

# Centre National de Référence des Infections Sexuellement Transmissibles bactériennes



## Rapport annuel d'activités 2019

Pr Cécile Bébéar, Dr Bertille de Barbeyrac, Dr Sabine Pereyre, Dr Olivia Peuchant  
CHU de Bordeaux (Laboratoire coordonnateur, *Chlamydia trachomatis* et mycoplasmes urogénitaux)  
Pr Béatrice Berçot, Dr Hervé Jacquier, Dr Thibaut Poncin  
APHP Saint-Louis (Laboratoire associé gonocoque)  
Pr Nicolas Dupin, Dr Nadjat Bennhadou  
APHP Cochin (Laboratoire associé syphilis)



# Table des matières

<b>RESUME ANALYTIQUE .....</b>	<b>6</b>
Laboratoire CHU de Bordeaux .....	6
1. Infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	6
2. Infections à mycoplasmes urogénitaux .....	6
Laboratoire APHP Saint-Louis .....	6
Laboratoire APHP Cochin .....	7
<b>SUMMARY .....</b>	<b>8</b>
Laboratory from Bordeaux University Hospital .....	8
1. <i>Chlamydia trachomatis</i> infections .....	8
2. Urogenital mycoplasmal infections .....	8
Laboratory from APHP Saint-Louis.....	8
Laboratory from APHP Cochin.....	9
<b>1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>10</b>
<b>2 ACTIVITES D'EXPERTISE .....</b>	<b>10</b>
2.1 Évolutions des techniques .....	11
2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	11
2.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	11
2.1.3 Laboratoire APHP Cochin .....	11
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse.....	11
2.2.1 Evaluation de PCR multiplex IST .....	11
2.2.2 Evaluation de trousse diagnostiques pour la LGV .....	13
2.2.3 Evaluation de la trousse multiplex Allplex™ Genital ulcer Assay (Seegene) commercialisée par Eurobio pour la détection de <i>T. pallidum</i> et <i>C. trachomatis</i> génovar L .....	14
2.2.4 Trousse évaluant la résistance aux macrolides chez <i>M. genitalium</i> .....	16
2.2.5 Trousse de diagnostic sérologique de la syphilis .....	17
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....	20
2.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	20
2.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	20
2.3.3 Laboratoire APHP Cochin .....	20
2.4 Collections de matériel biologique .....	20
2.4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	20
2.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	21
2.4.3 Laboratoire APHP Cochin .....	21
2.5 Activités d'expertise.....	21
2.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	21
2.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	25
2.5.3 Laboratoire APHP Cochin .....	26
2.6 Activités de séquençage .....	26

2.6.1	Laboratoire CHU de Bordeaux .....	26
2.6.2	Laboratoire APHP Saint-Louis .....	26
2.6.3	Laboratoire APHP Cochin .....	28
<b>3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>		<b>28</b>
3.1	Description du réseau de partenaires .....	29
3.1.1	Laboratoire CHU de Bordeaux : réseau de surveillance des anorectites à <i>C. trachomatis</i> .....	29
3.1.2	Laboratoire APHP Saint-Louis .....	32
3.1.3	Laboratoire APHP Cochin .....	32
3.1.3.1	Dans le cadre du protocole GENOSYPH .....	32
3.1.3.2	Dans le cadre de l'expertise .....	33
3.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....	35
3.2.1	Anorectites à <i>C. trachomatis</i> .....	35
3.2.1.1	Anorectites à souches L .....	35
3.2.1.2	Anorectites à souches non L .....	36
3.2.1.3	Répartition géographique des anorectites .....	37
3.2.1.4	Analyse des données biologiques, cliniques et comportementales des patients atteints d'anorectite .....	39
3.2.2	Infections à gonocoque .....	40
3.2.2.1	Cas d'infections recensées dans l'enquête ENGON 2019 .....	40
3.2.3	Syphilis .....	44
3.2.3.1	Dans le cadre du protocole GENOSYPH .....	44
3.2.3.2	Dans le cadre de l'expertise .....	46
3.3	Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....	50
3.3.1	Etude IPERGAY .....	50
3.3.2	Surveillance de la sensibilité de <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i> aux antibiotiques en France métropolitaine en 2019 (MYCOMET 2019) .....	51
3.3.3	Surveillance de la résistance de de <i>M. genitalium</i> aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine et en outre-mer en 2019 (DROM 2019) .....	51
3.3.3.1	Surveillance de la résistance de <i>M. genitalium</i> aux macrolides et fluoroquinolones à Bordeaux .....	51
3.3.3.2	Surveillance de la résistance de de <i>M. genitalium</i> aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine (MYCOMET 2019) .....	52
3.3.3.3	Surveillance de la résistance de <i>M. genitalium</i> aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'outre-mer en 2018 (DROM 2018) .....	56
3.3.3.4	Surveillance de la résistance de <i>M. genitalium</i> aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'Outre-Mer en 2019 (DROM 2019) .....	58
3.3.4	Surveillance de la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> en France en 2018 et 2019 (ENGON 2018-2019) .....	60
3.3.4.1	Modification des règles du CA-SFM en 2019, homogénéisation avec celles de l'EUCAST .....	60
3.3.4.2	Souches résistantes aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération en 2019 .....	61
3.3.4.3	Surveillance de la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> en France métropolitaine (enquête ENGON 2018) ....	64
3.3.4.4	Surveillance de la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> en France métropolitaine (enquête ENGON 2019) ....	67
3.3.4.5	Surveillance de la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> aux antibiotiques dans les DROM La Réunion, Mayotte (cohorte 2016-2017) .....	69
3.3.4.6	Surveillance de la résistance de <i>N. gonorrhoeae</i> aux antibiotiques dans les DROM Guyane Française, Martinique, Polynésie française (cohorte 2017-2018) .....	70
3.3.5	Surveillance de la résistance de <i>T. pallidum</i> aux macrolides et aux tétracyclines en 2019 .....	71
3.3.6	Sensibilité aux antibiotiques de <i>C. trachomatis</i> .....	72
3.4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux .....	72
3.4.1	Laboratoire CHU de Bordeaux .....	73
3.4.2	Laboratoire APHP Saint-Louis .....	73
3.4.3	Laboratoire APHP Cochin .....	74
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....	74
3.5.1	Enquête de surveillance européenne Tessy et contrôles de qualité européens pour le gonocoque .....	74
3.5.1.1	EU STI Microbiology Network: Sentinel Surveillance of Gonococcal Antimicrobial Susceptibility .....	74
3.5.1.2	Contrôles de qualité européens .....	75

<b>4 ALERTE .....</b>	<b>75</b>
4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	75
4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	75
4.3 Laboratoire APHP Cochin .....	76
4.3.1 La procédure .....	76
4.3.2 Pour l'année 2019 .....	76
<b>5 ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....</b>	<b>77</b>
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	77
5.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	77
5.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	79
5.1.3 Laboratoire APHP Cochin .....	79
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires .....	80
5.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	80
5.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	80
5.2.3 Laboratoire APHP Cochin .....	81
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...) .....	81
5.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	81
<b>6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....</b>	<b>81</b>
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.....	81
6.1.1 Projet de recherche clinique Remind/ Memodépistages, 2018-2021, Santé Publique France .....	81
6.1.2 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	83
- Eléments intégratifs conjugatifs (ICE) et résistance aux tétracyclines chez <i>M. hominis</i> .....	83
- Etude des mécanismes de résistance à la doxycycline chez <i>M. genitalium</i> .....	84
- PHRCN I-Predict.....	84
- PHRCN Chlazidoxy .....	85
6.1.3 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	85
- La résistance antimicrobienne des gonocoques en France et les caractéristiques cliniques et épidémiologiques associées .....	85
- Exploration des souches de gonocoque résistantes aux céphalosporines de 3ème génération sur la période 2008-2016 par NGS. ....	86
- Evaluation de molécules dérivées de la gatifloxacine – QUIN (Projet en partenariat avec Sorbonne Université – Hôpital Pitié-Salpêtrière – CNR Mycobactérie) .....	87
- Evaluation de l'automate NeumoDx pour la détection d'IST (partenariat avec Qiagen) .....	87
- Évaluation de kit pour la détection de gonocoque et détermination de la résistance à la ciprofloxacine (partenariat avec Speedx) .....	87
6.1.4 Laboratoire APHP Cochin .....	88
- Exploration des bases génétiques de la résistance de <i>T. pallidum pallidum</i> à la doxycycline.....	88
- Etude rétrospective multicentrique Neurocef .....	88
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 .....	89
6.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	89
6.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	92
6.2.3 Laboratoire APHP Cochin .....	94
<b>7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX .....</b>	<b>95</b>

<b>8 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES .....</b>	<b>95</b>
8.1 Evaluation de trousse diagnostiques .....	95
8.1.1 Evaluation de plaques à façon pour la détermination de CMI pour les mycoplasmes urogénitaux .....	95
8.1.2 Evaluation de la trousse CT/NG/MG/TV de Abbott sur l'Allinity (St Louis) .....	96
8.1.3 Evaluation de trois nouvelles trousse commerciales pour le diagnostic de <i>M. genitalium</i> et de la résistance aux macrolides .....	96
8.2 Prévention combinée des IST chez les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes utilisant le TDF/FTC par voie orale pour la prophylaxie pré-exposition for HIV (PrEP)-ANRS 174 Doxyvac .....	97
8.3 Prévalence des infections à HPV et des IST bactériennes chez des femmes HIV-positives et HIV-négatives au Mali. 99	99
8.4 Prévalence et suivi longitudinal sur 2 ans des lésions anales dysplasiques, des infections HPV et des infections sexuellement transmissibles associées, chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes à Lomé, Togo. ....	99
8.5 Constitution d'un groupe de travail IST auprès de l'ANRS .....	100
8.6 Enquête PreviST .....	100
8.7 Laboratoire CHU de Bordeaux .....	101
- Evolution du réseau des anorectites à <i>C. trachomatis</i> .....	101
- Enquêtes annuelles de surveillance de la résistance des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques .....	101
- Transfert de résistance aux antibiotiques par conjugaison chez <i>M. hominis</i> .....	101
- Etude moléculaire du gène ompA des échantillons positifs pour une souche <i>C. trachomatis</i> L de HSH ...	102
8.8 Laboratoire APHP Saint-Louis .....	102
- Enquêtes annuelles de surveillance de la résistance du gonocoque aux antibiotiques .....	102
- Développement d'une nouvelle technique de Séquençage Haut Débit (NGS, capture) à partir des prélèvements pour la détection du gonocoque .....	102
- Etude de la clairance du portage pharyngé asymptomatique de <i>N. gonorrhoeae</i> avec ou sans traitement par ceftriaxone : étude randomisée de non infériorité .....	103
- Enquête TRUST ANRS .....	103
- Etude des présentations particulières d'anorectites abcédées à gonocoque .....	103
8.9 Laboratoire APHP Cochin .....	104
- Etude CyBale (Congenital Syphilis in Babies: Long term Evaluation) .....	104
- Essai clinique randomisé de non-infériorité de doxycycline vs Benzathine benzylpénicilline (BPG) pour le traitement de la syphilis précoce SY-DOXY SY-BPG (PHRCN) .....	105
<b>ANNEXE 1 : MISSIONS &amp; ORGANISATION DU CNR .....</b>	<b>108</b>
1.1 Missions du CNR et de ses laboratoires associés .....	108
1.1.1 Expertise .....	108
1.1.2 Conseil .....	108
1.1.3 Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique .....	108
1.1.4 Contribution à l'alerte .....	108
1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés .....	109
1.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux, laboratoire coordonnateur .....	109
1.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis, laboratoire associé .....	110
1.2.3 Laboratoire APHP Cochin, laboratoire associé .....	111
1.3 Locaux et équipements .....	112

1.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux.....	112
1.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis.....	113
1.3.3 Laboratoire Cochin.....	114
<b>1.4 Collections de matériel biologique .....</b>	<b>115</b>
1.4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux.....	115
1.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis.....	115
1.4.3 Laboratoire APHP Cochin.....	116
<b>1.5 Démarche qualité du laboratoire .....</b>	<b>117</b>
1.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux.....	117
1.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis.....	119
1.5.3 Laboratoire APHP Cochin.....	121
<b>ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>122</b>
<b>2.1 Liste des techniques de référence.....</b>	<b>122</b>
2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux.....	122
2.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis.....	124
2.1.3 Laboratoire APHP Cochin.....	125
<b>2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR .....</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>126</b>

*Le CNR des IST bactériennes remercie Cécile Laurier-Nadalié et Chloé Le Roy pour leur aide à la mise en forme du rapport.*

# Résumé analytique

Cette année a été marquée par des **évaluations de trousse de PCR en temps réel multiplex et simplex des IST bactériennes** impliquant des échanges de collections entre les 3 laboratoires du CNR IST bactériennes.

Le CNR des IST bactériennes a évalué **la prévalence et l'incidence des infections à *M. genitalium* et la résistance des infections à *M. genitalium* et *N. gonorrhoeae* chez les HSH PrEPeurs** prenant ou pas de la **prophylaxie-pré-exposition (PEP) par doxycycline** au sein de l'essai ANRS IPERGAY. **La présence de *T. pallidum*** dans les prélèvements d'HSH présentant une syphilis a été également recherchée par nested PCR.

## Laboratoire CHU de Bordeaux

### 1. Infections à *Chlamydia trachomatis*

**La surveillance des infections à *C. trachomatis*** a concerné **les infections anorectales** dans le cadre du réseau LGV. En 2019, le CNR a reçu et typé 2383 échantillons dont 2363 d'origine anorectale. Les points marquants sont (i) une baisse du nombre de nos correspondants cliniciens due à l'arrêt de la surveillance des PrEPeurs ; (ii) un nombre de cas de LGV qui se stabilise (744 en 2019) ; un nombre de cas non LGV (1637 en 2019) qui diminue en raison de l'arrêt de la surveillance des PrEPeurs. **La surveillance des infections urogénitales à *C. trachomatis* ayant porté sur 2 ans sur la métropole et l'outre-mer**, il ne sera pas réalisé d'études supplémentaires sur le reste de la mandature. En effet, la répartition des génotypes est stable et ne présente pas de phénomène inhabituel nécessitant une surveillance épidémiologique rapprochée.

Une alerte a été lancée en avril 2019 à propos de la circulation en Finlande d'un **variant de *C. trachomatis* non détecté par le test Aptima Combo (AC2) d'Hologic** détectant en duplex *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Pour évaluer la prévalence de ce variant en France, le CNR des IST bactériennes a collecté 190 échantillons suspects de contenir ce variant provenant de 18 laboratoires répartis sur le territoire français et les a envoyé à l'ECDC qui coordonne une étude européenne.

### 2. Infections à mycoplasmes urogénitaux

Trois trousse diagnostiques de PCR en temps réel pour la **détection de *M. genitalium* et de sa résistance aux macrolides** ont été évaluées. **L'activité d'expertise concernant les mycoplasmes urogénitaux** est à nouveau en très forte hausse en 2019 avec une augmentation de 79%.

**La surveillance de la résistance aux anti-infectieux de *M. genitalium* en France métropolitaine** rapporte une prévalence de la **résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones de *M. genitalium* à respectivement 34,5% et 15,6%**, stable par rapport à 2018. **En outre-mer**, la prévalence de la **résistance aux macrolides était de 14,7%** en 2019 vs 6,1% en 2018 et **celle aux fluoroquinolones de 2,6%** en 2019 vs 1,3% en 2018. L'augmentation significative de la résistance aux macrolides de *M. genitalium* entre 2018 et 2019 en outre-mer ne concerne que les femmes. En 2019, la résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones et la double résistance est statistiquement **plus élevée en France métropolitaine qu'en outre-mer**.

## Laboratoire APHP Saint-Louis

En 2019, le CNR rapporte des chiffres de prévalence de la **résistance du gonocoque à la ceftriaxone à 0,2%, au céfixime à 0,8%, à l'azithromycine à 6,9%, aux fluoroquinolones à 60,1%, à la tétracycline à 65,2% dont 38,4% avec un haut niveau de résistance et à la spectinomycine à 0%**. Les CMI de la gentamicine sont inférieures ou égales à l'Ecoff. Ces chiffres confirment la stabilisation de la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération à un taux bas en France avec cependant, une augmentation de souches circulantes résistantes aux fluoroquinolones, déjà observée en 2018 et une légère diminution de la résistance à l'azithromycine. **En outre-mer**, les premières estimations qui restent à consolider sur une collection plus importante rapportent une résistance aux fluoroquinolones bien plus faible, de 0 % en Polynésie Française, 19 % en Guyane Française et 58,8 % en Martinique en 2017-2018.

Une nouvelle souche de **gonocoque XDR résistante à haut niveau à la ceftriaxone**, appelée F91 est décrite dans la région de Limoges. Cette souche est isolée d'une uréthrite chez un homme hétérosexuel qui l'a acquise lors d'un séjour au Cambodge. Comme l'isolat F90 isolé en France en 2017, elle appartient à un nouveau clone qui circule en Europe et qui est originaire d'Asie du sud-est. Trois souches résistantes ou de sensibilité diminuée au céfixime sont décrites, dont une qui appartient au clone à succès de NG-MAST ST1407 proche de la souche à haut niveau de résistance F89 circulant en France en 2010-2012.

**Treize souches virulentes** ont été décrites en 2019 dont 2 responsables de kératoconjunctivites isolées chez deux jeunes hommes HSH dans la région de Bordeaux. Quatre cas de gonococcémies sont rapportés ; l'un des cas cliniques est un cas d'endocardite sur valve aortique et l'autre un cas de choc septique entraînant un décès chez une patiente immunodéprimée. L'analyse des distances entre ces souches invasives après séquençage du génome complet a permis de regrouper les 2 souches responsables de kératoconjunctivites et un autre cas de gonococcémie. Une exploration des déterminants de virulence est en cours.

En 2019, les règles de réalisation et d'interprétation de l'antibiogramme du gonocoque ont été harmonisées entre **celles du CA-SFM et celles de l'EUCAST**. La détermination de la résistance est effectuée par la détermination de la CMI ; pour l'azithromycine et la gentamicine, la souche reste non caractérisée et la résistance est fixée par rapport à l'Ecoff en l'absence de concentrations critiques. Les souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont catégorisées en MDR et XDR. Dans ce rapport, un formulaire correspondant aux recommandations de l'ECDC définit plus en détail les souches MDR et XDR et l'enquête autour d'un cas à réaliser en cas de découverte de souches MDR ou XDR et/ou d'échecs de traitement.

## Laboratoire APHP Cochin

Dans un contexte de réémergence, la syphilis reste un problème de santé majeur que ce soit dans les groupes à risques ou chez les femmes enceintes qui échappent aux programmes de dépistage tout au long de la grossesse. Le CNR apporte une expertise moléculaire par la détection du génome de *T. pallidum* et sérologique dans le cadre d'une aide au diagnostic.

### Expertise

- ⇒ **977 demandes d'expertises correspondant à 2010 analyses** de prélèvements de patients consultant dans les CeGGID et services MST de France métropolitaine et des départements outre-mer ont été répertoriées et analysées pour l'année 2019.
- ⇒ **167 prélèvements provenant de 167 patients suspectés de syphilis dans le cadre de l'étude GENOSYPH** ont été répertoriés et analysés.
- ⇒ **88% des souches de *T. pallidum* présentent la mutation A2058G** (numérotation *Escherichia coli*) sur le gène de l'ARNr 23S pour la résistance aux macrolides.
- ⇒ **Aucun marqueur génétique de résistance à la doxycycline détecté** sur une population de 130 échantillons.
- ⇒ **71 échantillons ont été expertisés dans le cadre de l'étude IPERGAY**, 6 ont été positifs pour TPA.
- ⇒ **211 prélèvements périnataux ont été analysés**, 2 étaient positifs en nPCR.
- ⇒ **3 trousse de tests sérologiques** ont été évaluées.
- ⇒ **1 kit commercial de détection des IST par PCR en temps réel multiplex** a été évalué.

### Alerte

- ⇒ **347 LCR ont été analysés**, 39 étaient positifs par nPCR et/ou VDRL.
- ⇒ **3 alertes de syphilis congénitale** ont été déclenchées auprès de Santé publique France.

# Summary

This year was highlighted by **evaluations of real-time multiplex and simplex PCR kits for bacterial STIs** involving collection exchanges between the 3 laboratories of the CNR of bacterial STIs.

The CNR bacterial STIs evaluated the **prevalence and incidence of *M. genitalium* infections and the resistance of *M. genitalium* and *N. gonorrhoeae* infections in MSM PrEPers** taking or not taking **doxycycline pre-exposure prophylaxis (PEP)** in the ANRS IPERGAY trial. **The presence of *T. pallidum*** in specimens from MSM infected with syphilis was also tested by nested PCR.

## Laboratory from Bordeaux University Hospital

### 1. *Chlamydia trachomatis* infections

**The monitoring of *C. trachomatis* infections** covered anorectal infections within the LGV network. In 2019, the CNR received and typed 2,383 samples (including 2,363 anorectal). Key data are (i) a decrease in the number of our physician partners due to the end of PrEPers monitoring; (ii) a stabilizing number of LGV cases (744 in 2019); and a decreasing number of non-LGV cases (1637 in 2019) due to the end of PrEPers monitoring as well. **As the surveillance of urogenital *C. trachomatis* infections was conducted over 2 years in metropolitan France and overseas**, no additional studies will be conducted for the rest of the CNR term. Indeed, the distribution of genovars is stable and does not present any unusual feature requiring close epidemiological surveillance.

