractérisation de deux cas » RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

-L. Bénéjat, A. Ducournau, S. Zaffraya, D. Robert, E. Bessède, M. Jauvain, P. Lehours. « Evaluation des performances du kit GI Bacterial PLUS ELITE MGB® dans le diagnostic des infections bactériennes intestinales » RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

-Communications internationales

Oraux

-PL Maunet, L. Gillet, L. Bénéjat, A. Ducournau, M. Jauvain, E. Bessède, Q. Jehanne, P. Lehours. Study of the resistome and virulome of *H. pylori* by NGS approach using DNA Capture technology. Congrès HGSC 2023 (2-5 déc.) Beilngries, Germany.

-M. Jauvain, G. Lepied, C. Varon, P. Lehours, E. Bessède. Study of *Lactobacillus* spp. effects on gastric carcinogenesis in the context of *Helicobacter pylori* infection » European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), 8 septembre 2023 (Anvers)

-Q. Jehanne. Présentation des activités NGS du CNRCH lors du meeting annuel du projet européen FWD AMR Ref LAB Cap (26 avril 2023, Copenhague, Danemark).

Posters

-FJ Martínez-Martínez, A. Chiner-Oms, V. Furió, HpGP Research Network, Y. Yamaoka, JP Dekker, F. Mégraud, M. Constanza Camargo, I. Comas, P. Lehours. Genomic determinants of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* treatment and surveillance. XXXVIth Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group (7-9 sept) Antwerp, Belgium.

-F. Deforet, Q. Jehanne, L. Bénéjat, R. Prat, C. Desbiolles, A. Ducournau, R. Bonnet, F. Vandenesch, J. Lemoine, P. Lehours. Identification of *Campylobacter* amoxicillin-clavulanic acid resistance mechanism using genomics and proteomics. ECCMID 2023 (15-18 avril). Copenhagen, Danemark.

Les communications ayant un lien avec une activité recherche à cheval entre le CNR et l'équipe INSERM U1312 « Infection à *Helicobacter* : inflammation et cancer » ne sont pas mentionnées mais peuvent être fournies sur demande.

-Conférences sur invitations des membres du CNRCH

-P. Lehours

-Symposium ELITechGroup : Nouvelle approche cost-effective des tests GI. Symposium Elitech. RICAI, 18-19 décembre 2023 (Paris)

-E. Bessède

-Gastric cancer and microbiota. XXXVIth Workshop of the European Helicobacter & Microbiota Study Group (7-9 sept) Antwerp, Belgium.

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

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

Le CNR a entretenu comme par le passé ses collaborations avec le LNR *Campylobacter* (ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, collaborateurs ; M Chemaly, M Denis, K Rivoal) via le partage de souches, la participation à des comités de thèse, et l'organisation de colloques scientifiques (journées communes LNR-CNR).

P Lehours signale à l'ANSES de Ploufragan (Mme Tardy Florence, Unité Mycoplasmodologie Bactériologie Antibiorésistance) l'émergence de tout nouveau mécanisme de résistance telle que l'identification d'une nouvelle méthylase chez *C. coli* associée à la résistance aux macrolides. La séquence des amorces et un ADN témoin positif, permettant d'effectuer un screening PCR de ce nouveau gène, leur ont été envoyés. Cela permet dorénavant à l'ANSES d'effectuer en routine un « screening » PCR sur leurs souches. Ceci pourra être reconduit si d'autres mécanismes sont identifiés au cours du prochain contrat.

Nous avons déposé fin 2023 un nouveau projet collaboratif avec ces équipes : Projet CAMPYSEQ-Impact du processus de production et d'analyse des séquences de génomes entiers de *Campylobacter* sur le génotypage des souches et leur regroupement au sein de clusters en vue de l'investigation de cas groupés de campylobactériose humaine.

Ce projet a été validé par la Direction Scientifique des Programmes de l'ANSES. Il débutera en 2024 et consistera à comparer un ensemble de souches de *C. jejuni* et *C. coli* d'origines humaines et vétérinaires en provenance des deux centres (CNRCH et LNR, respectivement) afin d'harmoniser les méthodes et analyses NGS et de détecter la présence de clones bactériens et mécanismes de résistance ou virulence au sein de ces deux réservoirs. Si cette approche porte ses fruits, elle s'inscrira dans un cadre plus global de surveillance aux contaminations alimentaires en France, notamment lors d'événements majeurs comme les JO 2024 à Paris.

Ce projet sera divisé en deux principales tâches :

-Tâche 1 : évaluation de l'impact des différents processus de production des données de séquençage et des outils d'analyses sur le clustering d'un panel de souches de *Campylobacter*. L'objectif de cette partie consistera à comparer la méthodologie employée par les deux centres pour séquencer les *Campylobacter*. Pour ce faire, un panel de 16 souches sera créé à partir de : 8 souches humaines du CNRCH (6 *C. jejuni* et 2 *C. coli*) ; 8 souches vétérinaires du LNR (6 *C. jejuni* et 2 *C. coli*)

Chaque laboratoire générera les 16 génomes à partir de 2 méthodes d'extraction d'ADN et 2 méthodes de séquençage différentes. Les génomes obtenus seront ensuite comparés entre les deux centres afin d'observer les disparités. Les différences de méthodologies au niveau de la paillasse (ou « wet-lab ») auront ici une forte importance.