An alert has been issued in April 2019 regarding the circulation in Finland of **a variant of *C. trachomatis* not detected by Hologic's Aptima Combo (AC2) test detecting *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in duplex**. In order to assess the prevalence of this variant in France, the CNR of bacterial STIs collected 190 samples suspected of containing this variant from 18 laboratories across France and sent them to the ECDC in January 2020 for an European study.

### 2. Urogenital mycoplasmal infections

We prospectively evaluated the handling and clinical performance of 3 commercial real-time PCR kits for the **detection of *M. genitalium* and macrolide resistance-associated mutations**. The **urogenital mycoplasma expertise activity** is again in very strong growth in 2019 with an increase of 79%.

Surveillance of ***M. genitalium* resistance to antimicrobials in metropolitan France** reports a prevalence of ***M. genitalium* resistance to macrolides and fluoroquinolones of 34.5% and 15.6% respectively**, stable compared to 2018. **Overseas**, the prevalence of **macrolide resistance was 14.7% in 2019 vs. 6.1% in 2018** and that of **fluoroquinolone resistance was 2.6% in 2019 vs. 1.3% in 2018**. The significant increase in macrolide resistance in *M. genitalium* between 2018 and 2019 overseas only affects women. In 2019, resistance to macrolides, fluoroquinolones and double resistance is statistically **higher in metropolitan France than in overseas territories**.

## Laboratory from APHP Saint-Louis

In 2019, the CNR reports **prevalence rates for gonococcal resistance of 0.2% to ceftriaxone, 0.8% to cefixime, 6.9% to azithromycin, 60.1% to fluoroquinolones, 65.2% to tetracyclines of which 38.4% with a high level of resistance and 0% to spectinomycin**. Gentamicin MIC values are less than or equal to the Ecoff. These data confirm the stabilization of resistance to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins at a low rate in France with, however, an increase in circulating fluoroquinolone-resistant strains, a fact already observed in 2018, and a slight decrease in resistance to azithromycin. **In overseas territories** the first data, that remain to be consolidated on a larger collection, report a much lower resistance to fluoroquinolones of 0% in French Polynesia, 19% in French Guiana and 58.8% in Martinique in 2017-2018.

**A new strain of XDR gonococcus with high-level resistance to ceftriaxone, called F91**, is described in the Limoges region. This strain is isolated from urethritis in a heterosexual man who acquired it during a stay in Cambodia. Like the F90 isolate isolated in France in 2017, it belongs to a new clone circulating in Europe and originating from South-East Asia. Three strains resistant or with a decreased susceptibility to cefixime are described, one of which

belongs to the successful NG-MAST ST1407 clone close to the highly resistant F89 strain circulating in France in 2010-2012.

**Thirteen virulent strains** were described in 2019, including 2 responsible for keratoconjunctivitis isolated from two young MSM in the Bordeaux region. Four cases of gonococemia have been reported; one clinical case is a case of endocarditis on aortic valve and the other is a case of septic shock leading to death in an immunocompromised patient. Analysis of the distances between these invasive strains after sequencing of the entire genome made it possible to cluster the 2 strains responsible for keratoconjunctivitis and another case of gonococemia. An exploration of virulence determinants is in progress.

In 2019, **the rules for performing and interpreting the antibiogram for gonococcus were harmonized between those of the CA-SFM and those of EUCAST**. The determination of resistance is carried out by determining the MIC; for azithromycin and gentamicin, the strain remains uncharacterized and resistance is fixed in relation to the Ecoff in the absence of breakpoints. The 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin-resistant strains are characterized in XDR and MDR. In this report, a form corresponding to the ECDC recommendations defines in more detail the MDR and XDR strains and the investigation around a case, which needs to be carried out in case of discovery of XDR or MDR strains and/or treatment failures.

### Laboratory from APHP Cochin

In a context of re-emergence, syphilis remains a major health problem, whether in at-risk groups or in pregnant women who are not screened throughout pregnancy. The CNR provides molecular expertise by detecting the *T. pallidum* and serological genome as part of diagnostic assistance.

#### Expertise

- ⇒ **977 requests for expertise corresponding to 2010 analyses** of patient samples consulting in the CEGGID and STDs Services of metropolitan France and overseas territories were listed and analysed in 2019.
- ⇒ **167 samples from 167 patients suspected of syphilis in the GENOSYPH study** were identified and analyzed.
- ⇒ **88% of *T. pallidum* strains had the A2058G mutation (*E. coli* numbering)** on the 23S rRNA for macrolide resistance.
- ⇒ **No genetic markers of doxycycline resistance** were detected in a population of **130 samples**.
- ⇒ **71 samples were tested in the IPERGAY study, 6 were positive for *T. pallidum* by nPCR.**
- ⇒ **211 perinatal samples** were analyzed and 2 were positive in nPCR.
- ⇒ **3 serological test kits** were evaluated.
- ⇒ **1 qPCR multiplex kit for bacterial STIs** was evaluated.

#### Alert

- ⇒ **347 CSFs were analyzed and 39 were positive by nPCR and/or VDRL.**
- ⇒ **3 congenital syphilis alerts** were triggered with Santé publique France.

# 1 Missions et organisation du CNR

Cf annexes.

## 2 Activités d'expertise

Cette année a été marquée par des évaluations de trousse de PCR en temps réel multiplex et simplex des IST bactériennes impliquant des échanges de collections entre les 3 laboratoires du CNR :

- 4 trousse multiplex pour le diagnostic des IST bactériennes (Bordeaux, APHP St Louis), 428 échantillons
- 4 trousse pour le diagnostic de la LGV (Bordeaux, APHP Cochin), 92 et 123 échantillons anorectaux
- 1 trousse multiplex pour le diagnostic de *T. pallidum* et *C. trachomatis* génovar L (APHP Cochin, Bordeaux), 389 échantillons.

En plus de ces évaluations, sont à noter les éléments clefs suivants :

### Laboratoire CHU de Bordeaux : éléments clefs 2019

- Evaluation de 3 trousse diagnostiques pour la détection de *M. genitalium* (195 échantillons) et de sa résistance aux macrolides (154 échantillons).
- Transfert de la PCR diagnostique LGV à 2 laboratoires de Microbiologie de CHU.
- Echantillons biologiques positifs et souches de *C. trachomatis* envoyés au centre de ressources biologiques (CRB) Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux en 2019 : 2383 (réseau LGV), 828 (enquête prévalence infections urogénitales DROM 2018) et 98 souches isolées au CHU.
- Echantillons biologiques positifs à *M. genitalium* envoyés au CRB BBS : 483 (recherche de résistance aux macrolides et fluoroquinolones), 614 (enquête surveillance résistance macrolides et fluoroquinolones, MYCOMET et DROM 2018), 62 (extraits de prélèvements de personnes à risques d'IST au Togo, collaboration étude ANRS).
- Souches de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* envoyées au CRB BBS : 111 et 20 (enquête sensibilité aux antibiotiques MYCOMET 2018), 90 et 10 (expertise CNR).
- *C. trachomatis* : 2383 échantillons typés dont 2363 anorectaux (réseau LGV), 53 échantillons anorectaux et cervicaux (extraits de prélèvements de personnes à risques d'IST au Togo, collaboration étude ANRS).
- Mycoplasmes urogénitaux : 529 échantillons ou souches expertisées.

### Laboratoire APHP Saint-Louis : éléments clefs 2019

- Bio-informatique : automatisation du pipeline d'analyse du génome du gonocoque NG-AR2T (*Neisseria gonorrhoeae* genome Assembly, Resistome, Typing & Tree) stocké sur la plateforme Moabi de l'APHP.
- 943 souches de gonocoques pour détermination de la sensibilité aux antibiotiques.
- 396 souches séquencées en NGS (25 souches isolées chez une cohorte de PrEPeurs à Bordeaux, 14 souches isolées d'infections invasives, 4 souches de sensibilité diminuée ou résistantes aux antibiotiques, 158 souches de l'enquête ENGON 2018, 27 souches de Haïti, 164 souches céfixime-résistantes isolées de 2008 à 2016).
- 558 prélèvements cliniques positifs à gonocoque pour la recherche de résistance à partir de prélèvements : 219 échantillons de la phase 1 et 54 échantillons de la phase 2 dans le cadre de l'étude Mémodépistages-REMIND, 207 échantillons dans les départements et régions d'outre-mer en 2017 et 2018, 54 extraits de prélèvements de personnes à risques d'IST au Mali et au Togo (collaboration études ANRS), 24 prélèvements issus de cas cliniques reçus pour expertise au CNR en 2019.

### Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs 2019

- 674 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise moléculaire, dont 28 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 1336 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise sérologique, dont 638 ont été positifs pour la syphilis.
- 167 échantillons analysés dans le cadre du protocole GENOSYPH, dont 28 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 71 échantillons ont été expertisés dans le cadre de l'étude IPERGAY dont 6 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 30 échantillons provenant d'ulcérations génitales analysés pour la présence des marqueurs génétiques potentiels de résistance à la doxycycline.
- 104 échantillons provenant d'ulcérations génitales analysés pour la présence des marqueurs génétiques de résistance à l'azithromycine ; 88% des échantillons présentent la mutation A2058G (numérotation *E. coli*).

## 2.1 Évolutions des techniques

### 2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Aucune nouvelle technique n'a été développée.

### 2.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Au cours de l'année 2019, nous avons mis en place le pipeline personnalisé **NG-AR2T** (*Neisseria gonorrhoeae* genome Assembly, Resistome, Typing & Tree) sur l'instance G-route AP-HP qui permet à la fois le stockage des données de séquençage à haut débit et le lancement des processus automatisés dédiés à l'analyse du génome de *N. gonorrhoeae*.

### 2.1.3 Laboratoire APHP Cochin

Aucune nouvelle technique n'a été développée.

## 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

### 2.2.1 Evaluation de PCR multiplex IST

En 2019, les laboratoires de Bordeaux et de l'APHP Saint Louis ont évalué 4 kits de PCR multiplex en temps réel marqués CE à partir d'échantillons négatifs et positifs pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* et *M. hominis* :

- Allplex STI essential assay de Seegene qui détecte *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* et *U. parvum* (évalué au CHU de Bordeaux)
- STI PLUS ELITE MGB®Kit d'Elitech qui détecte *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis* (évalué au CHU de Bordeaux)
- FTD urethritis plus de Fast-track diagnostics qui détecte *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *U. urealyticum* et *U. parvum* (évalué à APHP Saint Louis)
- le kit *N.gonorrhoeae/C.trachomatis/M.genitalium/T.vaginalis* Real-TM de Saccace qui détecte *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis* (évalué à APHP Saint-Louis)

Un total de 428 échantillons a été recueilli de manière prospective à l'hôpital Saint Louis et au CHU de Bordeaux (respectivement 405 et 23) parmi les échantillons passés en routine sur le cobas 6800 (Roche Diagnostics) pour recherche de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis* entre mars et octobre 2019. Des PCR en temps réel « maison » (CHU Bordeaux) pour la recherche de *U. urealyticum*, *U. parvum* et *M. hominis* ont également été réalisées sur l'ensemble des prélèvements, ces bactéries ne pouvant pas être recherchées sur le cobas 6800. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau ci-dessous. Parmi ces échantillons, 352 ont été sélectionnés pour leur positivité à au minimum un des pathogènes ciblés (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* et/ou *M. hominis*) et 76 échantillons ont été inclus pour leur négativité aux sept bactéries citées précédemment.

**Tableau. Résultats obtenus pour les 428 échantillons sélectionnés, avec le cobas 6800 (Roche Diagnostics) pour les cibles *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis*, et par qPCR « maison » pour les cibles *U. urealyticum*, *U. parvum* et *M. hominis*.**

Pathogène cible	Résultat	
	Négatif	Positif
<i>C. trachomatis</i>	322	106
<i>N. gonorrhoeae</i>	324	104
<i>M. genitalium</i>	319	109
<i>T. vaginalis</i>	385	43
<i>U. urealyticum</i>	375	53
<i>U. parvum</i>	363	65
<i>M. hominis</i>	353	75

Tous les échantillons sélectionnés ont été extraits sur l'extracteur Qiasymphony (Qiagen) et sont actuellement testés avec les 4 kits cités ci-dessus selon les recommandations des fournisseurs. Les résultats obtenus avec les kits CT/NG et MG/TV cobas 6800 représenteront les résultats de référence pour les 4 agents d'IST *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*. Les résultats des PCR maison *U. parvum/U. urealyticum* et *M. hominis* réalisées au CHU de Bordeaux sur les 428 échantillons représenteront la référence pour ces espèces de mycoplasmes commensaux, détectés par 2 des kits évalués (kits Allplex STI de Seegene et FTD urethritis plus de Fast-track diagnostics).

**Tableau. Caractéristiques des 428 échantillons sélectionnés pour l'évaluation et des 325 patients inclus.**

Type de prélèvement	Sexe				Total	Service demandeur	Présence de symptômes				Total
	F	H	NR	Total			Oui	Non	NR	Total	
Urine	8	140	1	<b>149</b>	CeGIDD	0	176	0	<b>176</b>		
Anus	4	115	0	<b>119</b>	Centre de planification	0	11	0	<b>11</b>		
Prélèvement cervico-vaginal	77	0	0	<b>77</b>	Dermatologie	0	35	0	<b>35</b>		
Gorge	2	67	0	<b>69</b>	Gynécologie/Obstétrique	15	1	3	<b>19</b>		
Prélèvement urétral	0	11	0	<b>11</b>	Maladies infectieuses	53	0	0	<b>53</b>		
Ganglion inguinal	0	1	0	<b>1</b>	Médecine interne	2	0	0	<b>2</b>		
Stérilet	1	0	0	<b>1</b>	Urgences	14	0	0	<b>14</b>		
Autre	0	1	0	<b>1</b>	Autre	0	1	14	<b>15</b>		
<b>Total</b>	<b>92</b>	<b>335</b>	<b>1</b>	<b>428</b>	<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>224</b>	<b>17</b>	<b>325</b>		

F, femme ; H, homme ; NR, non renseigné.

NR, non renseigné.

L'ensemble des échantillons a été obtenu à partir de 325 patients différents avec un ratio Homme/Femme de 2,8 et une moyenne d'âge de 31 ans (minimum 14 ans, maximum 66 ans). Les femmes ont entre 16 et 47 ans avec une moyenne de 26 ans et les hommes ont entre 14 et 66 ans avec une moyenne de 33 ans. Au total, 26% des patients étaient symptomatiques avant d'être prélevés.

L'évaluation des 4 kits est en cours.

## 2.2.2 Evaluation de trousse diagnostiques pour la LGV

Le CHU de Bordeaux a évalué **4 trousse de PCR en temps réel multiplex ou simplex pour le diagnostic de la LGV** avec détection de *C. trachomatis* génovar L :

- La trousse Allplex™ Genital ulcer Assay de Seegene revendue par Eurobio, qui détecte HSV 1 et 2, *Haemophilus ducreyi*, CMV, *C. trachomatis* génovar L, *T. pallidum* et VZV
- La trousse RealCycler ULCGEN-U/ULCGEN-G de Progenie Molecular revendue par Orgentec, qui détecte HSV 1 et 2, *C. trachomatis* génovar L et *T. pallidum*
- La trousse VIASURE *Haemophilus ducreyi* + CT LGV Real Time PCR Detection kit de CerTest BIOTEC revendue par Orgentec, qui détecte *C. trachomatis* génovar L et *H. ducreyi*
- La trousse RealCycler CHSL-U/CHSL-G de Progenie Molecular revendue par Orgentec, PCR en temps réel monoplex qui détecte *C. trachomatis* génovar L.

Les 4 trousse ont été testées sur 92 échantillons anorectaux sélectionnés sur la présence ou non de souches L (49 LGV, 43 non LGV) et sur la présence d'une syphilis active (45/92, par sérologie) chez des patients VIH (+) et VIH (-). La trousse simplex RealCycler CHSL-U/CHSL-G a été testée sur 123 échantillons anorectaux supplémentaires positifs à CT (17 cas LGV et 106 cas non L) prélevés chez des PrEPeurs. Tous les échantillons testés ont été sélectionnés à partir des prélèvements typés en 2017 dans le cadre du réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis*. La PCR LGV utilisée en routine au CNR est celle de Morré *et al*, 2005, ciblant le gène *pmpH* présentant une délétion spécifique des souches L. Les tests ont été réalisés sur le CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad), appareil validé pour les différentes trousse. Les performances des trousse multiplex pour la détection de la LGV, comparées à celles de la PCR maison sont montrées dans le Tableau dessous.

Trousse commercialisées	Echantillons testés n = 92 (Technique de référence)			Concordance % [IC 95%]	Sensibilité % [IC 95%]	Spécificité % [IC 95%]	Kappa
	LGV (n= 49)	Non LGV (n=43)	Invalide				
<b>RealCycler ULCGEN-U/ULCGEN-G (PROGENIE MOLECULAR)</b> cibles: HSV, <i>C. trachomatis</i> (LGV), <i>T. pallidum</i>	47	42	1	<b>96,7</b> [90,8-98,8]	<b>95,92</b> [86,2-98,8]	<b>100</b> [91-100]	0,978
<b>VIASURE <i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) Real Time PCR Detection kit (CerTest BIOTEC)</b> cibles : <i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV)	49	43	0	<b>100</b> [95,9-100]	<b>100</b> [92,7-100]	<b>100</b> [91,8-100]	1
<b>Allplex™ Genital Ulcer Assay (SEEGENE)</b> cibles : HSV, <i>H. ducreyi</i> , CMV, <i>C. trachomatis</i> (LGV), <i>T. pallidum</i> , VZV	45	39	3	<b>91,3</b> [83,7-95,5]	<b>91</b> [80,8-96,7]	<b>97</b> [87,1-99,5]	0,887
<b>RealCycler CHSL-U/CHSL-G (PROGENIE MOLECULAR)</b> cibles: <i>C. trachomatis</i> (LGV)	48	43	0	<b>98,9</b> [94,1-99,8]	<b>97,9</b> [83,3-99,6]	<b>100</b> [91,8-100]	0,955
	Echantillons testés n = 123 (Technique de référence)			Concordance % [IC 95%]	Sensibilité % [IC 95%]	Spécificité % [IC 95%]	Kappa
	LGV (n= 17)	Non LGV (n=106)	Invalide				
<b>RealCycler CHSL-U/CHSL-G (PROGENIE MOLECULAR)</b> cibles: <i>C. trachomatis</i> (LGV)	17	104	2	<b>98,3</b> [94,2-99,5]	<b>100</b> [81,4-100]	<b>100</b> [96,4-100]	1

Pour les trousse multiplex parmi les 45 patients ayant une syphilis active, 7 étaient positifs avec la trousse Allplex™ versus 8 avec la trousse ULCGEN (concordance 94,57% [IC 95% 87,9-97,6]). Les 47 patients syphilis (-) sont restés négatifs avec les deux trousse. En ce qui concerne l'HSV, 14 patients ont été détectés positifs avec la trousse Allplex™ versus 22 avec la trousse ULCGEN. Seuls 10 patients étaient concordants HSV (+) par les 2 trousse (concordance 78,2% [IC 95% 68,7-85,4]). Les autres cibles : CMV, VZV et *H. ducreyi* n'ont donné aucune amplification. En conclusion, les quatre tests ont montré d'excellentes performances pour la détection de LGV sur des échantillons rectaux validés par l'utilisation d'un contrôle d'amplification interne. Ces travaux ont été présentés à la RICAI 2019 sous forme de poster commenté et un manuscrit « Evaluation of four commercial real-time PCR assays for the detection of Lymphogranuloma venereum in *Chlamydia trachomatis*-positive anorectal samples », Touati *et al.*, vient d'être **publié dans Clin Microbiol Infect.**

### 2.2.3 Evaluation de la trousse multiplex Allplex™ Genital ulcer Assay (Seegene) commercialisée par Eurobio pour la détection de *T. pallidum* et *C. trachomatis* génovar L

L'évaluation des performances en termes de faisabilité, sensibilité, spécificité ainsi que les valeurs prédictives positive et négative pour la **détection de l'ADN de *T. pallidum* du test Allplex™ STI Genital ulcer Assay Multiplex real-time PCR System (Seegene)** a été réalisée au CNR à l'hôpital Cochin à Paris pour la syphilis en collaboration avec le CHU de Bordeaux pour confirmation des résultats positifs pour *C. trachomatis* génovar L et le CNR Herpes virus pour confirmation des résultats positifs pour ces virus.

Le test de détection génomique est une PCR multiplex qui permet la détection simultanée des ADN correspondant à herpes simplex virus type 1 (HSV-1), à herpes simplex virus type 2 (HSV-2), à *Haemophilus ducreyi* (HD), au Cytomegalovirus (CMV), à *C. trachomatis* génovar L (LGV.), à *T. pallidum* (TP), et au varicella-zoster virus (VZV).

#### MATERIEL ET METHODES

##### **Réactifs :**

Le kit d'extraction d'ADN InnuPREP Blood DNA Mini kit utilisé sur l'InnuPure C16 (Analytikjena) et le kit de PCR multiplex Allplex™ Genital ulcer Assay ont été achetés à la société EuroBio qui commercialise les kits de la gamme Seegene.