-Tâche 2 : évaluation de l'impact des outils/schémas de génotypage utilisés pour la caractérisation des souches sur le clustering d'un jeu de données de séquençage de *Campylobacter* préalablement séquencé. Il sera ici question d'évaluer les différences au niveau « dry-lab », c'est-à-dire les analyses bioinformatiques, à partir de génomes de *Campylobacter* représentatifs des souches circulant chez les animaux et isolées chez l'homme lors d'infections. Le nombre de souches à analyser sera plus conséquent mais n'est pas encore défini.

Les principales personnes impliquées dans ce projet sont : Amandine Thépault, Philippe Lehours, Gwenaëlle Mourand, Florence Tardy, Quentin Jehanne, Lucie Bruhl, Astrid Ducournau, Johanna Aptel, Arnaud Felten, Linda Ducret, Martine Denis et Marianne Chemaly.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

-Projets 2023-2024 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. Des contacts ont déjà été pris avec les laboratoires Eurobio, rbiopharm etc...

-Continuer à élargir notre réseau de correspondants afin d'intégrer plus de laboratoires participants. Les CHU, CHG et laboratoires privés seront contactés. Notre objectif est de continuer à ne pas dépasser 6000 souches étudiées par an afin de libérer du temps technicien au développement d'autres projets notamment NGS et d'évaluation de nouvelles techniques.

-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.

-Nous avons entamé une analyse rétrospective des données cliniques et épidémiologiques des infections à *Aliarcobacter spp.*, à partir d'archives des années passées (2012-2022), afin de clarifier l'origine de ces infections et d'éventuels facteurs de risque prédisposant. Ce projet n'a pu être achevé en 2023 (départ en congés maternité de M Jauvain). SPF semble intéressé à intégrer dans les bilans annuels rédigés en commun, ces infections qui étaient jusqu'à présent exclues de ces analyses.

-Continuer à mettre à jour et enrichir notre base maison du MALDI-TOF afin d'intégrer toutes nouvelles espèces de *Campylobacter sp.*, *Aliarcobacter sp.* (et *Helicobacter sp.*).

-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 *Hélicobacters*.

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

-Faire accréditer par le COFRAC, la culture et les antibiogrammes de *H. pylori*, la recherche des antigènes dans les selles de *H. pylori* et la sérologie *C. jejuni*.

-Continuer à collaborer avec le CA-SFM pour la mise à jour annuelle des recommandations.

-Projets 2023-2024 concernant *H. pylori* et les *Hélicobacters* (hors NGS)

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

-Continuer le déploiement du réseau Hélico-net afin d'élargir encore la surveillance épidémiologique des infections à *H. pylori* en France ainsi que l'émergence de résistances aux antibiotiques.

-Participer à l'évaluation de tout nouveau kit de diagnostic (recherche d'antigènes, nouveaux kits ELISA etc...) ou PCR pour recherche de *H. pylori*. Des contacts industriels sont en cours (Dendris, Servibio, AUS Diagnostics).

-Continuer à former à la demande, tout personnel (biologiste, technicien, étudiants français ou étrangers...) au diagnostic bactériologique des infections à *H. pylori*. Une séance de formation est prévue en mars 2024 pour des techniciens du CHU de Lyon et en avril 2024 pour les biologistes du laboratoire Biomnis Lyon.

-Faire accréditer par le COFRAC la culture et les antibiogrammes de *H. pylori* ainsi que la recherche d'antigènes dans les selles.

-Suivre l'épidémiologie de l'infection à *H. pylori* en Guyane Française (projet en cours de validation avec le CH de Cayenne).

-Finaliser conjointement avec IG Boneca, Institut Pasteur Paris, le projet en cours depuis 2021 de caractérisation des mutations responsables dans *pbp1* de la résistance à l'amoxicilline chez *H. pylori*.

-Finaliser l'écriture d'articles scientifiques en lien avec le projet collaboratif NIH (Washington, USA) concernant la caractérisation génotypique de souches de *H. pylori* provenant de toutes les régions du Monde (résistome).

-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 *H.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 pour *Campylobacter*

Mis en place en routine de l'évaluation par NGS du résistome des souches de *Campylobacter sp*

Dès le début 2024, nous avons mis en routine l'analyse du résistome de *Campylobacter* pour les laboratoires nous faisant parvenir des souches déjà identifiées et antibiogrammées. Le CHU fera paraître en 2024 un AO pour contractualiser ces séquençages sur une plateforme adaptée.

Toute discordance entre les données phénotypiques fournies par nos correspondants et génotypiques obtenues par NGS seront contrôlées et signalées.

Cette approche nous permettra d'augmenter considérablement notre banque de génomes afin de pouvoir réaliser des analyses épidémiologiques supplémentaires et plus pertinentes.

Nous pourrions également identifier et repérer l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance chez *Campylobacter*.

Nous prévoyons de séquencer entre 2000 et 2500 souches de *Campylobacters* ou bactéries apparentées.

Autres projets NGS :

En parallèle de la mise en place en routine du séquençage des *Campylobacters* nous continuerons :

- d'analyser régulièrement les génomes de souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *H. pylori* résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques ;
- d'analyser par NGS 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 ;
- de caractériser par NGS tout phénotype de résistance inhabituel.

Evolutions de la plateforme génomique du CNRCH

Plusieurs projets et améliorations sont également prévus pour le courant de l'année :

-ré-analyser les anciennes souches séquencées au CNRCH avec la version 2024 du pipeline, c'est-à-dire un total de 1438 génomes. En effet, ces derniers ont été analysés avec des versions obsolètes du pipeline et les résultats doivent être confirmés ou améliorés avec la version la plus récente.