##### **Panel Syphilis**

Il est constitué d'un total de **389 écouvillons obtenus à partir d'ulcérations génitales, anales, buccales et cutanées documentées cliniquement et sérologiquement dans le cadre de l'Etude GENOSYPH** (CPP S.C. 3005, CNIL n°1208504) engagée par le CNR Syphilis en 2010 (panel «syphilis PCR écouvillon n°1» du CNR). Il s'agit d'échantillons anonymisés, provenant des CeGGID des hôpitaux Cochin, Saint Louis à Paris, de Metz-Thionville, de Nancy, de Valenciennes et des CeGGID de Marseille, d'Aix-en-Provence obtenus à partir de patients consultant pour des IST, ayant une suspicion de syphilis récente.

L'ensemble des écouvillons utilisés pour cette étude a été répertorié entre octobre 2010 et décembre 2016. Ils proviennent de 359 hommes et de 30 femmes avec un âge moyen de 37,9 ans dont 23 % sont positifs pour le VIH. Le panel est constitué de 137 syphilis primaires, 13 syphilis primo-secondaires, 67 syphilis secondaires, et 172 patients non infectés par *T. pallidum* (PCR et sérologie négatives) présentant une ulcération (tableau ci-dessous).

##### **Protocole d'évaluation**

Il se décompose en deux parties, extraction de l'ADN à partir des échantillons puis l'amplification génique. La mise en place de la réaction de PCR a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant avec 5 ul d'ADN et les contrôles recommandés avec l'appareil BioRad CFX96 Real-Time PCR System. Pour chaque échantillon testé, un contrôle interne d'amplification a été réalisé, permettant de valider la réaction de PCR.

#### RESULTATS

##### **Praticabilité technique**

Le test est extrêmement simple à réaliser, aucune erreur de manipulation n'a été faite.

## Patients

Tableau. Caractéristiques des patients constituant le panel «syphilis n°1».

Patient caractéristique	Patient avec syphilis			Patient sans Syphilis
	Primaire	Primo-secondaire	Secondaire	Ulcération documentée
Nombre total Population	137	13	67	172
Homme	135	12	64	145
Femme	2	1	0	27
Age				
Médian	37,5	40,0	40,5	33,0
Ecart	20 - 71	24 - 60	19 - 69	18 - 71
Orientation				
Homo	109	9	52	72
Hétéro	21	2	8	91
Non rens.	7	2	7	9
Infection				
HIV	38	4	31	17

## Performance

### Détection de *T. pallidum*

Sur l'ensemble des échantillons testés, 11 échantillons n'ont pas été amplifiés et invalidés suite à la non amplification du contrôle interne. Ces 11 échantillons ont été repassés et 4 ont pu être validés.

Pour les échantillons validés, le Ct moyen (Ct<sub>moy</sub>) du contrôle interne d'amplification s'établit à 25,98 et pour *T. pallidum* Ct<sub>moy</sub> = 27,74.

L'ensemble des résultats obtenus sur les échantillons est présenté dans le Tableau ci-dessous et sont comparés au test nPCR utilisé en routine par le CNR.

### Détection de la LGV

Les échantillons testés positifs pour *C. trachomatis* génovar L ont été re-testés par le CNR IST à Bordeaux.

Sur les 5 échantillons positifs pour *C. trachomatis* génovar L en multiplex (Ct<sub>moy</sub> = 29,47), 3 ont été validés (Ct<sub>moy</sub> = 31,36).

### Détection de Herpes simplex 1&2

Les échantillons testés positifs pour Herpes simplex 1&2 ont été re-testés par le CNR des Herpes virus à La Pitié Salpêtrière à Paris. Sur les 81 échantillons ont été positifs pour HSV-1 ou HSV-2, 1 échantillon n'a pas pu être re-testé par manque de matériel. Sur les 80 échantillons positifs pour *Herpes simplex 1&2* en multiplex (Ct moyen = 24,57), 80 ont été validés (Ct moyen = 24,09).

Plus particulièrement nous avons détecté :

42 échantillons positifs pour HSV-1 (Ct<sub>moy</sub> = 25,28) dont 40 ont été validés (Ct<sub>moy</sub> = 25,45)

38 échantillons positifs pour HSV-2 (Ct<sub>moy</sub> = 23,75) dont 38 ont été validés (Ct<sub>moy</sub> = 22,35).

### Détection de CMV

Six échantillons ont été positifs pour le CMV.

### Détection de VZV et *H. ducreyi*

Aucun échantillon n'a été trouvé positif pour le VZV et pour *H. ducreyi*.

## Sensibilité et spécificité du test Allplex Genital ulcer assay (Seegene).

Panel	Test Allplex Genital ulcer Assay						Résultat attendu <sup>a</sup>					
	VP	FN	VN	FP	Se	Sp	VP	FN	VN	FP	Se	Sp
Tout stade (n = 389)	165	41	166	2	80	99	173	33	168	0	84	100
<b>Patient avec syphilis (n = 217)</b>												
Primaire (n = 137)	108	26			81	/	111	23			83	/
Primo-secondaire (n = 13)	10	3			77	/	10	3			77	/
Secondaire (n = 67)	47	12			80	/	52	7			88	/
<b>Patient sans syphilis (n = 172)</b>			166	2		99			168	0		100

<sup>a</sup> Les écouvillons ont été testés en parallèle avec la nested PCR validée par le CNR pour la détection de *T. pallidum*. (VP : vrais positif ; FN : faux négatif ; VN : vrai négatif, FP : faux positif ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité)

Pour les syphilis primaires et secondaires, les sensibilités de détection sont identiques à 81% et 80%, respectivement. Les syphilis primo-secondaires sont détectées avec une sensibilité de 77%, mais seulement 13 échantillons sont disponibles. Sur l'ensemble du panel testé, la spécificité de détection est de 99%.

### Conclusions

Sur l'ensemble du panel, la sensibilité et la spécificité (80% et 99%) de détection du génome de *T. pallidum* par ce test multiplex sont comparables au test de nested PCR maison validé (Se 84% et 100%) et utilisé en routine par le CNR IST bactériennes expertise syphilis. Il est cependant noté une sensibilité de détection plus basse dans les échantillons de syphilis secondaire pour le test PCR multiplex. **Un manuscrit, « Use of a multiplex PCR assay to assess the presence of sexually transmitted microorganisms in mucocutaneous ulcerations in patients with suspected syphilis », Grange et al, est en cours de révision dans J Clin Microbiol.**

### 2.2.4 Trousses évaluant la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*

Cette étude prospective a inclus tous les échantillons positifs à *M. genitalium* par PCR Taqman maison obtenus entre le 1<sup>er</sup> août et 31 décembre 2018 au CNR des IST bactériennes.

Les contrôles internes de chaque kit ont été ajoutés aux échantillons avant nouvelle extraction avec le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume sur l'instrument MagNa Pure 96 (Roche). L'absence d'inhibition d'amplification liée à l'addition de ces trois contrôles internes a été vérifiée.

Les extraits d'ADN ont été soumis à quatre tests pour la détection des mutations associées à la résistance :

- **Kit S-DiaMGRES (Diagenode)**

- **Kit Real accurate TVMG<sub>RES</sub> (PathoFinder)**

- **Kit ResistancePlus MG (SpeedX)**

- PCR FRET maison (Touati *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014, 52, 1549-55) et séquençage de l'ARNr 23S utilisée comme méthode de référence.

L'ensemble des tests a été réalisé sur l'instrument LightCycler 480 II.

Un total de 195 échantillons positifs à *M. genitalium* a été analysé.

Concernant, la détection de *M. genitalium*, la concordance positive était similaire pour les trois kits avec des valeurs comprises entre 94,8 % et 96,4 % (Tableau ci-dessous).

**Tableau. Concordance pour la détection de *M. genitalium* avec la PCR Taqman maison.**

Tests commerciaux	Détection de <i>M. genitalium</i>			Concordance positive % [IC]
	Positive	Négative	CI Invalide	
<b>S-DiaMGRes™</b> Diagenode	183	10	2	<b>94,8</b> [90,7-97,2]
<b>Real Accurate TVMGRES</b> Pathofinder	188	7	0	<b>96,4</b> [92,8-98,3]
<b>ResistancePlus™ MG</b> SpeeDx	185	9	1	<b>95,4</b> [91,4-97,5]

CI : contrôle interne ; IC : intervalle de confiance.

Concernant la détection de la résistance aux macrolides, 154 échantillons positifs à *M. genitalium* avec les trois kits pour lesquels l'ARNr 23S a été séquencé avec succès ont été comparés. La sensibilité clinique des trois kits pour la détection de la résistance aux macrolides était comprise entre 95 % et 100 % et la spécificité clinique était comprise entre 94,6 % et 97,3 % **sans différence statistiquement significative** (Tableau ci-dessous).

**Tableau. Performances cliniques des trois kits commerciaux pour la détection de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*.**

Tests commerciaux	23S ARNr mutation	Séquençage Sanger ARNr 23S		Sensibilité % [IC]	Spécificité % [IC]
		23S ARNr muté	23S ARNr sauvage		
<b>S-DiaMGRes™</b> Diagenode	Présente	80	2	<b>100</b> [95,4-100]	<b>97,3</b> [90,7-99,3]
	Absente	0	72		
<b>Real Accurate TVMGRES</b> Pathofinder	Présente	76	2	<b>95,0</b> [87,8-98,0]	<b>97,3</b> [90,7-99,3]
	Absente	4	72		
<b>ResistancePlus™ MG</b> SpeeDx	Présente	80	4	<b>100</b> [95,4-100]	<b>94,6</b> [86,9-97,9]
	Absente	0	70		

IC : intervalle de confiance.

Cette étude a fait l'objet de **2 posters présentés en 2019** au STI and HIV world Congress, Vancouver, Canada et à la RICAI et **d'une publication** : Le Roy C., et al. (2020), "Clinical Evaluation of Three Commercial PCR Assays for the Detection of Macrolide Resistance in *Mycoplasma genitalium*." J. Clin. Microbiol. 58(2).

### 2.2.5 Trousses de diagnostic sérologique de la syphilis

L'évaluation des performances en termes de sensibilité et spécificité de **tests tréponémiques (TT), de confirmation par Western Bot (WB) ou Immuno Blot (IB)**,

- Réactif Marblot Treponema Pallidum IgG/IgM (WB, Orgentec, trinity Biotec) par Western Blot,
- Réactif Treponema pallidum Line IgM/IgG (IB, Eurobio-Ingen), réactif recomLine IgG/IgM (IB, Diasorin),
- Réactif Euroline-WB TP IgG/IgM (IB, EuroImmune) par ImmunoBlot,

a été réalisée au laboratoire du CNR IST bactériennes expertise syphilis de l'hôpital Cochin. Le TT de confirmation Western Blot ou ImmunoBlot, permet la détection qualitative et semi-quantitative d'anticorps IgG ou IgM anti-*T. pallidum* dans le sérum humain.

### Matériel et méthodes

#### Réactifs

Les trousses ont été fournies par les différentes sociétés Diasorin, Orgentec, Euro-Ingen, EuroImmune. Les trousses ont été fournies par les différentes firmes correspondantes.

### Panel

Il est constitué de 55 sérums de l'Etude Microbiologique de la Syphilis (EMS) engagée par le CNR en 2008 (panel «syphilis n°1 du CNR»). Il s'agit d'échantillons, provenant principalement des hôpitaux Tarnier et Saint Louis à Paris, de patients consultant pour des IST en CDAG (consultation de dépistage anonyme et gratuite) ou CIDDIST (consultation d'information de diagnostic et dépistage des IST), ayant une suspicion de syphilis récente.

La syphilis récente inclut la syphilis primaire -une ou plusieurs ulcérations de type syphilitique (chancre) avec mise en évidence de *T.pallidum* dans les prélèvements par un examen au fond noir ou par un test d'amplification nucléique (PCR)-, la syphilis secondaire -lésions cutanéomuqueuses et une sérologie non tréponémique (VDRL ou RPR) positive associée à une sérologie tréponémique (TPHA ou ELISA) positive-, la syphilis latente précoce -stade clinique silencieux d'une syphilis datant de moins d'un an.

Les sérums conservés à -20°C, ont été décongelés une fois et aliquotés de façon à pouvoir réaliser l'ensemble des évaluations en n'ayant subi qu'une seule décongélation-congélation avant chaque essai. Les sérums ont été numérotés, afin de réaliser les évaluations en aveugle, sans connaissance des résultats pour ne pas influencer la lecture.

Le «gold standard» est déterminé sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques (résultats du fond noir et de la PCR réalisés en cas de lésions, et résultats sérologiques). Une rencontre avec les médecins préleveurs ayant participé à l'étude a permis de déterminer de façon consensuelle le statut clinique de chaque patient inclus (36 sérums ont été exclus par manque de diagnostic de certitude). Le panel est donc constitué de 44 syphilis primaires, 7 syphilis secondaires, 4 syphilis latentes précoces (cf Tableau ci-dessous).

**Tableau. Caractéristiques des patients constituant le panel «syphilis n°1».**

	Syphilis primaire (n = 44)	Syphilis secondaire (n = 7)	Syphilis latente précoce (n = 4)
Homme	44	7	4
Femme	0	0	0
Age moyen (année)	38	36	25
Séropositif pour le VIH	14	0	0
Séronégatif pour le VIH	30	7	4

### **Protocole d'évaluation**

Les tests ont été réalisés sur l'autoBlot semi-manuel (Euro-Ingen) selon leur protocole.

### **Résultats**

#### Praticabilité technique

Les tests sont extrêmement simples à réaliser. Aucun échantillon n'a été éliminé malgré la présence d'hémolyse pouvant rendre le résultat ininterprétable. Il n'a pas été constaté de problème de rendu de résultat lié au statut VIH (14 séropositifs sur 55 patients) et quel que soit le stade de la syphilis (primaire, secondaire, latente précoce).

#### Patients

L'ensemble des sérums utilisés pour cette étude a été répertorié entre mars 2007 et février 2009. Ils proviennent de 55 patients de sexe masculin, âge moyen 36 ans, dont 31% sont positifs pour le VIH.

#### Performance

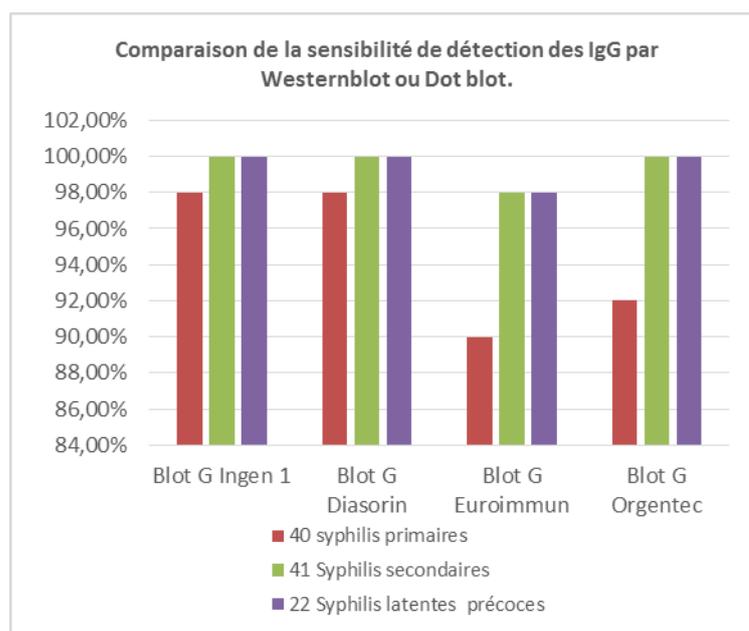
Tous les contrôles de qualité internes ont été corrects validant les résultats. Ceux-ci sont présentés et comparés au test tréponémique utilisé en routine (Tableau ci-dessous).

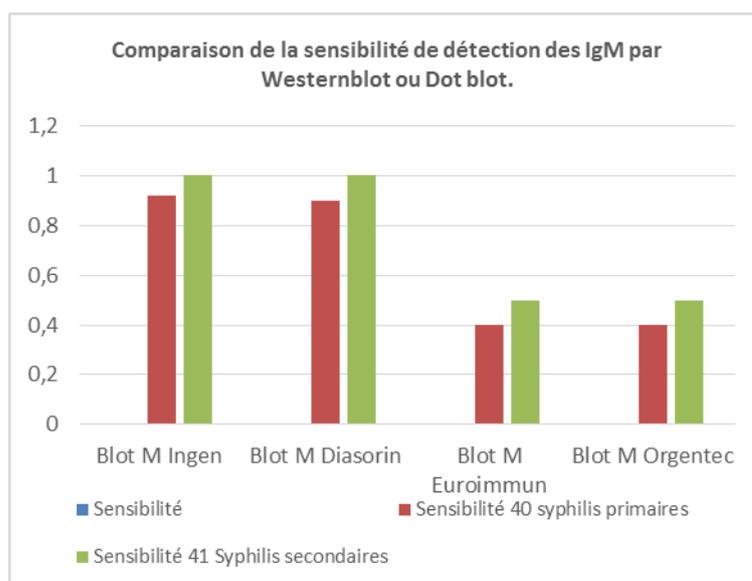
**Tableau : Sensibilité des tests tréponémiques sur les 55 sérums du panel «syphilis n°1».**

TEST	Panel	Syphilis primaire	Syphilis secondaire	Syphilis latente précoce
Référence CNR	Sensibilité (%)	92(IgM)	100(IgM)	92(IgM)
Treponema pallidum Line IgM/IgG (EuroIngen)		98(IgG)	100(IgG)	100(IgG)
recomLine IgG/IgM, Diasorin	Sensibilité (%)	90(IgM)	100(IgM)	88(IgM)
		98(IgG)	100(IgG)	100(IgG)
Marblot Treponema Pallidum IgG/IgM (Orgentec)	Sensibilité (%)	30 (IgM)	50(IgM)	50(IgM)
		92 (IgG)	100(IgG)	100(IgG)
Euroline-WB TP IgG/IgM (EuroImmun)	Sensibilité (%)	40(IgM)	50(IgM)	40(IgM)
		90(IgG)	98(IgG)	98(IgG)

### Conclusion

Dans les syphilis primaires, la sensibilité varie de 30 à 98% pour les IgM et entre 98 à 100% pour les IgG, dans la syphilis secondaire la sensibilité varie de 50 à 100% pour les IgM et entre 98% à 100% pour les IgG, dans les syphilis latentes précoces la sensibilité varie de 40 à 92% pour les IgM et entre 98% et 100% pour les IgG . La syphilis primaire correspond à une période de séroconversion de la syphilis reflétée par une sensibilité plus faible des tests Euroline-WB TP IgG/IgM, distribué par EuroImmun et Marblot Treponema Pallidum IgG/IgM distribué par Orgentec. La spécificité est de 100%.





**La validation du Test Tréponémique pour le diagnostic sérologique de la syphilis dans le LCR (Architect Abbott)** est en cours. Une quantité d'échantillons suffisante doit être obtenue pour évaluer la trousse commerciale.

### Contrôle qualité

Mise en place d'un contrôle qualité national pour la sérologie syphilis en collaboration avec l'ANSM en cours. Essai du contrôle externe EEQ Accuren 256 VDRL sur LCR et mise en route.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

### 2.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

La PCR diagnostique pour la LGV a été transférée aux laboratoires de Microbiologie des CHU de Limoges et de Rouen.

### 2.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Aucune technique n'a été transférée.

### 2.3.3 Laboratoire APHP Cochin

Aucune technique n'a été transférée.

## 2.4 Collections de matériel biologique

### 2.4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Matériel biologique envoyé au CRB Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux, entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 31 décembre 2019 :

- 2383 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV en 2019, 53 échantillons anorectaux et cervicaux positifs à *C. trachomatis* (extraits de prélèvements de personnes à risques d'IST au Togo, collaboration étude ANRS).
- 828 échantillons positifs à *C. trachomatis* reçus dans le cadre de l'enquête de prévalence des infections urogénitales à *C. trachomatis* dans les départements et régions d'outre-mer en 2018 (DROM 2018).
- 98 souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux.
- 483 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* envoyés au CNR en 2019 dans le cadre de la recherche de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones.
- 614 échantillons positifs à *M. genitalium* dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en 2018 dont 336 provenant de France métropolitaine (MYCOMET 2018) et 278 provenant des départements et régions d'outre-mer (DROM 2018), 62 extraits de échantillons positifs à *M. genitalium* de personnes à risques d'IST au Togo (collaboration étude ANRS).
- 111 souches de *Ureaplasma* spp. et 20 souches de *M. hominis* isolées dans le cadre de l'enquête de détermination de la sensibilité aux antibiotiques de ces 2 espèces en France métropolitaine (MYCOMET 2018) ainsi que 90 souches d'uréaplasmes et 10 souches de *M. hominis* isolées et antibiogrammées au CHU de Bordeaux en 2019.

## 2.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Matériel biologique conservé au CNR à l'hôpital Saint-Louis, entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 31 décembre 2019 :

Collection de 943 souches de gonocoque

- 376 souches isolées en 2019 dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance du gonocoque en France métropolitaine (ENGON 2019).
- 160 souches isolées en 2018 dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance du gonocoque en France métropolitaine (ENGON 2018).
- 317 souches isolées dans le cadre du Réseau Renago 2018, visant à surveiller la résistance du gonocoque en France métropolitaine.
- 25 souches isolées chez une cohorte de PrEPeurs à Bordeaux en 2019.
- 14 souches isolées d'infections invasives en 2019.
- 4 souches de sensibilité diminuée ou résistantes en 2019.
- 10 souches provenant du contrôle de qualité de l'ECDC (UKNEQAS).
- 46 souches issues de demande d'expertise au CNR en 2019.