-développer le cgMLST pour *C. coli* : bien qu'exploitable, l'analyse cgMLST *C. jejuni* utilisée sur *C. coli* apporte des résultats incomplets et un nouveau schéma de gènes spécifiquement dédié à *C. coli* doit être implémenté dans le pipeline.

-intégrer et stocker de manière plus fluide les résultats : en lien avec le développement de la plateforme de données NGS développée par Léo Gillet, les résultats obtenus par le pipeline devront automatiquement alimenter la base de données de ce projet. De plus, des sauvegardes des données NGS (brutes ou finales) ainsi que du code du pipeline devront être périodiquement effectuées.

Standardisation des stratégies NGS

Nous continuerons comme par le passé à répondre favorablement à toute demande émanant notamment de l'ECDC, à participer à des groupes d'expertise pour la standardisation des stratégies NGS pour *Campylobacter sp* ainsi qu'à l'utilisation et l'actualisation des bases de données génomiques utilisées dans les pipelines bio-informatiques.

Nous entretenons également des liens étroits avec le CNR du Portugal et échangeons régulièrement avec eux sur l'émergence de nouveaux ST ou mécanisme de résistance.

Augmenter la puissance du matériel informatique

Actuellement, le poste informatique utilisé pour mettre en route le pipeline d'analyse NGS est composé de 16Go de mémoire vive et un processeur de 8 cœurs. Ces ressources sont suffisantes pour analyser une à une les différentes souches séquencées mais ne permettent pas de raccourcir le temps de l'analyse (actuellement de l'ordre d'environ 25 minutes par génome) ni de réaliser des analyses plus poussées notamment dans le cadre de travaux de recherche. De plus, lorsque plusieurs utilisateurs sont connectés à cette même machine, le risque de dysfonctionnement augmente.

Il est ainsi nécessaire d'augmenter la puissance de calcul dans le but de traiter le plus «sereinement» possible le flux important de données NGS prévu pour l'année 2024 et les années à venir. Le poste informatique prévu pour répondre aux besoins actuels et futurs serait composé d'un processeur Intel Core i9-13900 vPro 13ème génération et de 128Go de mémoire vive (x8 par rapport au poste actuel). De plus, une carte graphique du type NVIDIA RTX A2000 avec 12Go de mémoire vidéo dédiée est envisagée. Ces différents composants répondront donc aux besoins et projets suivants :

- repasser toutes les souches séquencées depuis 2017 dans la nouvelle version du pipeline dans le but d'obtenir des résultats plus précis.

- mettre en place le pipeline 2024 pour qu'il soit plus rapide et fluide dans les analyses et le rendu des résultats.

- mettre en «live» la plateforme de données NGS.

- réaliser des travaux de recherche nécessitant une haute puissance de calcul plus particulièrement les travaux sur l'intelligence artificielle et la représentation 3D de protéines.

Projets NGS en lien avec les infections à *H. pylori*

-Mise en place début 2024 de la stratégie NGS de DNA Capture sur biopsies gastriques

Cf plus haut dans ce rapport

-NGS appliquée aux souches de *H. pylori*

Nos travaux collaboratifs européens et avec le National Institute of Health (NIH) démontrent la bonne corrélation pour *H. pylori* entre génotype et phénotype de sensibilité. Les mutations associées à la résistance aux macrolides, quinolones et tétracyclines sont bien connues. Celles associées à la résistance à l'amoxicilline et au métronidazole sont identifiées mais leur association avec la résistance *in vitro* est toujours sujet à des incertitudes d'interprétation.

Le CNRCH continuera à séquencer toute souche présentant une résistance rare (rifampicine, tétracycline, amoxicilline).

Nous pourrions, à la demande, participer à caractériser par NGS le virulome des souches isolées ou reçues (*cagPAI* et *vacA* notamment) et à typer par MLST les souches reçues.

Cent souches pourront être séquencées annuellement en routine au CNRCH et gratuitement.

Activités de conseil, formation et information

Comme lors du précédent contrat, le CNRCH continuera à organiser des séminaires en distanciel (au minimum 2/an) à destination de nos correspondants et 1 fois par an en présentiel sous la forme de conférences d'actualisation (à Bordeaux ou à Paris) ou de travaux pratiques organisés à Bordeaux.

Nous continuerons à répondre par téléphone ou par mail à toute demande de conseil à nos correspondants microbiologistes ou cliniciens.

Une veille de notre site internet est et sera effectuée par le personnel du CNR pour maintenir à jour et sous leur dernière version :

- les fiches d'envoi sous forme téléchargeable en format PDF ;
- les recommandations de réalisation des antibiogrammes ;
- nos publications les plus récentes ou tout document de vulgarisation disponibles à la diffusion publique ;
- les annonces de formations organisées par le CNRCH ;
- les annonces de congrès.

Nous continuerons à répondre aux demandes des médecins et du public, à recevoir des stagiaires, à donner des conférences et à publier des articles de vulgarisation dans des journaux nationaux et internationaux.

Nous continuerons, en collaboration avec le Groupe d'Etude Français des Hélicobacters, à faire évoluer les recommandations françaises de diagnostic et de prise en charge des infections à *H. pylori*.

Notre CNR continuera à participer à l'organisation scientifique de congrès microbiologiques et cliniques en lien avec nos activités. Nous continuerons à accepter toutes sollicitations d'organisation de congrès.

Nos correspondants ayant accepté de figurer sur ce rapport en tant que partenaires du CNR et membres du dispositif de surveillance des infections à Campylobacters et-ou Helicobacter

Plateau technique de Microbiologie OUILAB Biosphère	Laboratoire Eurofins Biomnis, Lyon, France
Laboratoire Interlabo-Unilabs	Laboratoire Bioesterel-Biogroup
Laboratoire Biopteam, Bourg en Bresse	Laboratoire de Microbiologie Clinique, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades AP-HP Centre Paris
Laboratoires de Biologie Médicale B2A	Laboratoire de Microbiologie, Hôpitaux Civils de Colmar
Biomedlab66	Laboratoire de Microbiologie, CHRU de Nancy
Groupeement Biologique des Carnes, Caen	Laboratoire du GHT Lorraine-Nord, Metz
MEDILAB-Group	Centre de Biologie Nord Yonne, CH de Sens
Laboratoire Ouilab Biosmose IDF	Laboratoire BIO 86
Centre de Biologie Médicale, Le Chesnay	Laboratoire de Biologie, Hôpital Saint-Joseph Saint-Luc Lyon
CERBALLANCE Martinique	BIO-VSM LAB
Laboratoire Inovie CBM	Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Inter Communal Nord-Ardenne
Laboratoire Synlab Bioliance	Bactériologie bi site Saint-Louis Lariboisière, Laboratoire associé au CNR des IST bactériennes, Paris
Laboratoire de Biologie Médicale NOVABIO	Laboratoire de microbiologie -Centre Hospitalier de Valenciennes
Laboratoire de Biologie Médicale, Biopole, Pau	Service de Bactériologie-Hygiène, Centre de Biologie Pathologique Génétique, CHU de Lille
Cerballiance Ariège	Laborizon Centre Biogroup
Laboratoire Delest Dubos, Landes	Laboratoire du CHI Elbeuf-Louviers- Val de Reuil
Laboratoire de Biologie Médicale de Saint-Benoît, île de La Réunion	Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Pierre Oudot, Groupement Hospitalier Nord-Dauphiné
Laboratoires Mlab	Laboratoire Centre Hospitalier de Cholet
Laboratoire Océalab, Vannes	Service de Biologie, Centre Hospitalier d'Antibes Juan Les Pins
Laboratoire du Centre Hospitalier d'Alès-Cévennes, Gard	Laboratoire du Centre Hospitalier de Dax-Côte d'argent
Laboratoire de Biologie Médicale, CH d'Angoulême	Département des agents infectieux, U1070 PHAR2 INSERM, Université de Poitiers, CHU de Poitiers
Laboratoire Inter Hospitalier de Biologie d'Aubagne, La Ciotat	Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier d'Avignon
Laboratoire de Biologie Médicale du Centre Hospitalier d'Ardèche Méridionale, Aubenas	Synlab Auvergne
Laboratoire d'Avranches, GHT Mont-Saint-Michel	BIOPTIMA
Laboratoire du Centre Hospitalier Bagnols-sur-Cèze, Hôpital Louis Pasteur	Service de Microbiologie du centre Hospitalier Intercommunal Aix-Pertuis
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Besançon	Laboratoire du Centre Hospitalier d'Albi
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Brest	Unité de Bactériologie, Département de Prévention, Diagnostic et Traitement des Infections, GHU Henri Mondor, Créteil
GCS hospitalier Ingres Quercy, CH de Cahors	Unité de Bactériologie et Hygiène hospitalière, Hôpital Trouseau, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène CHRU de Tours
Laboratoire du Centre Hospitalier de Cambrai	GCS Biologie 85
Laboratoire de Biologie Médicale, CH de Grasse	Service de Biologie Clinique, Hôpital Foch, Suresnes
Laboratoire de Biologie Médicale, CH de Guéret	Laboratoire BIOXA
Service de Biologie Médicale CH Sud Gironde - Site de Langon	LBM Bioalliance, réseau SYNLAB France
GCS de la Mayenne	GHT Yvelines Nord, CHI de Poissy
Laboratoire de Microbiologie, Pôle Biologie Pathologie, CH Le Mans	Laboratoire de Biologie Médicale - Centre Hospitalier Métropole Savoie
Laboratoire du Groupe Hospitalier Bretagne Sud, Lorient	CHU de Rennes - Hôpital Pontchaillou - Service de Bactériologie - Hygiène hospitalière
Laboratoire de Bactériologie - Virologie - Hygiène, CHU de Limoges	Service de Bactériologie - Hygiène, CHU de Toulouse
Plateau de microbiologie - Instituts des Agents Infectieux - Hospices Civils de Lyon	Laboratoire du Centre Hospitalier des Pays de Morlaix
Laboratoire CH de Mayotte	Laboratoire du Centre Hospitalier d'Abbeville
Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital François Quesnay, Mantes-La-Jolie	Laboratoire de Bactériologie et Contrôles microbiologiques du CHU de Nantes
Laboratoire de Bactériologie, CHU de Montpellier	Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de REIMS
Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Archet, CHU de Nice	Centre Hospitalier Mémorial France Etats-Unis de Saint-Lô
Laboratoire Inter Hospitalier de Biologie de Vaulseuse, CH d'Orange	Laboratoire du Centre Hospitalier de Boulogne-sur-Mer
Laboratoire de Microbiologie, CHU d'Orléans	Laboratoire Biogroup SELAS CBM 25
Institut Louis Malardé, Papeete	Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Hôpital Bretonneau CHRU de Tours
Laboratoire de Bactériologie, Pr L. Armand, CHU Bichat Claude Bernard, Paris	Laboratoire Commun de Biologie du GHT Béarn et Soule, plateau technique de Microbiologie Est, CH de Pau
Laboratoire de Biologie Médicale de l'Union Hospitalière de Cornouailles	Laboratoire Unilabs Biolab, Chalon sur Saône
Laboratoire du Centre Hospitalier de Saint-Brieuc, Paimpol et Tréguier	LBM Synlab SYLAB
Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, Laboratoire de Bactériologie, CHU de Saint-Étienne	Laboratoire Synlab Provence, Maison médicale de Provence, plateau diagnostic maladies infectieuses, Aix-en-Provence
Laboratoire de Biologie, CH Tarbes et Lourdes	Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier de Troyes
Laboratoire de Bactériologie et Hygiène hospitalière, CHU Grenoble Alpes	Laboratoire du Centre Hospitalier de Saumur
Laboratoire de Biologie du Grand Hôpital de l'Est Francilien	Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Créteil
Inovie Labosud	Groupeement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille
Service de Bactériologie-Hygiène, CHU de Bicêtre	Laboratoire de Bactériologie - Centre Hospitalier de Cayenne