Collection de 942 prélèvements cliniques positifs à gonocoque (depuis 2017)

- 219 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* dans le cadre de l'étude Mémodépistages-REMIND (175 d'Ile de France, 31 de Lyon, 13 de Montpellier) en 2018 et 54 en 2019.
- 24 prélèvements positifs à gonocoque issus de cas cliniques expertisés au CNR en 2019.
- 428 échantillons positifs à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis* de la comparaison de 4 kits pour CT/NG/MG/TV.
- 207 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* reçus dans le cadre de l'enquête de la résistance du gonocoque dans les départements et régions d'outre-mer en 2017 et 2018.
- 2 extraits d'ADN positifs à gonocoque issus d'infections à gonocoque chez des femmes HIV-positives et HIV-négatives au Mali.
- 52 extraits d'ADN positifs à gonocoque issus d'infections à gonocoque chez des femmes travailleuses du sexe et des HSH à Lomé, Togo.

Collection de séquences de génomes complets

- 396 génomes séquencés de souches en NGS en 2019

## 2.4.3 Laboratoire APHP Cochin

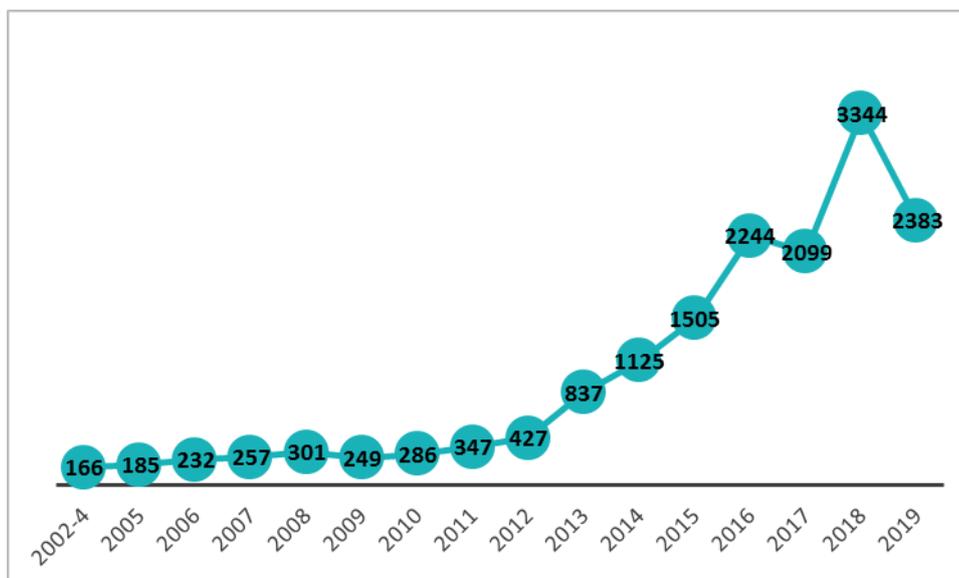
Matériel biologique envoyé au CNR en 2019 :

- 674 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise moléculaire, dont 28 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 1336 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise sérologique, dont 638 ont été positifs pour la syphilis.
- 167 échantillons analysés dans le cadre du protocole génosyph, dont 28 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 71 échantillons ont été expertisés dans le cadre de l'étude IPERGAY dont 6 ont été positifs pour *T. pallidum*.
- 30 échantillons provenant d'ulcérations génitales analysés pour la présence des marqueurs génétiques potentiels de résistance à la doxycycline.
- 104 échantillons provenant d'ulcérations génitales analysés pour la présence des marqueurs génétiques de résistance à l'azithromycine.

## 2.5 Activités d'expertise

### 2.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

En 2019, dans le cadre du **réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis***, le CNR a reçu et typé 2383 échantillons dont 2363 d'origine anorectale. Cette activité est en baisse par rapport à 2018 comme le montre la Figure ci-dessous. Face à la charge de travail en 2018, il avait été décidé d'arrêter le typage systématique des patients sous PrEP ; en effet, la surveillance de cette population spécifique de sujets HIV-négatifs et asymptomatiques au sein du réseau en 2017 et 2018 n'a pas montré plus de cas de LGV dans cette population que chez les sujets HIV-négatifs et asymptomatiques ne bénéficiant pas de la PrEP. La surveillance des PrEPeurs n'est plus prise en charge par ce réseau mais fera l'objet d'enquêtes ponctuelles.



**Figure. Évolution du nombre d'échantillons reçus au CNR depuis 2002.**

Les 20 échantillons non rectaux se répartissent en 6 adénopathies, 4 échantillons pharyngés, 2 urines, 2 liquides péritonéaux, 1 ulcération génitale, 1 ulcération buccale, 1 écouvillon vaginal, 1 urètre, 1 écouvillon conjonctival et 1 biopsie colique. Les résultats du typage sont donnés dans le Tableau suivant :

**Tableau. Nature des échantillons extra-rectaux typés dans le cadre du réseau de surveillance de la LGV.**

Nature de l'échantillon	Souche L	Souche non L
Adénopathie	6	
Biopsie colique		1
Conjonctival		1
Liquide péritonéal		2
Pharyngé		4
Ulcération buccale		1
Ulcération génitale	1	
Urètre		1
Urine		2
Vaginal		1

**L'activité d'expertise concernant les mycoplasmes urogénitaux** est à nouveau en très forte hausse. Si 269 échantillons avaient été pris en charge en 2018, un total de 529 échantillons a été analysés en 2019 (Tableau ci-dessous) soit une augmentation de 79%.

Tableau. Activité d'expertise, mycoplasmes urogénitaux, 2019.

	Nombre d'échantillons
<b>Culture, antibiogrammes et CMI de <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i></b>	
CH LE MANS	3
CHU LYON LA CROIX ROUSSE	2
CHARLES PERRENS	2
CHU ANGERS	2
CH LIBOURNE ROBERT BOULIN	1
LABM ANALYSIS EPINAL	1
CH DE SENLIS	1
CHU MONTPELLIER LAPEYRONIE	1
CHI POISSY	1
CHU CAVALE BLANCHE	1
CH ROBERT DEBRE	1
GYNECOLOGUE	1
CH PAU	1
LABM CAHORS	1
<b>Total</b>	<b>19</b>
<b>PCR <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i></b>	
CH LE MANS	4
CHU ANGERS	3
CHU RENNES PONTCHAILLOU	2
LHUB-ULB BRUXELLES	2
CH ARGENTEUIL	1
CH CAMBERY	1
CH PAU	1
CH PERIGUEUX	1
CH ROBERT DEBRE	1
CH SAINT NAZAIRE	1
CH SAINTONGE GCS	1
CHU DIJON BOURGOGNE	1
CHU HOPITAL ARCHET	1
CHU LYON LA CROIX ROUSSE	1
CHU MONTPELLIER	1
CHU STRASBOURG CIVIL	1
CHU TOURS BRETONNEAU	1
HOPITAL SAINT ANTOINE	1
LABM BIOFUSION	1
LABM DES CENTRES DE SANTE	1
<b>Total</b>	<b>27</b>
<b>Mutations associées à la résistance aux macrolides et/ou aux fluoroquinolones de <i>M. genitalium</i></b>	
CHU NANCY - BRABOIS	58
HOPITAL LOUIS MOURIER	59
LABM LXBIO	43
LABM BASSIN POTASSIQUE	41
LABM BIOFFICE	39
CHI TOULON - HOPITAL SAINTE MUSSE	36
LABM CERBALLIANCE	19
HOPITAL SAINT ANTOINE	18
CHRU BREST - HOP LA CAVALE BLANCHE	16
LABM EXALAB	15
CHU LILLE - A. CALMETTE	12
CHU NANTES	11
CHU DIJON	10
CHU POITIERS	9
CH MONTREUIL - ANDRE GREGOIRE	8

CHR ORLEANS - HOP DE LA SOURCE	6
CH LENS	5
CHU LYON LA CROIX ROUSSE	5
CH BESANCON MINJOZ	4
LABM CERBA	4
CH BAYONNE COTE BASQUE	3
CH LA ROCHE-SUR-YON	3
CH LIBOURNE	3
CHU ROUEN - CHARLES NICOLLE	3
HOPITAL ANTOINE BECLERE	3
CH MAYENNE	2
CH RODEZ	2
CHU NICE - ARCHET	2
CHU TOULOUSE	2
HOPITAL COCHIN	2
INSTITUT ALFRED FOURNIER	2
LABM EUROFINS BIOFFICE	2
LABM EUROPEEN	2
BIO LAM LCD LOURMEL	1
BIORYLIS La Roche / Yon	1
CH ANNECY	1
CH ANNECY GENEVOIS	1
CH CHALON - WILLIAM MOREY	1
CH CHARLEVILLE MEZIERES	1
CH CHARTRES	1
CH DAX	1
CH FELIX GUYON - REUNION	1
CH SAINT BRIEUC	1
CH TOURCOING	1
CH VALENCIENNES	1
CHU AMBROISE PARE	1
CHU CAEN	1
CHU CLERMONT-FERRAND - GABRIEL-MONTPIED	1
CHU GRENOBLE	1
CHU RENNES	1
CHU TENON	1
HIA BEGIN	1
HIA SAINTE ANNE	1
HOPITAL BICETRE	1
HOPITAL NECKER	1
HOPITAL PITIE-SALPETRIERE	1
INSTITUT MUTUALISTE MONTSOURIS	1
LABM ALLIANCE ANABIO	1
LABM ANA-L	1
LABM BIO PARIS OUEST	1
LABM BIOCONTACT	1
LABM BIOESTEREL	1
LABM CANARETI-FERNANDEZ - Ajaccio	1
LABM GERARD NOET	1
LABM KETTERHILL	1
LABM SELAS ALPHABIO	1
POLYCLINIQUE JEAN VILLARD	1
<b>Total</b>	<b>483</b>

Les résultats concernant les mycoplasmes urogénitaux sont transmis dans un délai de quatre jours ouvrables pour la culture et l'antibiogramme de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* ainsi que pour que la recherche de mutations associées à la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*. Les PCR *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* et les CMI sont rendues en une semaine, la recherche de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones en deux semaines.

## 2.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Au cours de l'année 2019, le CNR a reçu un total de 46 souches de gonocoque et 24 prélèvements cliniques provenant de 26 Centres Hospitaliers ou laboratoires pour une expertise dans le cadre d'une suspicion de gonococcie (cf. Tableau ci-dessous).

**Tableau. Activités d'expertise gonocoques, 2019.**

<b>Cultures et antibiogrammes de <i>N. gonorrhoeae</i></b>	<b>Nb souches</b>
SELAS BIOLARIS - SITE PDM	1
CHU LYON	3
CH CORNOUAILLE	1
HOPITAL JEAN VERDIER	1
LABORATOIRE CH JACQUES MONOD	1
HOPITAL ROBERT DEBRE	1
LABORATOIRE BIOPAJ VAUBAN	3
ASTRALAB / MEDECIN GENERALISTE	3
LABORATOIRE GAMBET / GENERALISTE	2
CHU BICETRE	7
LABORATOIRE FRADET / SAGE FEMME	1
CHU FORT DE FRANCE / LBM MS BIO POLE ANTILLES	1
GCS DE LA MAYENNE	2
EUROFINS BIOMNIS / GENERALISTE	1
LBM CHARENTE-MARITIME NORD	2
LABORATOIRE SCHUH / GENERALISTE	1
SELAS BIO-CITY / GENERALISTE	1
LABORATOIRE D'EVRON / GENERALISTE	1
HOPITAUX DROME NORD - SITE ROMANS	1
CENTRE HOSPITALIER METROPOLE SAVOIE	1
LBM MS BIO POLE ANTILLES	1
LABORATOIRE DES ANDAINE - SELAS NORMABIO	4
CH SAINT JOSEPH SAINT LUC	1
GROUPE HOSPITALIER SUD ILE DE FRANCE	2
CENTRE HOSPITALIER INTERCOMMUNAL DES ALPES DU SUD	2
CH DE NIORT	1
<b>Total</b>	<b>46</b>
<b>PCR <i>N. gonorrhoeae</i></b>	<b>Nb</b>
	<b>prélèvements</b>
LBM DU GCS DE LA MAYENNE	1
HOPITAL SAINT LOUIS	1
LABORATOIRE NATIONAL DE SANTE DU LUXEMBOURG	1
CHU GABRIEL MONTPIED	8
CENTRE HOSPITALIER METROPOLE SAVOIE	1
CH SENS	7
CERBALLIANCE PARIS / CENTRE MEDICAL DES GENOTTES	1
CH BOURG EN BRESSE	1
ORIADE-NOVIALE	1
CENTRE HOSPITALIER INTERCOMMUNAL DE CRETEIL	1
LABO G.NOET	1
<b>Total</b>	<b>24</b>

### 2.5.3 Laboratoire APHP Cochin

Année 2019

#### Dans le cadre de l'expertise :

- Nombre des centres participants :	129	>90% laboratoires hospitaliers
- Nombre total d'expertises :	2010	33,5% PCR et 66,5% sérologies
- Nombre total d'échantillons :	1045	
LCR	323	3,1% positifs par nPCR et 9,7% par sérologie
Périnataux <sup>a</sup>	211	1,0% positifs par nPCR
Ecouvillon	91	16,5% positifs par nPCR
Biopsie	24	4,2% positifs par nPCR
Sérum	362	47,8% positifs par nPCR et/ou sérologie
Sang total	19	0% positifs par nPCR
Autre	11	9,0% positifs par nPCR

<sup>a</sup> Placenta, liquide amniotique, cordon, sang cordon, écouvillons, nasaux/buccaux, sécrétions naso-pharyngées, sang total

Le délai moyen de restitution des résultats est de 5,3 jours pour la PCR, de 6,3 jours pour la sérologie sanguine et de 6,8 jours pour la sérologie du LCR.

## 2.6 Activités de séquençage

### 2.6.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Nous n'avons pas eu d'activité de séquençage génomique pour l'année 2019. De tels séquençages à partir d'échantillons sans avoir de souche sont très difficiles à réaliser et restent du domaine de la recherche.

### 2.6.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

#### Séquençage NGS

En 2019, le NGS a été de plus en plus utilisé et a remplacé le NG-MAST pour le suivi épidémiologique des souches de *N. gonorrhoeae*. Il permet une analyse plus fine et discriminante avec l'extraction *in silico* des gènes utiles au typage moléculaire pour déterminer les types NG-MAST, MLST, NG-NGSTAR et les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques. Le séquençage depuis l'extraction jusqu'à l'analyse bio-informatique est réalisé à l'hôpital Saint-Louis pour les souches de gonocoque mais la technique n'est pas déployée à partir des échantillons cliniques primaires. Pour les échantillons cliniques, le CNR conserve le séquençage Sanger permettant un typage NG-MAST (75 échantillons typés en 2019). Le Tableau ci-dessous rapporte les 390 souches séquencées en NGS. Les résultats des séquençages sont décrits dans les chapitres surveillance et recherche.

Tableau. Récapitulatif des séquençages, 2019.

Séquençage des souches de gonocoques par NGS	
Souches ayant une CMI du céfixime $\geq 0.125$ mg/L (2008-2016)	164
Souches issues de PrEPeurs (cohorte de Bordeaux)	24
Souches de Haïti (Port au Prince)	27
Souches de référence pour le CNR	4
Souches ENGON2018	158
Souches invasives reçues au CNR	9
Souches résistantes / à sensibilité diminuée aux C3G	4
<b>Total</b>	<b>390</b>

## Analyse des runs à l'aide du « pipeline » bioinformatique

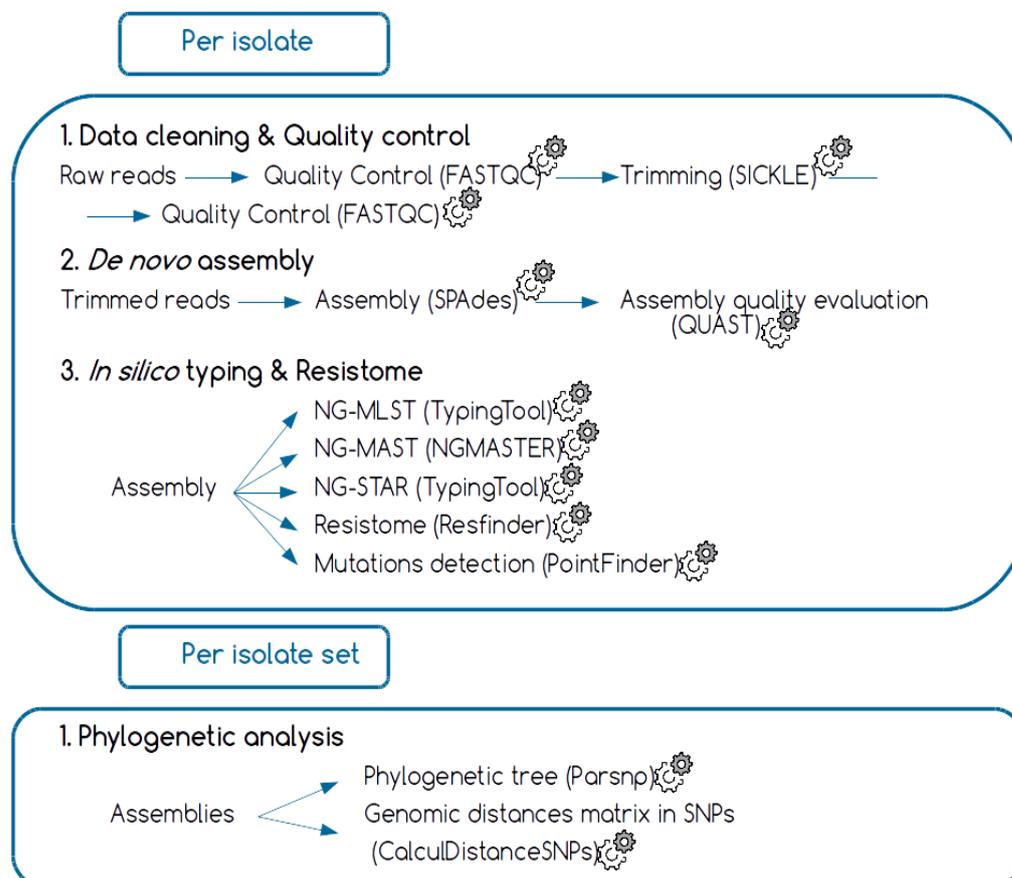
Les données brutes issues du séquençage haut débit de *N. gonorrhoeae* sont stockées sur deux serveurs :

- Sur un serveur français agréé pour l'hébergement de données de santé et de recherche mise en place par la plateforme bioinformatique de l'APHP « MOABI » <http://idfseqit.fr/>
- Sur le serveur de la plate-forme MAGE Microscope (Genoscope, Évry) qui héberge et annote nos génomes de référence ainsi que d'autres génomes d'intérêt.

Les runs sont analysés avec le pipeline d'analyse des données de séquençage du génome de *N. gonorrhoeae* (NG-AR2T) situé sur le portail web G-route de la plateforme Moabi (Figure ci-dessous)

Le déploiement du pipeline sur cette interface permet la génération d'un rapport épidémiologique complet automatisé. Ce rapport comprend :

- (I) Le contrôle qualité et l'assemblage *de novo* des données de séquençage
- (II) Le typage moléculaire *in silico* pour déterminer le NG-MAST, le MLST et le NG-STAR
- (III) La caractérisation des déterminants de la résistance aux antibiotiques ainsi que la détection des mutations chromosomiques connues et présentes sur ces gènes
- (IV) La construction d'un arbre phylogénétique et le calcul des distances génomiques pour tracer les liens épidémiologiques entre les isolats, comme l'indique le processus bioinformatique schématisé ci-dessous.



**Figure. Schéma du pipeline personnalisé NG-AR2T (*Neisseria gonorrhoeae* genome Assembly, Resistome, Typing & Tree)**

En 2019, afin d'assurer la surveillance des clones circulants en Europe, le laboratoire de St Louis a envoyé pour l'enquête de surveillance EuroGasp 2018, 55 souches pour lesquelles le NGS a été centralisé. Le CNR a effectué en parallèle le séquençage des souches dans un but de contrôle qualité de son processus bio-informatique. Il est prévu pour les années suivantes les envois de fichiers en format fastq.

### 2.6.3 Laboratoire APHP Cochin

A ce jour, le séquençage du génome de *T. pallidum* par NGS ou WGS n'est pas possible du fait de l'incapacité de cultiver la souche sur milieu artificiel et de la très faible proportion de son matériel génétique dans les échantillons, qui sont contaminés par de l'ADN humain. A l'heure actuelle, la seule possibilité de séquençage repose sur une étape d'amplification préalable de l'ADN de *T. pallidum* à partir des échantillons cliniques à des fins de typage moléculaire épidémiologique, non réalisable en routine.

## 3 Activités de surveillance

### Laboratoire CHU de Bordeaux : éléments clefs 2019

La surveillance des infections à *C. trachomatis* en 2019 a concerné les infections anorectales dans le cadre du réseau LGV. Les points marquants sont :

- Une baisse du nombre de nos correspondants cliniciens due à l'arrêt de la surveillance des PrEPeurs.
- Un nombre de cas de LGV qui se stabilise.
- Un nombre de cas non LGV qui diminue en raison de l'arrêt de la surveillance des PrEPeurs.