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Rappelez ici les informations suivantes (pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature) en les mettant si nécessaire à jour :

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Les missions du CNR n'ont pas évolué par rapport au dossier de candidature de renouvellement du CNR.

Le CNR Campylobacter et Helicobacter s'engage 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 de mars 2022 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.

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

Pour Campylobacter

1. 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 Campylobacter et Helicobacter 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 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.

2. Conseil

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

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

- en 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.

4. Contribution à l'alerte

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

Pour Helicobacter

1. 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.

2. Conseil

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

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique
- en surveillant la résistance aux antibiotiques des souches.

4. Contribution à l'alerte
- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Organisation générale

La responsabilité scientifique du CNR des *Campylobacters* et des *Hélicobacters* est portée par le Pr Philippe Lehours. Il est secondé par le Dr Marine Jauvain (AHU au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux).

Conformément à notre dossier de candidature :

- la gestion du CNR restera au CHU de Bordeaux ;
- les stratégies de séquençage haut débit de génomes bactériens et l'utilisation d'outils bioinformatiques innovants vont continuer leur développement ;
- la surveillance épidémiologique en lien avec l'agence nationale de santé publique qui a toujours constitué le cœur de l'activité du CNRCH est reconduite grâce au réseau des correspondants de laboratoires privés et hospitaliers historiquement construit.

Notre CNR est administrativement et géographiquement basé sur un site unique, le CHU de Bordeaux, qui assurera l'ensemble des missions.

Ressources humaines

-Responsables scientifiques

Philippe Lehours, 55 ans, Pharmacien Biologiste (PU-PH) (ETPT : 0,2). P Lehours a commencé à s'intéresser aux bactéries des genres *Campylobacter*/*Helicobacter* en novembre 1999 lors de sa prise de fonction au CHU de Bordeaux. Il a été désigné comme responsable adjoint dès 2004 puis est devenu en 2017 directeur scientifique lors du départ du Pr F Mégraud.

-Personnel scientifique et technique affecté au CNR

Lucie Bénéjat, 41 ans, Master 2, Ingénieur hospitalière, (ETPT : 1), recrutée en 2011. Elle est responsable du développement technologique notamment moléculaire. A ce titre, elle réalise la PCR de routine de détection de *H. pylori* et le typage moléculaire des souches de *Campylobacters* en cas de suspicion de cas groupés. Elle a développé au cours du dernier contrat une expertise en analyse de spectres obtenus par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Elle est la référente biologie moléculaire du CNRCH et référente qualité (CAQ). L Bénéjat encadre les stagiaires au CNR, supervise le personnel technique.

Quentin Jehanne, 33 ans, Ingénieur hospitalier, PhD, bioinformaticien, CDI, ETPT : 1) qui a en charge toutes les analyses bioinformatiques en lien avec les projets de séquençage de génomes bactériens.

Astrid Ducournau, 32 ans, Technicienne hospitalière, CDI (ETPT : 1) a été recrutée en 2013. Elle participe au travail de routine (identification, antibiogramme, biologie moléculaire), aux différents protocoles en cours ainsi qu'au maintien des documents qualité. Elle est depuis 2023 CAQ.

Johanna Aptel, 24 ans, Technicienne hospitalière, CDD (ETPT : 1) a été recrutée en 2022 suite au départ de Marine Bouhier. Elle participe au travail de routine (identification, antibiogramme, biologie moléculaire) ainsi qu'aux différents protocoles en cours.

Marie Taymont, 36 ans, Technicienne hospitalière, CDD (ETPT : 0,4) s'occupe de la qualité pour participer à l'accréditation des activités du CNRCH. Elle participe également pour 0,4 ETPT à l'activité qualité du CNR-IST (Pr C Bébear) et pour 0,2 ETPT au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux.