La surveillance des infections urogénitales à *C. trachomatis* ayant porté sur 2 ans sur la métropole et l'outre-mer, il ne sera pas réalisé d'études supplémentaires sur le reste de la mandature. En effet, la répartition des génotypes est stable et ne présente pas de phénomène inhabituel nécessitant une surveillance épidémiologique rapprochée. Un manuscrit est en cours de soumission au Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (B. de Barbeyrac, C. Laurier-Nadalié, A. Touati, S. Trombert, O. Peuchant, N. Nangro Ndeikoundam, C. Bébéar. Distribution des génotypes des souches urogénitales de *Chlamydia trachomatis* en France métropolitaine et outre-mer en 2017-2018).

La surveillance de la résistance aux anti-infectieux de *M. genitalium* en France métropolitaine rapporte une prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones de *M. genitalium* à respectivement 34,5% et 15,6%. Ces chiffres élevés sont stables à laboratoires constants par rapport à ceux de 2018. En outre-mer, la prévalence de la résistance aux macrolides était de 14,7% en 2019 vs 6,1% en 2018 et celle aux fluoroquinolones de 2,6% en 2019 vs 1,3% en 2018. L'augmentation significative de la résistance aux macrolides de *M. genitalium* entre 2018 et 2019 en outre-mer ne concerne que les femmes. Il faut également noter qu'en 2018 et en 2019, la résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones et la double résistance macrolides-fluoroquinolones étaient statistiquement plus élevées en France métropolitaine qu'en outre-mer.

### Laboratoire GH Saint-Louis : éléments clefs 2019

La surveillance des infections à gonocoques en 2019 a rapporté plusieurs cas d'infections invasives sévères dont 2 cas de kératoconjunctivites, 4 cas de gonococcémie avec une endocardite et un choc septique entraînant le décès.

Les règles de la SFM pour la réalisation et l'interprétation de l'antibiogramme du gonocoque ont été harmonisées en 2019 avec celles de l'EUCAST. La détermination de la résistance à l'azithromycine et à la gentamicine est liée à l'Ecoff en l'absence de breakpoints.

La surveillance de la résistance aux anti-infectieux du gonocoque en France métropolitaine en 2019 rapporte une nouvelle souche résistante aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, importée du Cambodge. La prévalence de la résistance du gonocoque en 2019 est de 0,2% à la ceftriaxone, 0,8%, au céfixime, 6,9% à l'azithromycine, 60,1% aux fluoroquinolones, 65,2% à la tétracycline et 0% à la spectinomycine. Les valeurs de CMI de la gentamicine sont inférieures ou égales à l'Ecoff. Ces chiffres confirment l'augmentation de la résistance aux fluoroquinolones déjà observée en 2018 et une légère diminution de la résistance à l'azithromycine. En outre-mer, la résistance aux fluoroquinolones était de 0 % en Polynésie Française, 19 % en Guyane Française et 58,8 % en Martinique en 2016-2017.

### Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs 2019

88 % des prélèvements positifs à *T. pallidum* testés en France hébergent une souche résistante à l'azithromycine. Aucun prélèvement positif à *T. pallidum* testé ne présente de mutations potentielles impliquées dans la résistance à la doxycycline.

39 alertes de neurosyphilis sont répertoriées.

3 alertes de syphilis congénitales.

### 3.1 Description du réseau de partenaires

#### 3.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux : réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis*

Le réseau de surveillance des anorectites est animé par le CNR des IST bactériennes et repose sur la participation volontaire des cliniciens et des laboratoires qui envoient leurs échantillons ano-rectaux CT positifs au CNR pour diagnostic de LGV.

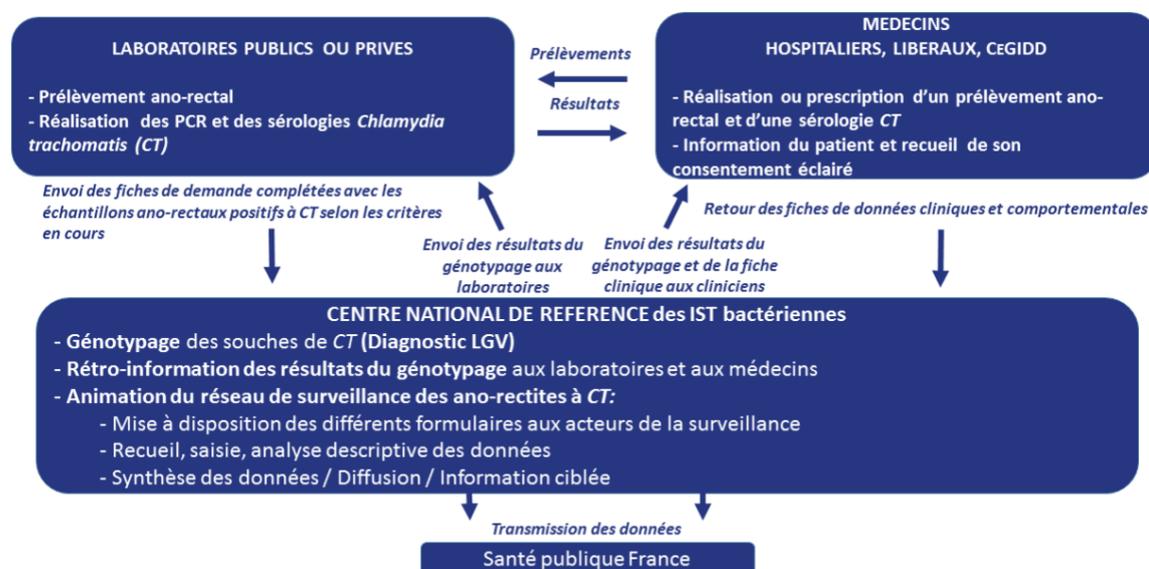
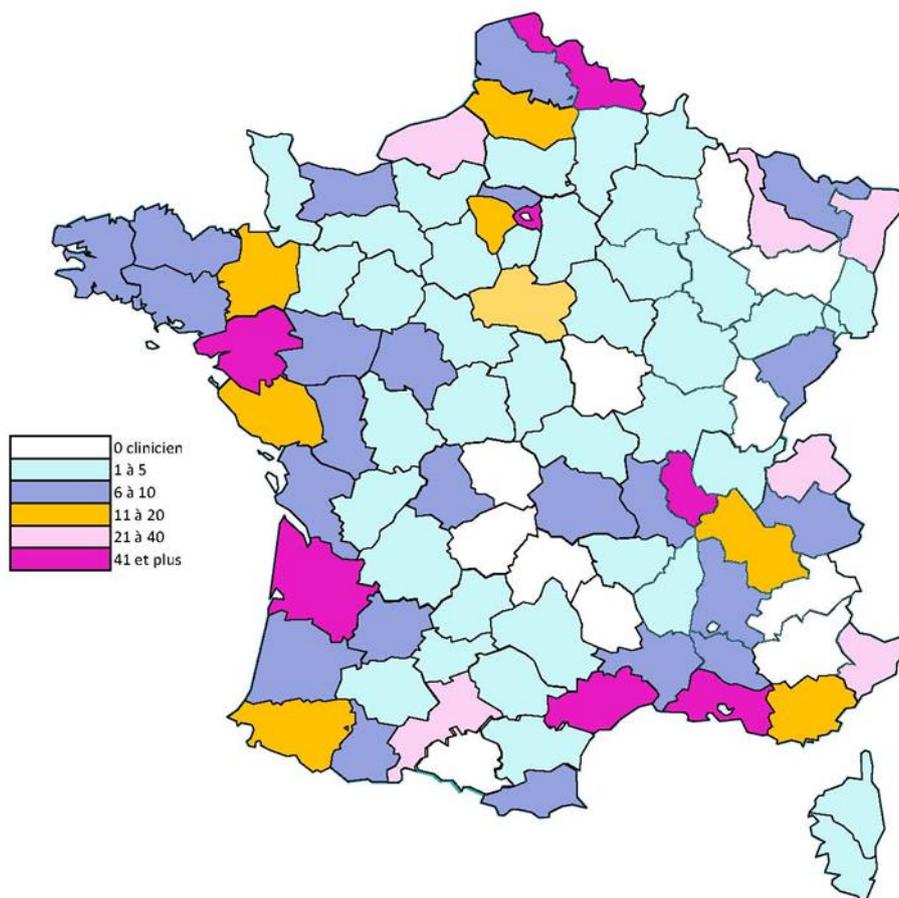


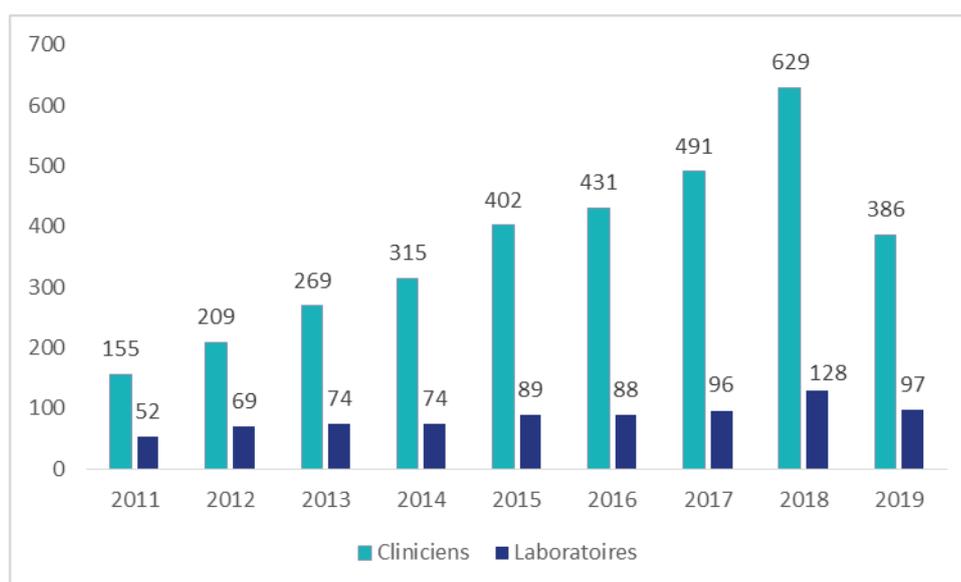
Figure. Coordination du réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis*.

L'implantation du réseau couvre la majeure partie du territoire métropolitain comme le montre la carte de densité géographique de nos correspondants cliniciens.



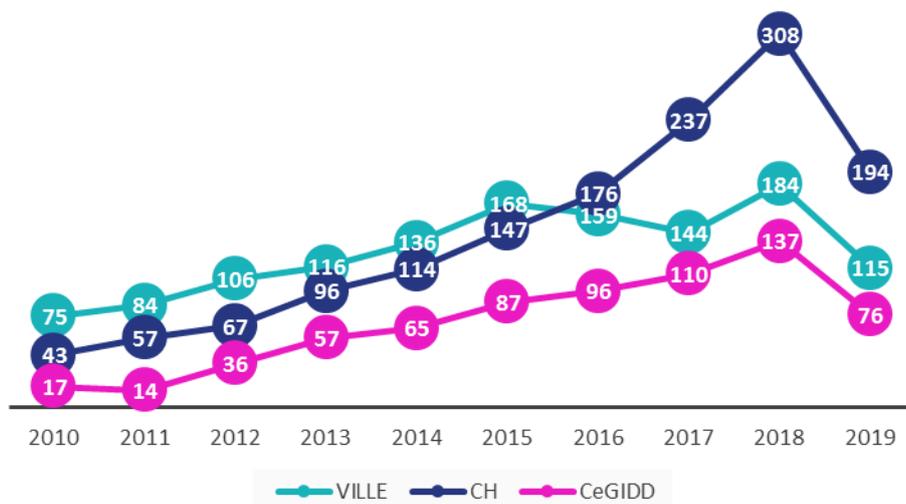
**Figure. Implantation du réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis*.**

Le réseau comporte 1584 médecins correspondants ayant participé au moins une fois. Comme le montre la Figure ci-dessous, en 2019, 386 médecins ont participé au réseau dont 112 nouveaux. Le nombre de cliniciens a diminué en raison du changement des critères de typage (voir 3.2.1.2). Depuis 2010, 353 laboratoires ont participé au réseau et en 2019, ce sont 97 laboratoires qui ont envoyé des échantillons dont 28 nouveaux. Il faut noter que 10 laboratoires participent de manière pérenne et envoient 50,5% des échantillons.



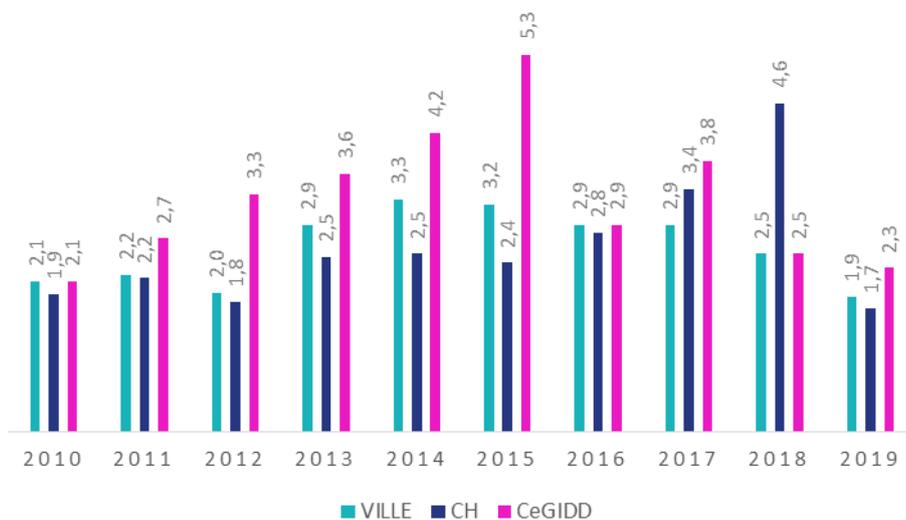
**Figure. Évolution du nombre de correspondants actifs du réseau.**

Les trois modes d'exercice, ville, hôpital et CeGIDD sont représentés dans la figure ci-dessous. La participation des médecins est en baisse quel que soit le mode d'activité. Cette diminution est due au changement de critères de typage (voir 3.2.1.2).



**Figure. Évolution du nombre de cliniciens du réseau par mode d'exercice : ville, Centre Hospitalier (CH) et CeGIDD.**

L'année 2019 se caractérise par une baisse globale du nombre de prélèvements par clinicien, cette tendance est plus marquée pour les médecins exerçant en centre hospitalier, probablement due à l'exclusion des patients PrEPeurs asymptomatiques.



**Figure. Évolution du nombre moyen d'échantillons/médecin/an en fonction du mode d'exercice.**

Les différentes spécialités médicales sont décrites dans la Figure ci-dessous et ne changent pas d'une année sur l'autre.

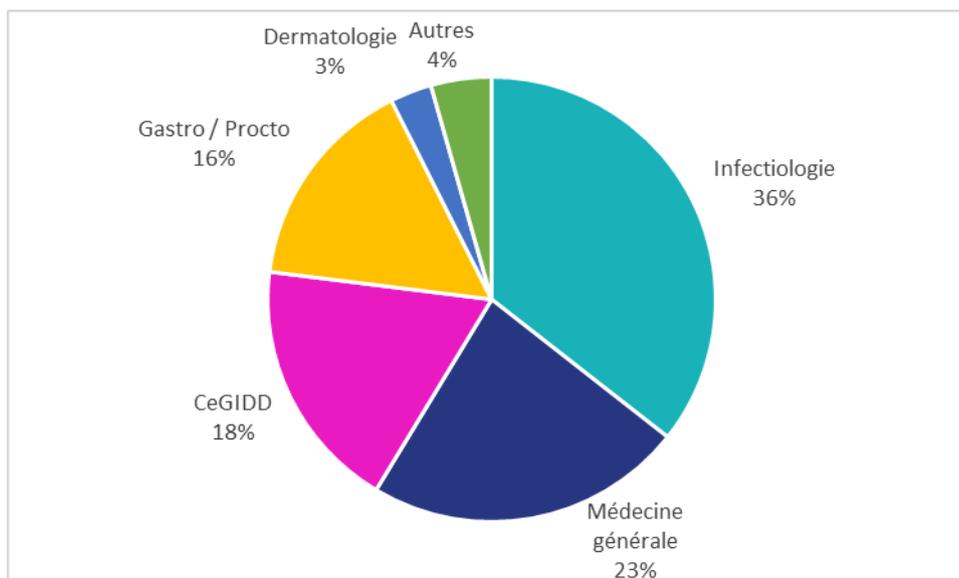


Figure. Répartition des médecins du réseau par spécialité.

### 3.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Le réseau Renago s'est arrêté fin 2018 et la surveillance a été remplacée par des enquêtes annuelles appelées ENGON en lien avec Santé publique France auxquelles participent les laboratoires publics et privés.

### 3.1.3 Laboratoire APHP Cochin

#### 3.1.3.1 Dans le cadre du protocole GENOSYPH

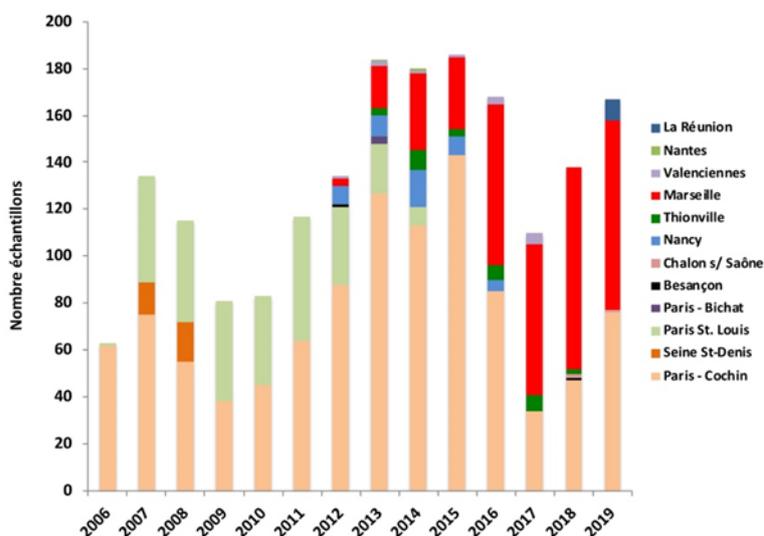
L'étude GENOSYPH a reçu un avis favorable du CPP Ile-de-France 3 (no.IRB SC3005). Elle porte sur des prélèvements par écouvillonnage de lésions primaires ou secondaires de patients atteints de syphilis. Le sérum est collecté pour continuer à alimenter la sérothèque du CNR. La détection du gène *tp47* de *T. pallidum* par nPCR est réalisée systématiquement avec un rendu de résultat sur une base hebdomadaire à titre indicatif (l'anonymat est conservé).

Pour 2019, le CNR a reçu un total de 167 échantillons (sérum et écouvillons) provenant des centres collecteurs de l'étude GENOSYPH (services de Dermatologie-MST des hôpitaux Cochin, CeGGID de Marseille, de Chalon s/ Saône, de La Réunion). Les échantillons proviennent principalement d'Ile-de-France et d'Aix-Marseille (Figure ci-dessous).



Figure. Répartition géographique des prélèvements GENOSYPH reçus pour l'année 2019.

Les centres collecteurs sont répartis sur le territoire français comme le montre la Figure ci-dessous. La participation des autres CeGGID parisiens hors AH-HP est compromise du fait des contraintes du protocole pré-analytique car il n'existe pas de procédures adaptées à l'acheminement des prélèvements. Le CNR fournit les écouvillons dans un kit de transport pour matière biologique de catégorie B, norme UN 3373. Le retour du kit à température ambiante reste à la charge du centre préleveur par voie postale ou par transporteur agréé. En 2019, Il faut noter la forte participation des centres d'Aix-Marseille et l'arrivée de La Réunion.



### 3.1.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2019, le CNR a reçu 1368 échantillons correspondant à 977 patients répartis sur 129 centres différents. Les échantillons envoyés proviennent de l'ensemble du territoire avec principalement l'Île-de-France qui reste fortement représentée. A ce jour, l'ensemble des régions nous a envoyé des prélèvements en 2019 (Figure ci-dessous).



**Figure. Nombre et provenance des échantillons envoyés pour expertise en 2019.**

A partir de l'année 2011, le nombre de centres envoyant des échantillons pour expertise n'a cessé d'augmenter graduellement pour atteindre 130 en 2018 et rester stable en 2019 (Tableau ci-dessous).

**Tableau. Evolution du nombre de centres 2011-2019.**

Année	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>Nb de centres</b>	39	37	65	92	91	86	100	130	129

Sur la période 2006-2019, les envois proviennent de l'ensemble des régions (Figure ci-dessous) avec une forte représentativité de la région parisienne, des Hauts-de-France, de la Nouvelle-Aquitaine, du Grand-Est et de la région PACA.



Figure. Provenance des échantillons reçus par le CNR syphilis pour expertise en 2006-2019.

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

### 3.2.1 Anorectites à *C. trachomatis*

Dans le cadre du réseau de surveillance de la LGV, nous avons, depuis janvier 2019, limité la surveillance :

- à tous les patients séropositifs pour le VIH, symptomatiques ou non,
- et aux patients séronégatifs pour le VIH, uniquement symptomatiques.