Une ou une technicien(ne) du laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux (ETPT : 0,07) participe au travail de routine des souches de *Campylobacters* reçues du réseau hospitalier (Campy.hop) et aux cultures de *H. pylori*. Le cadre du laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux participe à l'encadrement administratif du personnel du CNRCH (Mme Vanessa Duprat, ETPT : 0,05). Enfin, une technicienne, Mme Léa Reybard, du pôle de Biologie Pathologie du CHU de Bordeaux, participe à la préparation des milieux de culture « maison » du CNRCH (ETPT : 0,1).

Erick Keisler, 57 ans, Adjoint administratif du CNRCH, CDI (ETPT : 0,8) participe au rendu des résultats du CNR, au suivi des envois extérieurs, aux statistiques d'activités du CNR, à l'écriture des rapports, aux nombreux contacts email et téléphoniques, aux saisies sur Campy-Internet et à la maintenance de notre site internet. En l'absence du secrétaire, l'ensemble du personnel biologique et technique participe aux réponses des appels téléphoniques. Les appels concernant les conseils extérieurs en antibiothérapie ou autres types de conseils sont tracés et transmis systématiquement aux biologistes responsables.

L'organigramme du CNR pour la période 2023-2027 est indiqué ci-après.

Fonction	Nom	Qualification	Statut	ETPT
Responsable scientifique	Philippe Lehours	Ph., Dr. ès Sci	PU-PH	0,2
Biologiste	Marine Jauvain	Ph.,	AHU	0,1
Ingénieur hospitalier	Lucie Bénéjat	M2	CDD	1
Ingénieur hospitalier	Quentin Jehanne	Dr. ès Sci	CDI	1
Ingénieur hospitalier	Léo Gillet	M2	CDD (50%)	0,5
Technicienne	Astrid Ducournau	BTS	CDI	1
Technicienne	Johanna Aptel	BTS	CDD	1
Techniciens(nes)	X	BTS	CDI	0,07+ 0,1
Technicienne Qualité	Marie Taymont	BTS	CDD (40%)	0,4
Secrétaire	Erick Keisler	BTS	CDI (80%)	0,8
Cadre de Santé	Vanessia Duprat	BTS	CDI	0,05

X= (pool des techniciens du laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin)

Léo Gillet seconde depuis juillet 2023 Quentin Jehanne dans tous les projets de routine NGS du CNR.

1.3 Locaux et équipements

Les locaux principaux du CNR (Laboratoire de Bactériologie du CHU Pellegrin) sont composés de deux pièces techniques et du bureau administratif, 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, une laverie, une 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 4 de l'U1312 UMR BRIC, 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, Bâtiment BBS) à moins de 200 mètres du laboratoire hospitalier principal.

Les équipements au niveau du laboratoire principal du CNRCH 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);
- deux combinés réfrigérateur-congélateur ;
- cinq ordinateurs connectés au SIL et au réseau du CHU de Bordeaux ;
- un photocopieur/imprimante/scan/fax acheté en 2018 et remplacé en 2021 ;
- un congélateur à -20°C ;
- 6 congélateurs à -80°C (New Brunswick Scientific).

Les étuves et congélateurs sont reliés au système de surveillance de la température Sirius géré par le CHU de Bordeaux. La cartographie des enceintes est réalisée par le service de Métrologie du CHU de Bordeaux.

Au niveau du laboratoire INSERM U1312, 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, au plateau de biologie moléculaire du CHU et à celle du Département Sciences Biologiques et Médicales (Université de Bordeaux) pour réaliser nos PCR en temps réel.

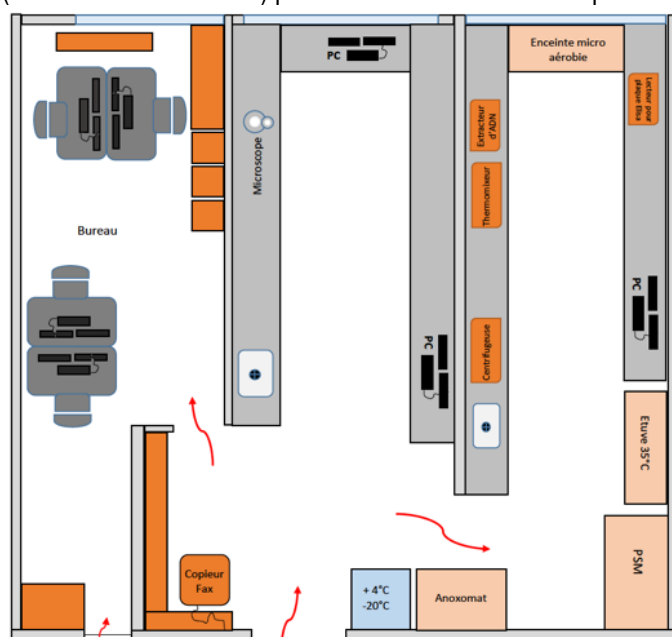


Figure : Plan simplifié des locaux du CNRCH.

1.4 Collections de matériel biologique

La gestion de nos collections de souches est confiée depuis janvier 2017 au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux. Le contrat sera reconduit pour le prochain contrat 2023-2027.

Le CNR maintient congelées à -80°C les souches de référence acquises auprès des collections internationales et plusieurs milliers de souches provenant :

- pour les *Campylobacters* du réseau de surveillance public et privé Français,
- pour les *Hélicobacters* : de divers protocoles et essentiellement des malades de Bordeaux et de sa région.