#### 3.2.1.1 Anorectites à souches L

Le nombre de cas de LGV en 2019 est de 744, soit une augmentation de 3 % par rapport à 2018 (722 cas). La baisse observée en 2017 ne s'est pas confirmée en 2018. La courbe épidémiologique est toujours en hausse mais semble ralentir. Au total sur la période 2010-2019, le nombre de cas de LGV s'élève à 4273 (Figure ci-dessous).

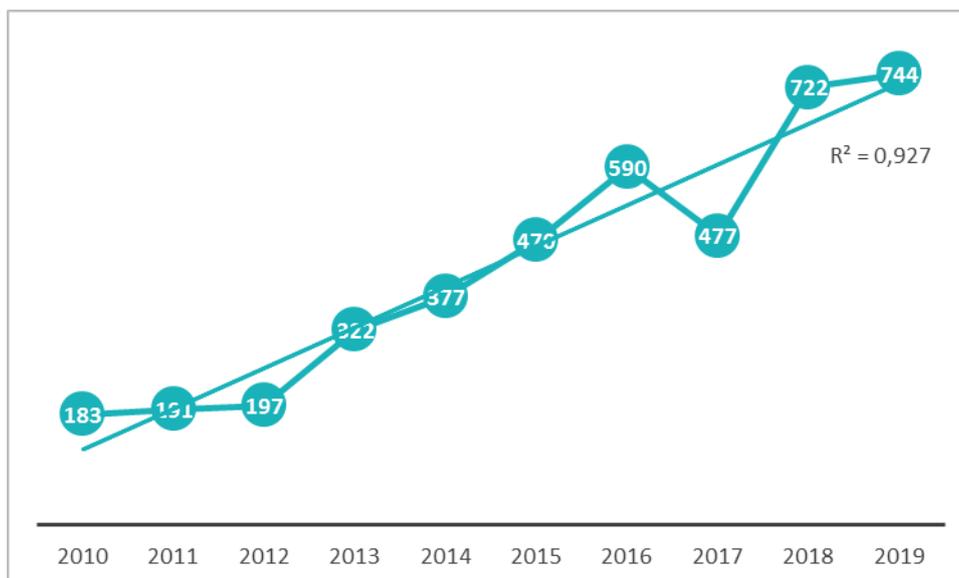


Figure. Evolution des cas de LGV en France 2010-2019.

Cette légère augmentation des cas en 2019 ne s'observe pas dans les laboratoires qui sont pérennes depuis 2010. Entre 2018 et 2019, on observe une hausse de 3% sur l'ensemble du territoire tandis que l'on observe une décroissance de 5,5% des laboratoires constants (Figure ci-dessous).



Figure. Évolution du nombre de cas de LGV sur l'ensemble du réseau et sur les laboratoires constants depuis 2010.

### 3.2.1.2 Anorectites à souches non L

En 2019, le nombre de cas d'anorectites à souches non L a fortement diminué, de 34,2%, passant de 2198 cas en 2018 à 1637 cas en 2019. L'augmentation de 2018 était due à la surveillance accrue des HSH sous PrEP qui font partie de la population HIV-négative asymptomatique.

Les caractéristiques des patients sous PrEP inclus dans le réseau en 2017-2018 ont fait l'objet d'une **publication** : O. Peuchant, A. Touati, C. Laurier, N. Hénin, C. Cazanave, C. Bébéar, B. de Barbeyrac. Prevalence of Lymphogranuloma venereum among anorectal *Chlamydia trachomatis*-positive MSM using pre-exposure prophylaxis. **Sex Transm Infect.** 2020 Apr 17 :sextrans-2019-054346.

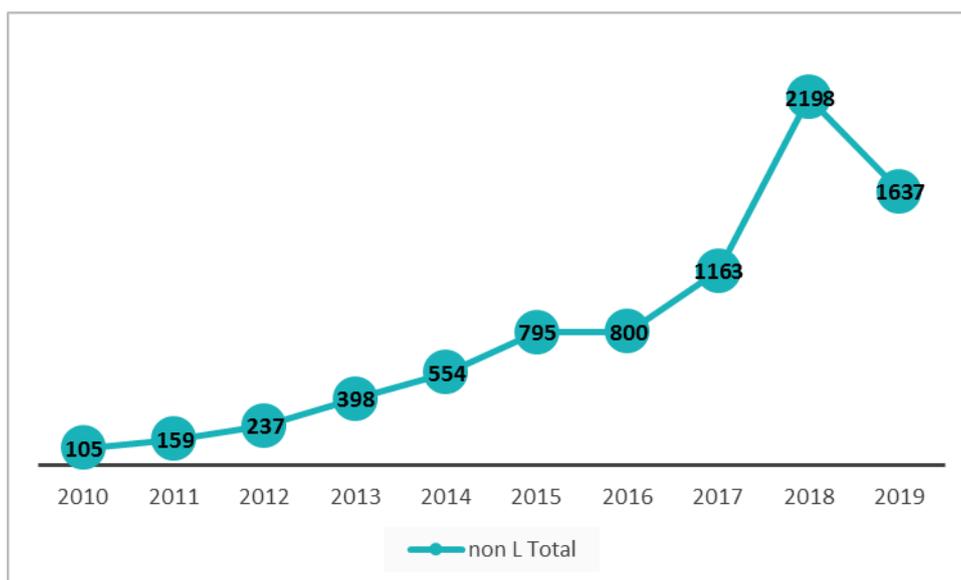


Figure. Évolution des cas d'anorectites non LGV en France 2010-2019.

Cette surcharge de travail et le fait que la surveillance de cette population spécifique de sujets HIV-négatifs et asymptomatiques n'a pas montré plus de cas de LGV dans cette population que chez les sujets HIV-négatifs et asymptomatiques ne bénéficiant pas de la PrEP, nous ont décidés à exclure ces patients de notre surveillance en 2019. La frise ci-dessous reprend l'évolution de nos critères de typage.



Figure. Évolution des critères de typage au sein du réseau des anorectites à *C. trachomatis*.

### 3.2.1.3 Répartition géographique des anorectites

Depuis 2010, les cas de LGV restent de manière prédominante localisés à Paris (3275 cas) comme montré dans les Figures ci-dessous. En province, l'ordre de fréquence est le suivant : Lyon (277 cas), Lille-Tourcoing (210 cas), Montpellier (157 cas), Bordeaux (139 cas), Marseille (108 cas), Nantes (64 cas) et Strasbourg (62 cas).



2018 vs 47,9 % en 2019) et conforte cette hypothèse.

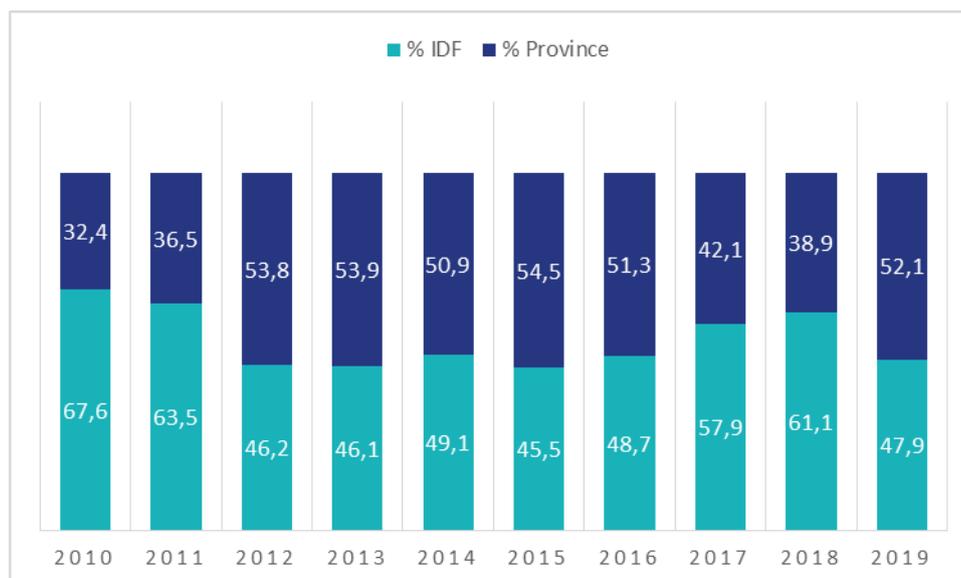


Figure. Répartition des cas d'anorectites non LGV entre Paris et la province.

### 3.2.1.4 Analyse des données biologiques, cliniques et comportementales des patients atteints d'anorectite

Pour 2019, comme les années précédentes, les infections anorectales touchent majoritairement les hommes qui sont pour la plupart des HSH. Il faut noter 137 cas d'anorectites à souche non L chez des femmes depuis 2010 (2 en 2010, 6 en 2011, 9 en 2012, 9 en 2013, 10 en 2014, 28 en 2015, 12 en 2016, 19 en 2017, 24 en 2018 et 18 en 2019), un seul cas à souche L ayant été publié en 2011 par le CNR.

Les données de l'année 2019 n'étant pas recueillies en totalité, l'analyse des données biologiques, cliniques et comportementales ne sera effectuée qu'en mai 2020 et transmises aux membres du réseau sous la forme d'un poster, comme les années précédentes. Le poster pour l'année 2018 est fourni en annexe.

Le fait de recentrer la surveillance sur les patients VIH+ ou VIH- symptomatiques explique la très forte augmentation de patients VIH+ parmi les patients ayant une anorectite à souche non L, comme le montre la Figure ci-dessous.

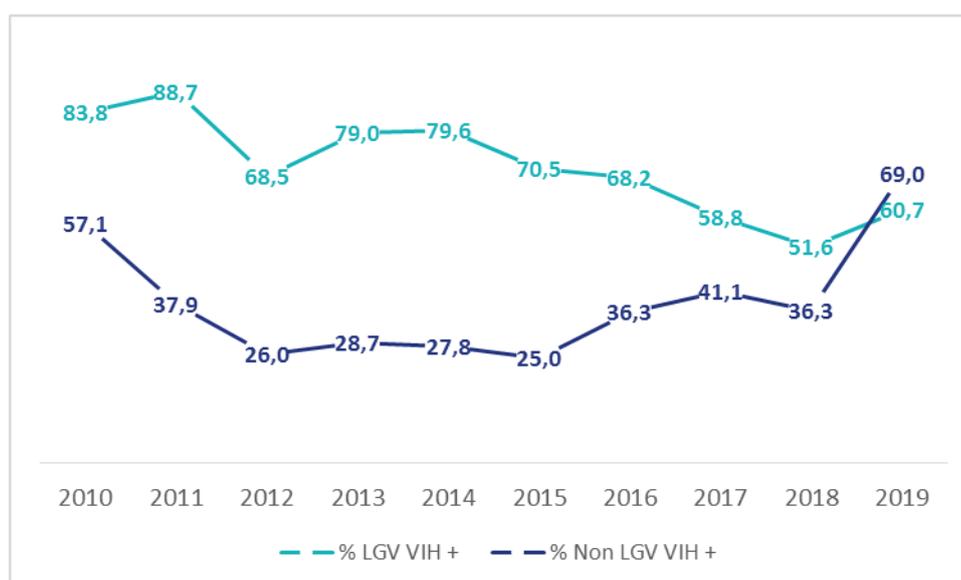


Figure. Nombre de cas de LGV et d'anorectites non LGV parmi les patients séropositifs pour le VIH, 2010-2019.

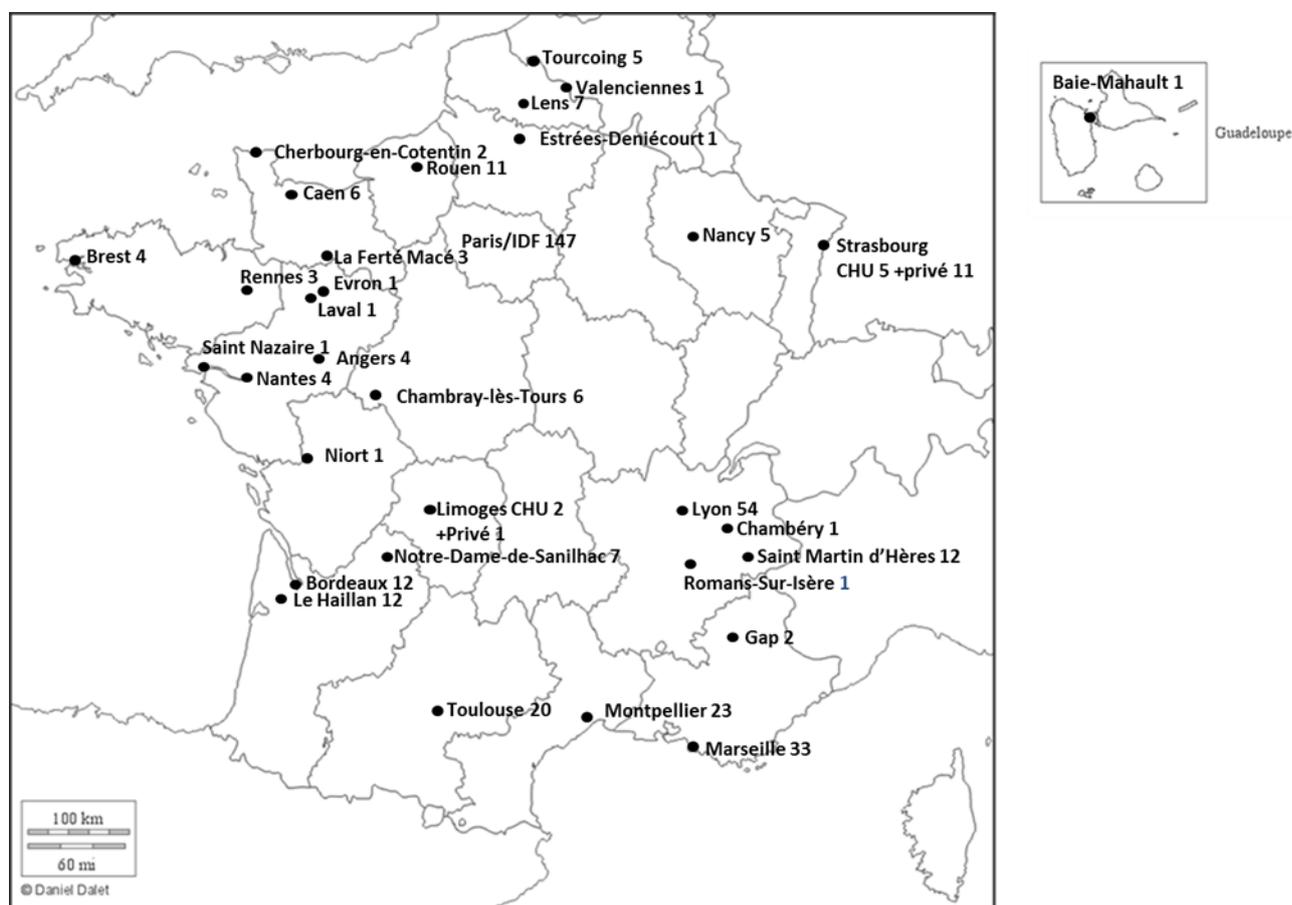
**En résumé**, depuis 2019, le CNR ne surveille que les sujets HIV-positifs et les sujets HIV-négatifs et symptomatiques. Les biais de sélection induits par ces critères ne nous permettent plus de suivre les tendances épidémiologiques de cette infection. Le CNR souhaite donc faire **évoluer la surveillance au sein de ce réseau** (voir programme d'activités pour les années suivantes).

### 3.2.2 Infections à gonocoque

#### 3.2.2.1 Cas d'infections recensées dans l'enquête ENGON 2019

Les souches de *N. gonorrhoeae* isolées en culture en France métropolitaine et dans les DROM du 1 septembre au 31 décembre 2019 ont été collectées, conservées à -80°C, puis envoyées au CNR via un transporteur mandaté (TSE express médical). Le CNR au laboratoire de l'hôpital Saint-Louis a reçu 438 recueils de données cliniques anonymisées provenant de 438 patients associés à 410 souches dont 376 ont été obtenues en culture pour analyse.

Les cas cliniques provenaient de 48 centres hospitaliers ou laboratoires privés dont la répartition géographique est localisée sur la carte ci-dessous.



**Figure. Répartition géographique des participants de l'enquête ENGON 2019 avec nombre de souches.**

Sur les 438 gonococcies déclarées pour lesquelles une souche a été isolée, 82,7% (362/438) proviennent d'hommes, 17,1% (75/438) de femmes et 0,2% (1/438) d'un individu transgenre. Dans 65,1% des cas, les informations cliniques étaient renseignées et rapportaient 81,75% (233/285) de patient(e)s symptomatiques et 18,24% (52/285) patient(e)s asymptomatiques venu(e)s pour un dépistage.

L'orientation sexuelle était renseignée dans moins de la moitié des cas (35,8% ;157/438). On observe que 70,7% (111/157) des cas étaient signalés chez des hommes homosexuels ou bisexuels. *A contrario*, les 29,3% (46/157) des cas rapportés chez des hétérosexuels provenaient de 47,8% (22/46) femmes et 52,2% (24/46) hommes.

L'âge moyen des patients était de 30,9 ans et l'âge médian était de 28 ans (avec une amplitude de 0 ans à 85 ans). Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 31,5 ans vs 28,3 ans. La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe 20-24 ans, suivie de la classe 25-29 ans. Dans la

classe la plus représentée, 26,7 % des femmes avaient entre 20 et 24 ans et 23,5% des hommes étaient âgés de 25 à 29 ans.

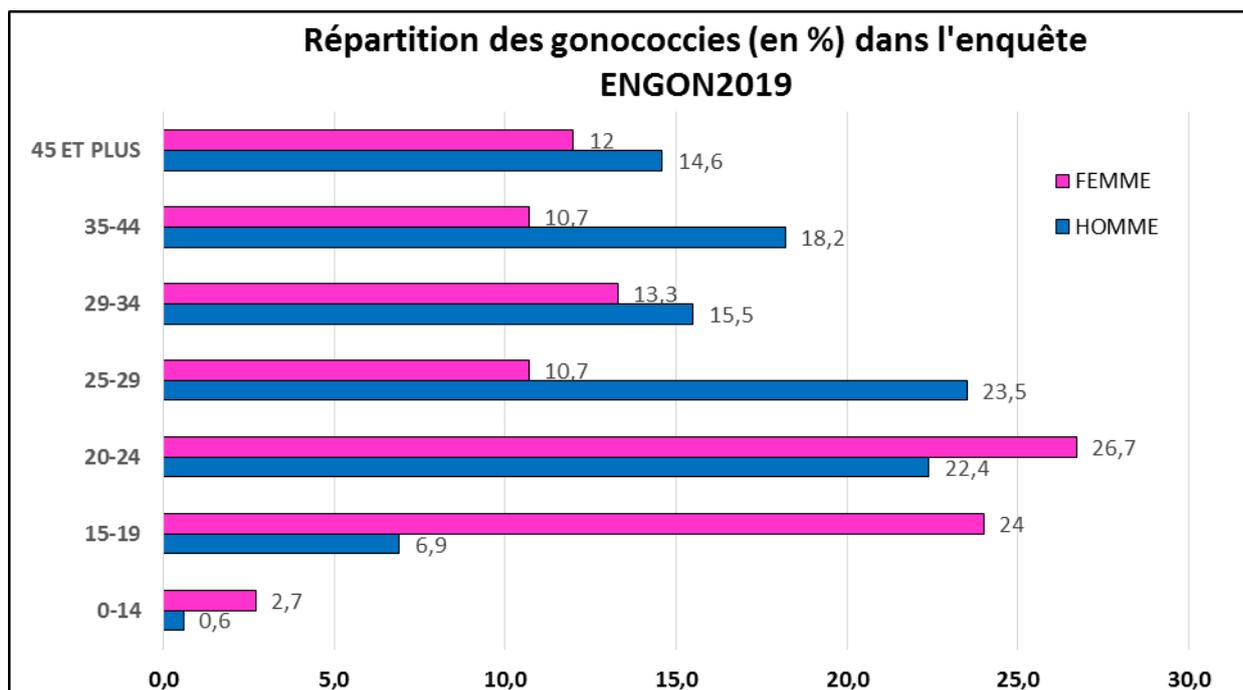


Figure. Répartition des gonococcies en pourcentage selon l'âge et le sexe des patient(e)s inclus(e)s dans l'enquête ENGON 2019.

Parmi les prélèvements répertoriés, 75,6% (331/438) sont issus d'un prélèvement urogénital (199 urètres, 70 prélèvements vaginaux, 58 urines, 4 autres), 22,4% (98/438) sont issus d'un prélèvement extragénital (78 rectaux, 20 pharyngés), 7/438 (1,6%) sont issus d'autre types de prélèvements (liquide articulaire, hémocultures ...) et 2/438 sont d'origine inconnue (0,5%).

Dans cette cohorte de patients, une coinfection à *C.trachomatis* est fréquemment observée, soit dans 16,2% (71/438) des cas avec 2 cas de LGV et 3 cas d'infection à *M. genitalium*. Un nombre important de patient soit 6,6% (29/438) était séropositif pour le VIH.

La répartition en fonction de la structure de consultation et du type de prescripteur est visualisée dans la Figure ci-dessous. La moitié des données recueillies proviennent de patient(e)s consultant(e)s en CeGGID.

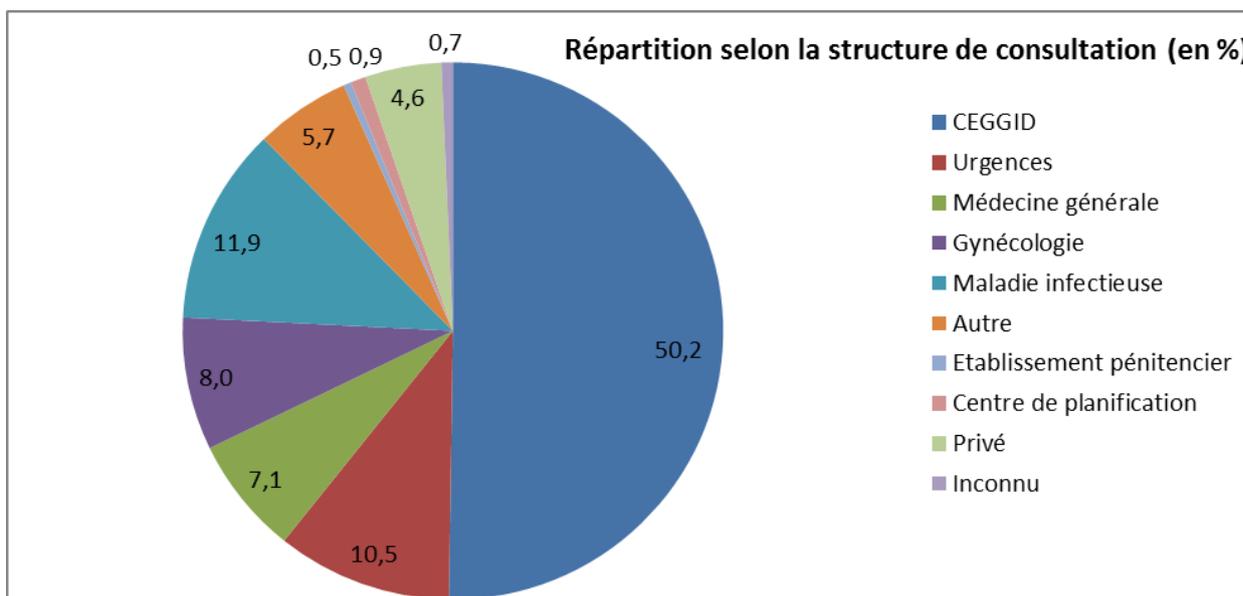


Figure. Répartition des services dans lesquels les gonococcies de l'enquête ENGON2019 ont été décrites.

Le profil des 410 souches associé aux données cliniques est rapporté paragraphe 3.3.4.2 et le séquençage des souches est en cours.

### 3.2.2.2 Cas de gonococcies invasives expertisées au CNR

En 2019, le CNR a reçu 13 souches invasives de *N. gonorrhoeae* provenant de 10 patients. Le récapitulatif de ces cas est représenté par la carte ci-dessous.

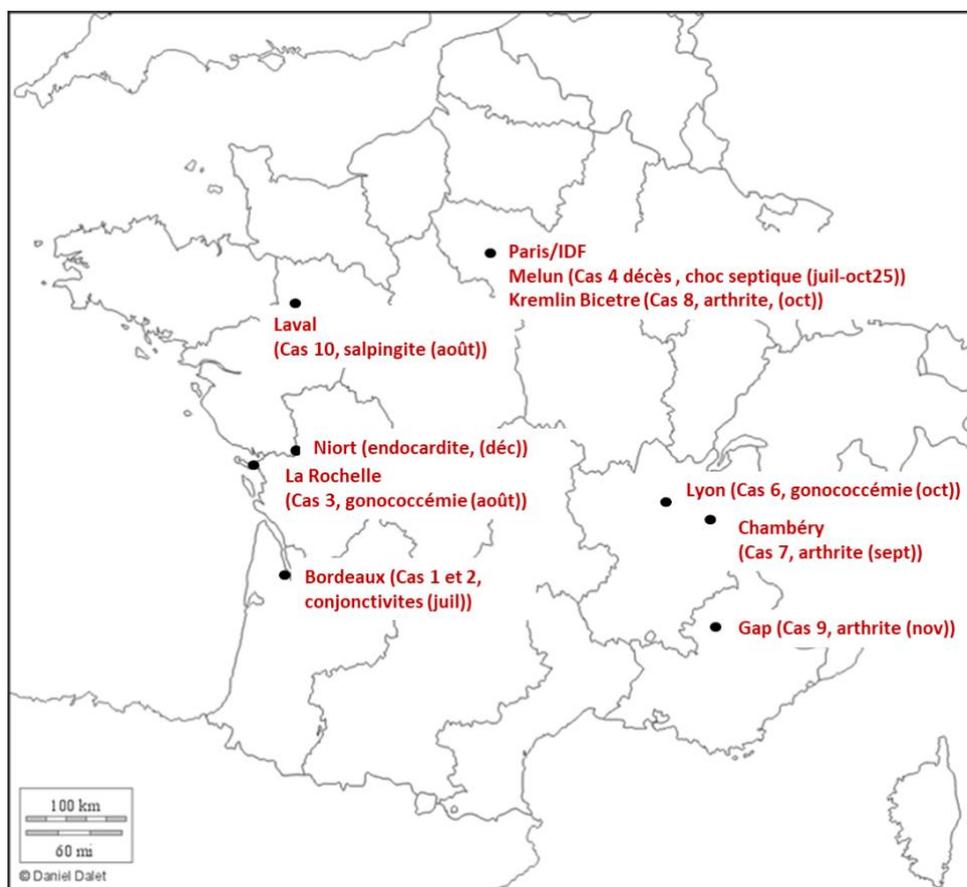


Figure. Distribution géographique des souches invasives en 2019 (numéro du cas, tableau clinique, mois d'infection).

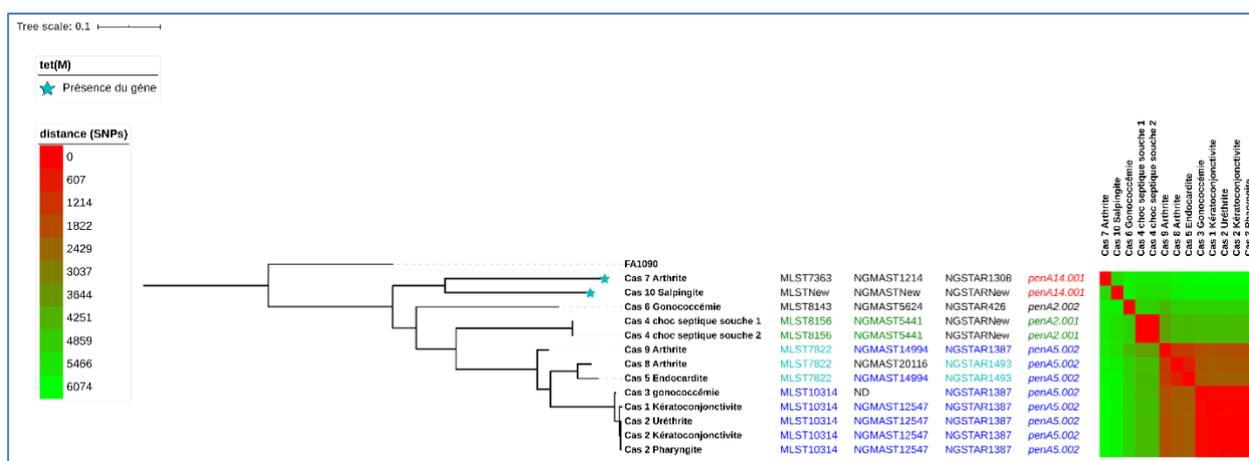
- Clustérisation de 2 cas de kératoconjonctivites chez 2 patients HSH (cas 1 et 2, CHU de Bordeaux)

À une semaine d'intervalle en juillet 2019, deux jeunes hommes de 21 et 18 ans se sont rendus aux urgences ophtalmologiques du CHU de Bordeaux, en France, pour une kératoconjonctivite purulente sévère qui avait débuté trois jours auparavant. Ils n'avaient aucun antécédent médical, mais tous deux ont déclaré avoir eu des rapports sexuels non protégés avec un autre homme, respectivement 1 et 11 jours avant. On observe un écoulement conjonctival purulent abondant associée à un gonflement des paupières (cf. Figure ci-dessous).



**Figure. Kératoconjonctivite gonococcique avec un écoulement conjonctival purulent (Mehlen et al, *Clin Microbiol Infect.* 2020 Mar 7).**

Quatre souches de gonocoque ont été isolées chez ces 2 patients (1 pour le cas 1 et 3 pour le cas 2) au niveau oculaire, urétral et anal et expertisées à l'hôpital Saint Louis. Les souches provenant des 2 patients étaient sensibles à la ceftriaxone et uniquement résistantes aux fluoroquinolones. Le séquençage du génome entier a révélé que les isolats étaient étroitement liés phylogénétiquement ; les deux clones correspondaient au MLST10314, NG-MAST 12547 et NGSTAR1387 (cas 1 et 2, Figure ci-dessous) et avaient une distance de 32 nucléotides d'écart (SNP) en core genome. Ces cas viennent d'être publiés dans **Clin Microbiol Infect** (Mehlen et al. Keep an eye on *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol Infect. 2020 Mar 7).



**Figure. Alignement phylogénétique des 13 souches cliniques responsables d'infections invasives avec la souche de référence FA1090.**

- Clusterisation d'un cas de gonococcémie avec les cas de kératoconjonctivite (cas 3, CH de La Rochelle)

En août 2019, une souche invasive a été isolée d'une hémoculture chez un patient de 49 ans hospitalisé à La Rochelle dans un contexte d'arthrite de cheville. La souche était sensible à la ceftriaxone et uniquement résistante aux fluoroquinolones ; le patient a été traité par ceftriaxone. L'étude phylogénique montre un regroupement de cette souche dans le même cluster que celles des 2 kératoconjonctivites : MLST10314, NG-MAST 12547 et NGSTAR1387 (cas 3, Figure ci-dessus) avec une distance de 151 et 183 nucléotides d'écart (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) en core genome avec les cas 1 et 2, respectivement. Le CNR est en alerte par rapport à la circulation de cette souche invasive.

- Décès dans un contexte de gonococcémie et choc septique à *N. gonorrhoeae* (cas 4, CH de Melun)

En octobre 2019, deux souches de *N. gonorrhoeae* ont été reçues au CNR à l'hôpital Saint Louis. Ces deux souches provenaient de deux hémocultures positives isolées en juillet et octobre 2019 chez une patiente de 34 ans qui présentait une immunodéficience profonde. La patiente est décédée en choc septique lors de sa seconde hospitalisation. Après un antibiogramme complet et génotypage par NGS, nous avons pu déterminer que la souche avait un profil sauvage et un type MLST8156, NG-MAST5441 et NGSTAR new (cas 4, Figure ci-dessus).

- Endocardite à *N. gonorrhoeae* sur prothèse valvulaire aortique (cas 5, CH de Niort et CHU Poitiers)

En décembre 2019, une souche de gonocoque a été isolée sur une hémoculture d'un patient HSH âgé de 21 ans dans un contexte d'endocardite sur valve aortique. La souche était sensible à la ceftriaxone, résistante aux fluoroquinolones et aux tétracyclines. Le patient a été traité par ceftriaxone, 1g/j sur une durée de traitement non connue. Le NGS a mis en évidence l'absence de regroupement avec les autres cas et un MLST7822, NG-MAST1499 et un NGSTAR1493 (cas 5, Figure ci-dessus).

- Gonococcémie dans un contexte d'arthrite (cas 6, Hôpital St Joseph, St Luc, Lyon)

En octobre 2019, une souche invasive a été isolée d'une hémoculture chez une patiente âgée de 34 ans sans domicile fixe, vivant avec une hépatite B chronique active et une hépatite delta hospitalisée dans un contexte d'arthrite du poignet et d'urétrite asymptomatique. Cette symptomatologie était apparue à la suite de rapports non protégés. L'évolution était favorable sous ceftriaxone. La souche était sensible à la ceftriaxone et résistante aux fluoroquinolones et cyclines. Le NGS a mis en évidence l'absence de regroupement avec les autres cas et retrouve un MLST8143, NG-MAST5624 et NGSTAR426 (cas 6, Figure ci-dessus).

- Autres cas d'arthrites septiques à gonocoques (cas 7, CHU Kremlin Bicêtre ; cas 8, CH de Gap ; cas 9, CH de Chambéry)

Des arthrites septiques à gonocoque ont également été décrites et les souches ont été explorées au CNR.

Pour le cas 7, le patient est un homme de 53 ans hospitalisé à Chambéry pour une arthrite de cheville en septembre 2019. Le cas 8 correspond à une monoarthrite de genou chez un homme de 54 ans hospitalisé au Kremlin Bicêtre.

Le cas 9 survient chez un patient de 54 ans HSH sous PrEP. Aucune clonalité n'a été mise en évidence entre ces souches (cf. Figure ci-dessus). Il est important de noter que ces 3 souches étaient résistantes aux fluoroquinolones, traitement souvent utilisé pour les arthrites non documentées et aux tétracyclines (cas 7 à 9, Figure ci-dessus).

- Salpingite (Cas 10, CH de Laval)

Un cas de salpingite a été rapporté chez une femme de 38 ans. La souche était sensible aux antibiotiques excepté la tétracycline et aucune clonalité n'a été observée. La souche est de MLST, NGMAST et NGMAST inconnu (cas 10, Figure ci-dessus).

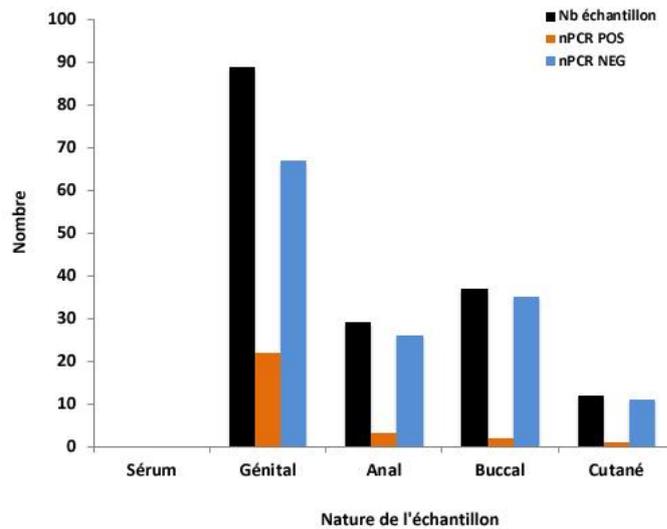
Le génome de ces souches virulentes est en cours d'investigations complémentaires. Dans une première approche, nous rechercherons la présence de gènes de virulence ou leur acquisition. Puis les génomes seront comparés à ceux de la collection ENGON dont les situations cliniques ont été clairement identifiées.

### 3.2.3 Syphilis

Sur la période 2006-2019, le CNR à l'hôpital Cochin a réceptionné 482 sérums et 1834 écouvillons dans le cadre des protocoles d'étude et 4869 échantillons au titre de l'expertise. Santé publique France qui reçoit toutes les données biologiques, cliniques et comportementales dans le cadre des protocoles, gère la surveillance épidémiologique.

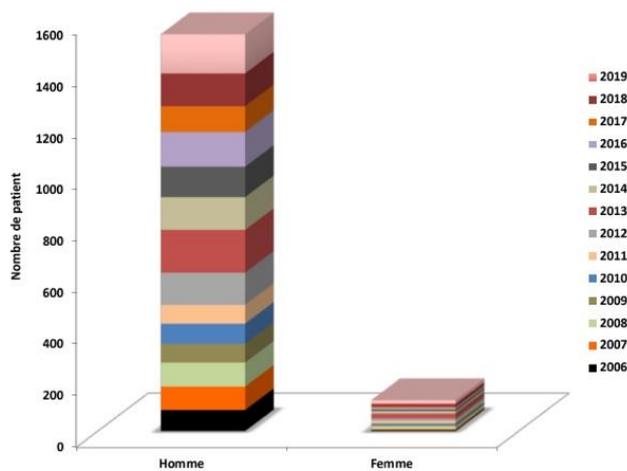
#### 3.2.3.1 Dans le cadre du protocole GENOSYPH

Pour l'année 2019, le CNR a reçu un total de 167 écouvillons provenant de 152 patients (91,2% d'hommes d'âge moyen 35,4 ans) testés par nPCR du gène *tpp47*. La majorité des prélèvements réceptionnés sont des écouvillons d'origine génitale (64,5%) et buccale (26,8%) alors que les écouvillons d'origine anale ou cutanée sont moins représentés à 21 et 8,7%, respectivement (Figure ci-dessous). La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR dans l'ensemble des écouvillons est de 16,8% (28/167) se répartissant à 13,2% (22/167) d'échantillons positifs dans les écouvillons génitaux, à 1,8% (3/167) pour les écouvillons anaux, 1,2% (2/167) pour les écouvillons buccaux et 0,6% (1/167) pour les écouvillons cutanés. Aucun sérum n'a été détecté en 2019.



**Figure. Répartition de la nature des échantillons et détection du résultat nPCR en 2019.**

La population incluse dans l'étude microbiologique de la syphilis et GENOSYPH depuis 2006 est en majorité masculine (avec un total de 1540 hommes (92,7%) et de 1205 femmes (7,2%). Le sexe ratio H/F est de 12,8:1 (Figure ci-dessous).



**Figure. Répartition du sexe des patients recrutés sur la période 2006-2019.**

Les patients se répartissent entre 18 et 80 ans avec une proportion très marquée pour les tranches d'âges de 21 à 50 ans. Les tranches d'âge les plus représentées étant celles des 21-30 et 31-40 ans (Figure ci-dessous). Il faut noter cependant que le critère d'exclusion de ces études est un âge inférieur à 18 ans.

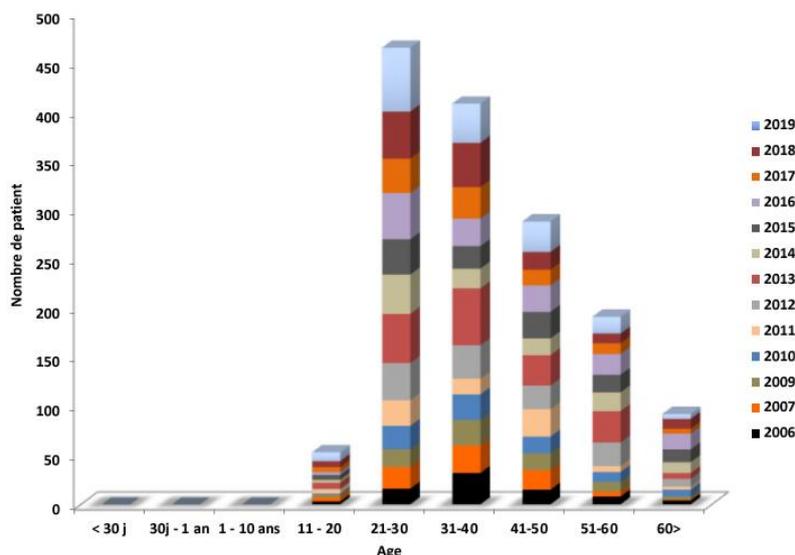


Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2019.

Sur la période 2006-2010, le nombre d'échantillons d'origine sanguine (sang total et sérum) a été satisfaisant nous permettant d'atteindre des quantités statistiquement significatives pour les différentes études menées par le CNR syphilis. A partir de 2011, l'étude GENOSYPH se concentre sur la collecte des écouvillons et des sérums. Nous constatons que les écouvillons génitaux sont majoritaires dans les prélèvements de lésions cutané-muqueuses de syphilis primaire et secondaire. Un effort particulier a été demandé aux centres préleveurs pour envoyer également des écouvillons d'origine buccale et anale. Depuis 2013, la proportion d'écouvillons d'origine anale et buccale a progressé pour se stabiliser autour de 15% et 20%, respectivement (Figure ci-dessous).

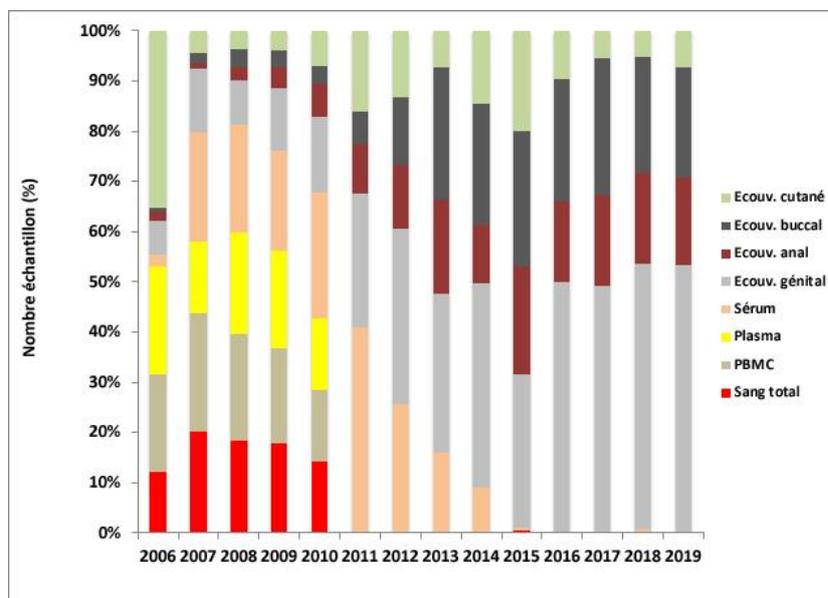


Figure. Répartition du type d'échantillons sur la période 2006-2019.