Le CNR conserve l'intégralité des isolats de *Campylobacters* et bactéries apparentées (*Aliarcobacters*, *Hélicobacters* entérohépatiques) de 2020 à 2023 (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=5000 environ).

Nous avons en 2023 transféré 307 souches de *Campylobacter* sp de l'année 2019 vers le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Bordeaux : 160 issues d'hôpitaux et 147 de laboratoires privés. Elles ont été sélectionnées selon les critères suivants habituels (cf tableau ci-dessous). Les répartitions exactes du nombre de souches pour 2023 sont :

Critères	Laboratoires privés	Hôpitaux
Espèces autres que <i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i>	52	73
<i>C. jejuni</i> et <i>C. coli</i> issus d'hémoculture	12	30
Prélèvements autres que selles et hémoculture	0	4
Campylobacters résistants à l'érythromycine	17	14
Souches séquencées par NGS	66	39
Total	307	

Le CNR dispose d'une collection de souches types pour de nombreuses espèces du genre *Campylobacter* sp (n=14), *Aliarcobacter* sp (n=3) ou *Helicobacter* sp (n=20).

L'ensemble des souches ou de leur ADN est disponible gratuitement : les demandes peuvent être formulées par mail courrier ou téléphone.

Tableau. Collection de souches de référence du CNRCH.

Genre	Espèce	Sous-espèce	ATCC	CCU G	CIP	NCTC	Autres
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>		49616	30485	103493	12481	
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>			34397 B			
<i>Arcobacter</i>	<i>butzleri</i>						NADC 3257
<i>Arcobacter</i>	<i>cryaerophilus</i>		43158	17801	104014	11885	
<i>Arcobacter</i>	<i>skirrowii</i>		51132	10374	103588		
<i>Campylobacter</i>	<i>armoricus</i>			73571	111675		
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>				70.70		
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>		33559	11283	70.80	11366	
<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>				68.25		
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>		33237	13144	103757	11485	
<i>Campylobacter</i>	<i>curvus</i>		35224	13146	103747	11649	
<i>Campylobacter</i>	<i>curvus</i>			11644			
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	fetus	27374	6823 A	53.96	10842	
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	fetus			A169		
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	venerealis	19438	33899	68.29	10354	
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	venerealis		33902	69.45		
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus</i>	venerealis			54.19		
<i>Campylobacter</i>	<i>hyointestinalis</i>	lawsonii			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>	jejuni	33560	11284	70.2	11351	DSM 4688
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	jejuni		81.176			
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>	jejuni					260.94
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>		700819	19506 /6824	107370	11168	
<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>			10937			

Campylobacter	<i>jejuni</i>	Hipp neg					D 1712
Campylobacter	<i>jejuni</i>	Hipp neg					D 1713
Campylobacter	<i>jejuni</i>	doylei	49349	24567	103751	11951	
Campylobacter	<i>lanienae</i>				106745		
Campylobacter	<i>lari</i>		35221	23947	102722	11352	
Campylobacter	<i>ornithocola</i>						CECT9147, LMG29815, WBE38
Campylobacter	<i>showae</i>				103970		
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv sputorum	35980	9728	103749	11528	
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv sputorum	33562	11289	53.103	11367	
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv sputorum			54.20		
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv sputorum			54.22		
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv sputorum			81.11		
Campylobacter	<i>sputorum</i>	bv fecalis		12014			
Campylobacter	<i>upsaliensis</i>		43954	14913 T	103681	11541	
Helicobacter	<i>anseris</i>			52421			
Helicobacter	<i>bilis</i>		51630	38995	104752	T	
Helicobacter	<i>bizzozeroni</i>			35545	105233	T	
Helicobacter	<i>brantae</i>			52420			
Helicobacter	<i>burdigaliensis</i>				111660		CECT 8850, CNRCH 2005/0566H
Helicobacter	<i>caesarodunensis</i>			68986	111406		DSM 105791
Helicobacter	<i>canadensis</i>		700948	47163		13241	
Helicobacter	<i>canadensis</i>					13242	
Helicobacter	<i>canis</i>		51401		104753	T	12739
Helicobacter	<i>cholecystus</i>		700242		105596		
Helicobacter	<i>cinaedi</i>				105369		
Helicobacter	<i>cinaedi</i>			18818 T	103752	12423	
Helicobacter	<i>fennelliae</i>		35683				CLO1
Helicobacter	<i>fennelliae</i>					11613	CLO2 441
Helicobacter	<i>hepaticus</i>		51449				
Helicobacter	<i>labetoulli</i>			73475	111659	T	
Helicobacter	<i>muridarum</i>		49282	29262	104248		
Helicobacter	<i>mustelae</i>		43772	25715	103759	T	12198
Helicobacter	<i>nemestrinae</i>			44615	104754		
Helicobacter	<i>pametensis</i>		51478	29255	104249		
Helicobacter	<i>pullorum</i>		51801	33837	104787		12824
Helicobacter	<i>pullorum</i>		51802	33838			12826
Helicobacter	<i>pullorum</i>			33839			
Helicobacter	<i>pullorum</i>			33840			
Helicobacter	<i>pullorum</i>			33842			
Helicobacter	<i>pullorum</i>					13154	

<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>				13156
<i>Helicobacter</i>	<i>pullorum</i>				13157
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>	43504	17874	103995	11637
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>		T		
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>		18943	101260	
<i>Helicobacter</i>	<i>valdiviensis</i>				CECT 8610

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRCH fait partie du Pôle de Biologie et Pathologie qui est entré dans 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.

En 2023, notre technicienne Astrid Ducournau a été habilitée à la mission de Correspondant Assurance Qualité (CAQ) ce qui permet de renforcer l'équipe qualité au CNR dorénavant composée de 3 CAQ (Marie Taymont, Lucie Bruhl, Astrid Ducournau).

Audits : Un audit de traçabilité sur la culture et les antibiogrammes de *H. pylori* a été réalisé au sein du CNR le 27/06/2023. Il a fait l'objet de 4 écarts et d'une remarque. A ce jour, un seul écart reste à clôturer, il concerne l'avancement du dossier de validation de méthode pour la culture de *H. pylori*. L'ensemble de l'équipe est mobilisé pour finaliser ce dossier pour la fin du premier trimestre 2024.

Le CNR a eu sa 1ère visite COFRAC en décembre 2022. A l'issu de cet audit, aucun écart n'a été soulevé.

Le laboratoire est officiellement accrédité pour l'identification et la culture des *Campylobacter* sp (ligne de portée BM MG11), pour l'antibiogramme (ligne de portée BM MG12) et autres germes apparentés. Le CNR est également accrédité pour détection de *H. pylori* par PCR (BM BA02).

Indicateur de rendu des résultats : Une extraction a été réalisée pour l'année 2023. Elle concerne le délai de rendu des résultats pour la détection de *H. pylori* dans les biopsies gastriques. Cette extraction a montré que le CNR respecte les délais de rendu de résultats affichés sur le site internet du CNR.

EEQ du pipeline bioinformatique du CNR : régulièrement, l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) au travers du réseau «FWDAMR-RefLabCap» (<https://www.fwdamr-reflabcap.eu>) propose aux laboratoires nationaux de références d'analyser une sélection de souches de *Campylobacter* sp. dans le but d'harmoniser, au sein de l'union européenne, la détection de l'espèce ainsi que la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

Les résultats génomiques obtenus étaient en adéquation avec ce que l'ECDC attendait. Le pipeline d'analyses du CNR et plus particulièrement la base de données de résistance établie et affinée au cours du temps a permis de retrouver précisément chaque mutation et gène de résistance.

Projets pour l'année 2024 :

L'accréditation se poursuit et va s'étendre avec l'ajout d'autres examens. Il est prévu de demander un ajout pour la culture, l'identification et les antibiogrammes de *H. pylori*.

Nous prévoyons un audit qualité interne pour la sérologie de *Campylobacter jejuni* et la détection des antigènes de *H. pylori* dans les selles afin de proposer ces examens au COFRAC en vue d'obtenir l'accréditation de 100% des techniques lors de la prochaine visite.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

Les éléments surlignés en gris correspondent aux techniques qui sont ou seront accréditées prochainement.

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

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

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*) ;
- 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 ;
- typage MLST ;
- typage du résistome et du virulome de *H. pylori* par technique DNA Capture au sein de biopsies gastriques ;
- 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 *Campylobacters*, 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 et 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 *Campylobacters* 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 *Aliarcobacter 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 *Campylobacters*. La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'identifier des genres et espèces difficilement accessibles par les tests d'identification conventionnels, notamment : *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, les *Campylobacters* «anaérobies» (*Campylobacter ureolyticus* notamment), les *Aliarcobacters* et les *Hélicobacters* entérohépatiques dont, pour certains, la pathogénie est proche des *Campylobacters* (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 de tests réalisés pour des transplantations fécales. 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 *Campylobacters* : 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 la détection de *C. fetus* et des *Aliarcobacters*.

-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 *Aliarcobacter 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 *Aliarcobacter sp* ne sont pas encore disponibles. Pour les Aliarcobacters 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). Cela permet 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 est ensemencé sur un milieu constitué d'une base gélosée (milieux cœur-cervelle, 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 de 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. La PCR est remboursée depuis décembre 2022.

Une trousse 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.

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 protons. 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. Ce test est remboursé depuis décembre 2022 en primo diagnostic et en contrôle de traitement d'éradication.

-Sérologie

De nombreuses troupes diagnostiques utilisant les techniques ELISA, chimiluminescence ou Western-blot sont commercialisées. Cependant, 4 ELISA seulement 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 diagnostic 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. En outre, elle ne permet pas de distinguer une infection active d'une infection ancienne à cause de la persistance fréquente des anticorps après un traitement antibiotique efficace. Elle n'est donc pas utilisée pour le contrôle d'éradication. L'HAS recommande la sérologie comme test diagnostic de première intention dans les cas suivants :

Personnes ou patients sans symptôme digestif :

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

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

-ou avec purpura thrombopénique immunologique.

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

-Recherche de *H. pylori* dans les selles

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

Une autre méthode de recherche est la détection d'antigènes spécifiques de cette bactérie par technique ELISA ou immunochromatographique dans les selles. Les tests utilisant des anticorps monoclonaux doivent être utilisés. La sensibilité et la spécificité de ces tests sont légèrement inférieures à celles du test respiratoire à l'urée marquée. Ils sont donc recommandés pour le contrôle d'éradication quand le test respiratoire n'est pas disponible ou peu praticable (enfants). La recherche d'antigènes dans les selles est remboursée depuis décembre 2022 en primo diagnostic et en contrôle de traitement d'éradication.

-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 cheval 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 Hélicobacters, 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.