### 3.2.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2019, le CNR a reçu 1368 échantillons correspondant à 977 patients (56,5% d'hommes d'âge moyen 44,9 ans). La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR du gène *tp47* correspond à 674 analyses dont 4,15% de résultats positifs. Les expertises sérologiques représentent 1336 analyses dont 47,8% de résultats positifs, portant à un total de 2010 analyses réalisées pour expertise par le CNR IST, laboratoire associé syphilis sur l'année 2019.

Les échantillons reçus pour expertise moléculaire se répartissent comme suit : sérums (2,2%), sang total (2,8%), LCR (44,9%), écouvillons (13,5%), biopsies (3,5%) et autres (1,6%). Les échantillons « autres » correspondent à : humeur

aqueuse (5), liquide de coloscopie (1), paranchyme cérébral (1), liquide articulaire (1), sperme (1), ulcération (1), humeur vitrée (1).

Les prélèvements périnataux représentent 31,3% des échantillons reçus sur l'année. Ils se répartissent en liquide amniotique (1,8%), placenta (7,1%), sang cordon et cordon (5,5%), liquide gastrique, écouvillon et/ou sécrétions nasopharyngées (28,3%). Dans ce cadre, des prélèvements de LCR sont reçus et représentent 3% de l'ensemble des LCR reçus au CNR.

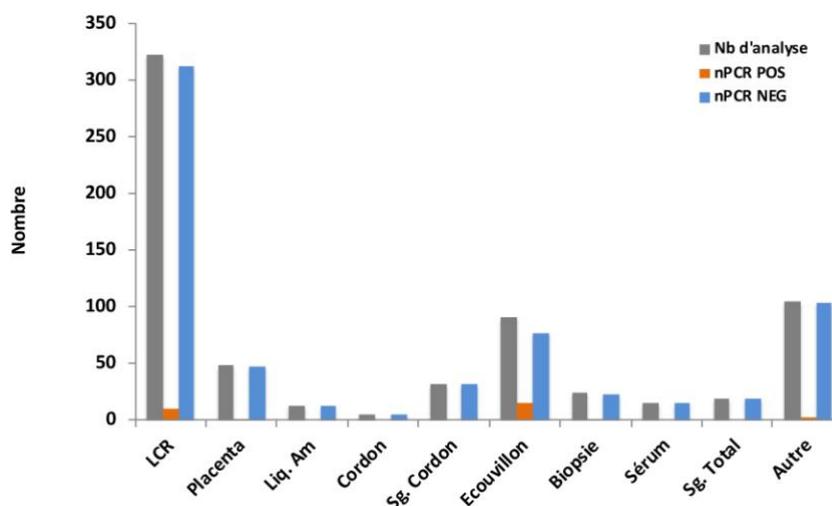


Figure. Répartition de la nature des échantillons reçus pour expertise en 2019 et analysés par nPCR.

Depuis 2012, le CNR répond à toutes demandes d'expertises sérologiques pour analyse en première intention ou pour confirmation de tests pratiqués dans d'autres laboratoires d'analyse biologique. De plus, depuis novembre 2013, le CNR prend en charge la réalisation du TNT VDRL sur tous les LCR reçus pour expertise. En effet, de par sa nature manuelle et opérateur-dépendant, un grand nombre de laboratoires d'analyses médicales ne souhaitant pas dans l'immédiat accréditer ce test nous demandent de le prendre en charge. Par ailleurs, il a été montré dans la littérature que le TNT RPR ne pouvait pas remplacer le VDRL (Marra *et al*, (2012) Sex Trans Dis 39:453), qui est donc toujours considéré comme test classant pour le diagnostic de neurosyphilis. Pour 2019, nous avons reçu 694 demandes d'expertise sérologiques qui ont été testées par un TNT et par au moins un TT (Figure ci-dessous). Ces demandes d'expertise sérologiques représentent 66,5% de l'ensemble des analyses réalisées.

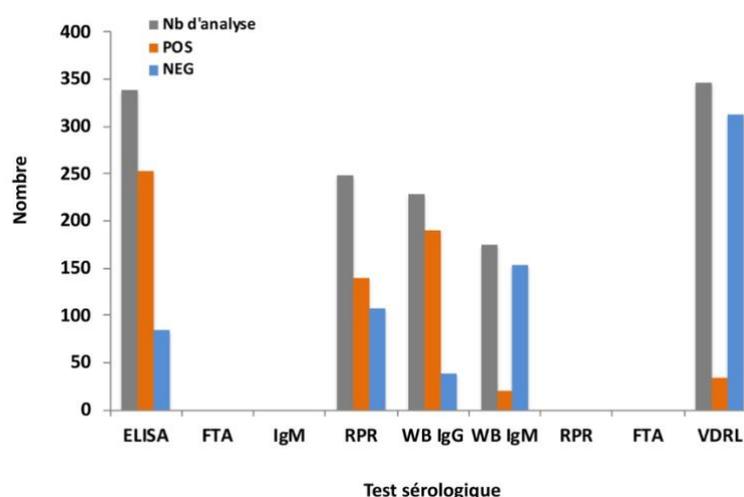


Figure. Répartition de la nature des analyses sérologiques effectuées en 2019.

Depuis sa création, le CNR a reçu un nombre croissant d'échantillons pour expertise. L'année 2013 a marqué un accroissement significatif de la demande d'expertise avec une progression de 120%. Depuis lors, le laboratoire associé syphilis a vu le nombre d'expertise augmenter tous les ans avec une progression de 53% en 2014, 22% en 2015, 28% en 2016, de 32% en 2017, de 22% en 2018 et de 14% en 2019 (Figure ci-dessous).

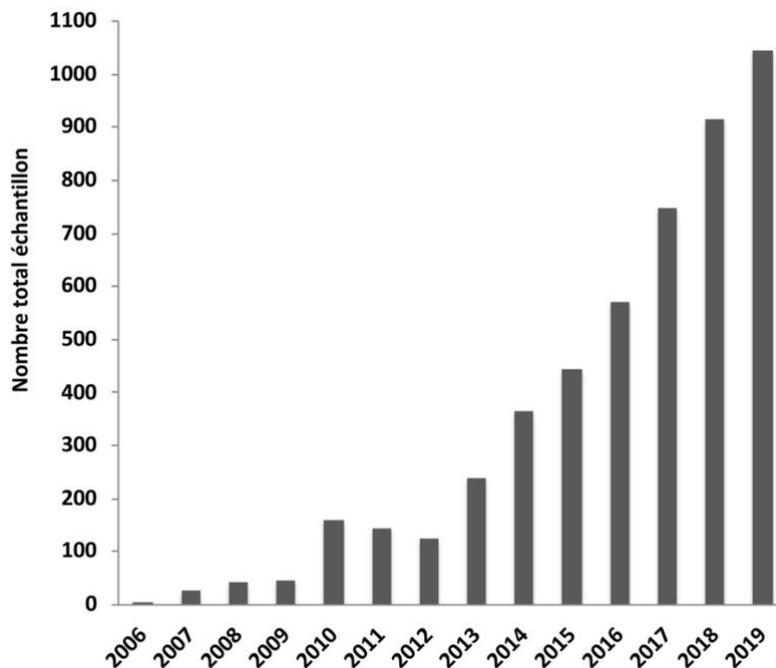


Figure. Echantillons extérieurs reçus pour une expertise syphilis par le CNR sur la période 2006-2019.

C'est une population à dominante masculine avec un total de 2525 hommes (61,5%) et de 1577 femmes (38,4%). Le ratio sexe ratio H/F est de 1,6 :1. La tranche d'âge 21-50 ans est majoritaire et représente 47% des individus. Les nouveau-nés d'un âge inférieur à 30 jours représentent 15,3% de la population analysée tandis que la population âgée de 60 ans et plus représente 19,4% des échantillons envoyés (Figures ci-dessous).

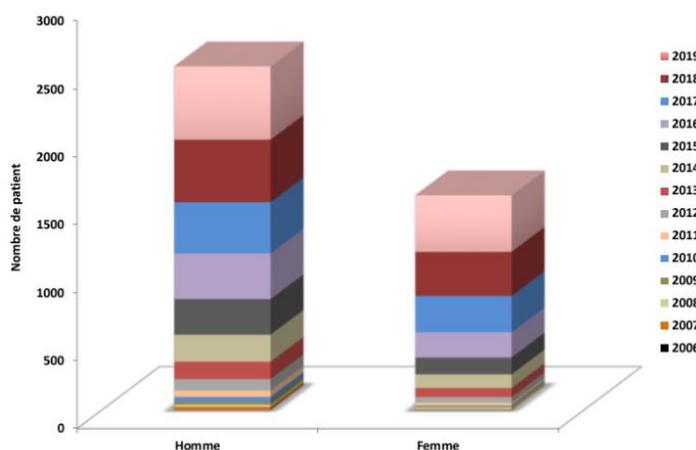
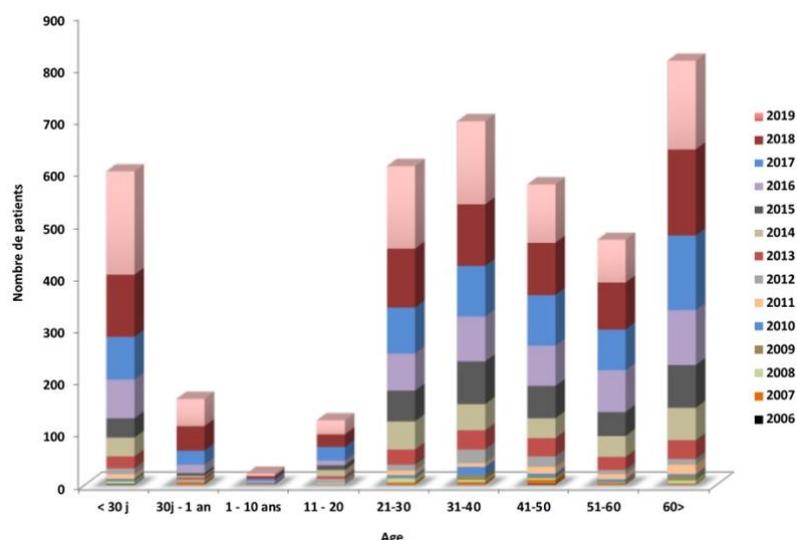
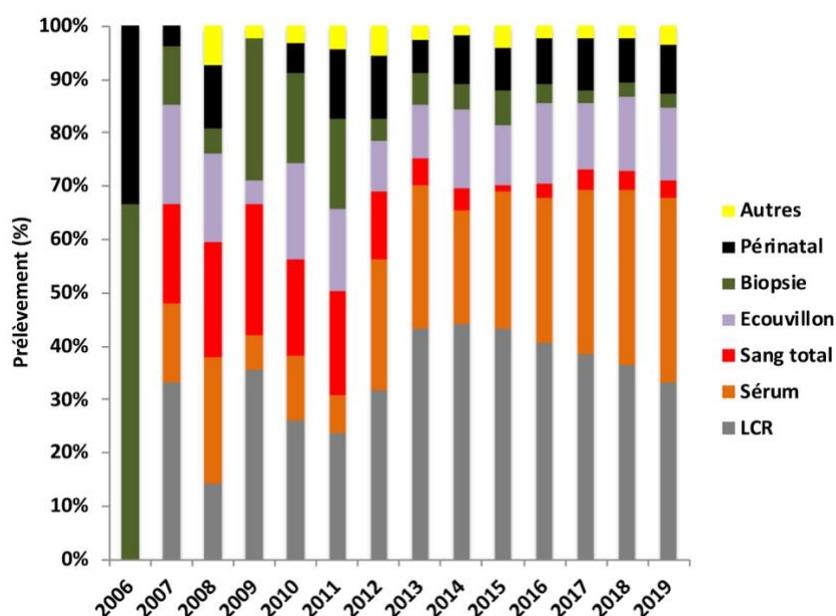


Figure. Répartition du sexe des patients sur la période 2006-2019.



**Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2019.**

Il est intéressant de noter l'évolution de la nature des échantillons reçus par le laboratoire associé syphilis sur la période 2006-2019 (Figure ci-dessous). L'ensemble des échantillons répertoriés et analysés par le CNR est caractérisé par une grande diversité des sites de prélèvements (écouvillons, sérum, sang total, placenta, liquide amniotique, cordon, biopsies et LCR). Sur la période, les écouvillons et les prélèvements sanguins représentent 12,4% et 29,8% des échantillons, respectivement. Les biopsies, hors prélèvements périnataux, représentent 12,5%. Les prélèvements périnataux (liquide amniotique, placenta, cordon) sont assez stables et représentent 10% des prélèvements. Les LCR représentent 31% des échantillons entre 2006 et 2019. Une légère décline est présente depuis 2016, accentuée en 2019 par le fait que le CNR ne prend plus en charge les LCR non documentés par, au minimum la sérologie sanguine syphilitique et idéalement les données du LCR quant au nombre de cellules, la protéinorachie et la glycorachie.



**Figure. Répartition de la nature des échantillons reçus par le CNR pour une expertise syphilis 2006-2019.**

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

#### 3.3.1 Etude IPERGAY

Depuis 2017, une incidence élevée d'IST a été signalée chez les HSH utilisant la PrEP pour la prévention du VIH dans le cadre de l'essai ANRS IPERGAY coordonné par J.-M. Molina. Suite à cette observation, 210 sujets HSH ont été recrutés dans une sous-étude prospective randomisée (1:1) reposant sur une prophylaxie-pré-exposition (PEP) avec ou sans doxycycline (200 mg dans les 24 h suivant le rapport sexuel). Cette étude rapportait que la PEP par la doxycycline réduisait drastiquement l'incidence de la syphilis et des chlamydioses chez les HSH mais n'avait pas d'impact sur l'incidence des infections à gonocoques (Molina et al, Lancet Infect Dis, 2018).

En complément de ce travail, le CNR des IST bactériennes (B. Berçot et C. Bébéar) a évalué **la prévalence et l'incidence des infections à *M. genitalium* et la résistance des infections à *M. genitalium* et *N. gonorrhoeae* chez les HSH PrEPeurs prenant ou pas de la doxycycline PEP**, inclus dans l'essai ANRS ouvert IPERGAY. **La présence de *T pallidum* dans les prélèvements a été également recherchée par nPCR par le CNR à l'hôpital Cochin (N. Dupin).**

##### *M. genitalium* chez les PrEPeurs dans la cohorte Ipergay

Afin de déterminer la prévalence de l'infection à *M. genitalium* dans la sous-étude Ipergay, tous les sujets inclus entre d'août 2015 à juin 2016 ont été dépistés at baseline puis à 6 mois par des tests PCR en temps réel pour la détection de *M. genitalium* sur les 3 sites (urine, gorge et anus). La prévalence de *M. genitalium* sur tous les sites était au départ de 10,5% (6,3% dans les échantillons d'urine, 4,3% dans les prélèvements anaux et 0,5% dans les prélèvements de gorge) et est restée inchangée après 6 mois, que la PEP ait été utilisée ou non, soit 9,9% dans l'ensemble, 10,2% avec la PEP et 9,6 % sans la PEP. Les prélèvements positifs à *M. genitalium* hébergeaient fréquemment **une souche résistante à l'azithromycine (66,7%) et à la moxifloxacine (9,09%)**. De plus, il a été décrit pour la première fois à notre connaissance, **une mutation *in vivo* de l'ARNr 16S de *M. genitalium* qui pourrait être associée à une résistance à la tétracycline** dans 2/16 (12,5%) des échantillons testés.

Cette étude a fait l'objet d'une présentation affichée à la **CROI 2019** et **une publication a été soumise à Clin Infect Dis** : B. Berçot, I. Charreau, C. Rousseau, C. Delaugerre, C. Chidiac, G. Pialoux, C. Capitant, N. Nicolaos, F. Raffi, S. Pereyre, C. Le Roy, E. Senneville, L. Meyer, C. Bébéar\*, J.-M. Molina\* (\*co-last authors) and the ANRS Ipergay Study Group. High prevalence and high rate of antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* infections in men who have sex with men. A Sub-Study of the ANRS Ipergay PrEP Trial.

##### *N. gonorrhoeae* chez les PrEPeurs dans la cohorte Ipergay

Afin de déterminer la résistance des gonocoques isolés chez patients infectés dans la sous-étude Ipergay et en l'absence de souches isolées chez tous les patients, les échantillons détectés positifs ont été explorés pour la résistance à la tétracycline (recherche du gène *tet(M)* et/ou de mutations du gène de la prtéine ribosomique S10), aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Au cours de cette période, 56 patients (26,6%) ont été détectés positifs par PCR. Le taux global de résistance des gonocoques aux tétracyclines tout échantillon confondu était évalué à 82,9 % dont 18,6 % à un niveau de résistance élevé (gène *tetM* détecté). **Une résistance aux tétracyclines était observée chez 89,5 % des patients *N. gonorrhoeae*-positifs dans le groupe PEP vs 73,7% dans le groupe sans PEP (p=0,41)**. Les souches étaient peu clustérisées et appartenait à 15 profils différents, les plus fréquents étaient ST 5624 (21%), ST 5441 (12,5%) et ST 5793 (12,5%). A titre de comparaison, ces ST ont été trouvés respectivement dans 3,1%, 9,7% et 2,6% des cas en France sur la même période. En conclusion, la résistance aux tétracyclines chez le gonocoque chez les PrEPeurs était élevée, avec ou sans PEP à la doxycycline. Le travail a été accepté et notifié dans le congrès virtuel de **l'ECCMID 2020**.

La PEP à la doxycycline dans l'étude ancillaire ANRS Ipergay sur 210 patients n'a pas augmenté l'incidence et la résistance à doxycycline du gonocoque et de *M. genitalium*. Une étude, avec un recueil d'un nombre de souches de gonocoque et de prélèvements positifs à *M. genitalium* plus important, permettra de consolider ou d'infirmes ces premières observations lors de l'étude ANRS174 Doxyvac coordonnée par J.-M. Molina et dans laquelle les échantillons seront centralisés au CNR (cf programme d'activité, paragraphe 8.3).

##### *T. pallidum* chez les PrEPeurs dans la cohorte Ipergay

L'objectif de cette étude était d'évaluer rétrospectivement les performances de la technique de **nPCR *tpp47* diagnostique de la syphilis du CNR chez les participants ayant présenté une syphilis au cours de l'étude PEP doxycycline**, diagnostiquée sur tests tréponémiques et non tréponémiques. **Soixante et onze échantillons ont été**

### analysés et six se sont révélés positifs.

Le choix des cibles s'est fait sur : les syphilis validées par le comité de validation ; les échantillons de type plasma, écouvillon oral et écouvillon anal ; la visite de diagnostic (+3 jours) et la visite précédente avec un délai entre les 2 visites < 150 jours. Quatorze participants ont présenté une syphilis à la randomisation (1 asymptomatique) ou au cours de l'étude (13 dont 10 symptomatiques). Treize participants ont eu 71 prélèvements testés (plasma, écouvillons oral et anal) à la visite de diagnostic (visD) et à la visite précédente visD-1 pour 10 d'entre eux, visD-2 pour 3 d'entre eux.

Les résultats des PCR réalisées sur 3 sites à la visite de diagnostic et à la visite précédente visD-1 ou VisD-2 sont les suivants :

- PCR sur plasma : 26/28 PCR (13/14 participants)
- PCR sur écouvillon oral : 23/28 PCR (12/14 participants)
- PCR sur écouvillon anal : 22/28 PCR (11/14 participants)

Type Prlvt	PCR Négative	PCR Positive	Total
Plasma	25	1	26
Ecouv. oral	21	2	23
Ecouv. anal	19	3	22
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>6</b>	<b>71</b>

### 3.3.2 Surveillance de la sensibilité de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* aux antibiotiques en France métropolitaine en 2019 (MYCOMET 2019)

Les échantillons cliniques positifs à *Ureaplasma* spp. et/ou *M. hominis* en culture ont été collectés en France métropolitaine du 15 septembre au 15 octobre 2019, conservés à -20°C puis envoyés au CNR via un transporteur mandaté (BioLogistic). Parmi les 347 échantillons collectés, 318 échantillons étaient positifs à *Ureaplasma* spp. et 76 échantillons étaient positifs à *M. hominis* dont 47 étaient également positifs à *Ureaplasma* spp..

Les CMI de 7 antibiotiques (tétracycline, doxycycline, lévofloxacine, moxifloxacine, érythromycine, azithromycine et clindamycine) seront déterminées grâce aux plaques Biocentric (voir programme d'activités à venir) pour les souches qui ont pu être remises en culture au CNR. Les critères de détermination de résistance utilisés sont ceux définis par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les mycoplasmes humains, seuls existants à l'heure actuelle.

### 3.3.3 Surveillance de la résistance de de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine et en outre-mer en 2019 (DROM 2019)

#### 3.3.3.1 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et fluoroquinolones à Bordeaux

• **La résistance aux macrolides** a été étudiée sur l'ensemble échantillons positifs à *M. genitalium* collectés au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux **en 2019** (Figure).

La résistance aux macrolides chez *M. genitalium* est apparue à Bordeaux en 2006. Après un palier autour de 14-15% entre 2007 et 2012, la résistance a été en forte augmentation entre 2015 et 2018 où elle culminé à 33%. En 2019, cette résistance est mesurée à 28,2%, sans différence significative avec celle de 2018 ( $p=0,45$ , test du Khi2).

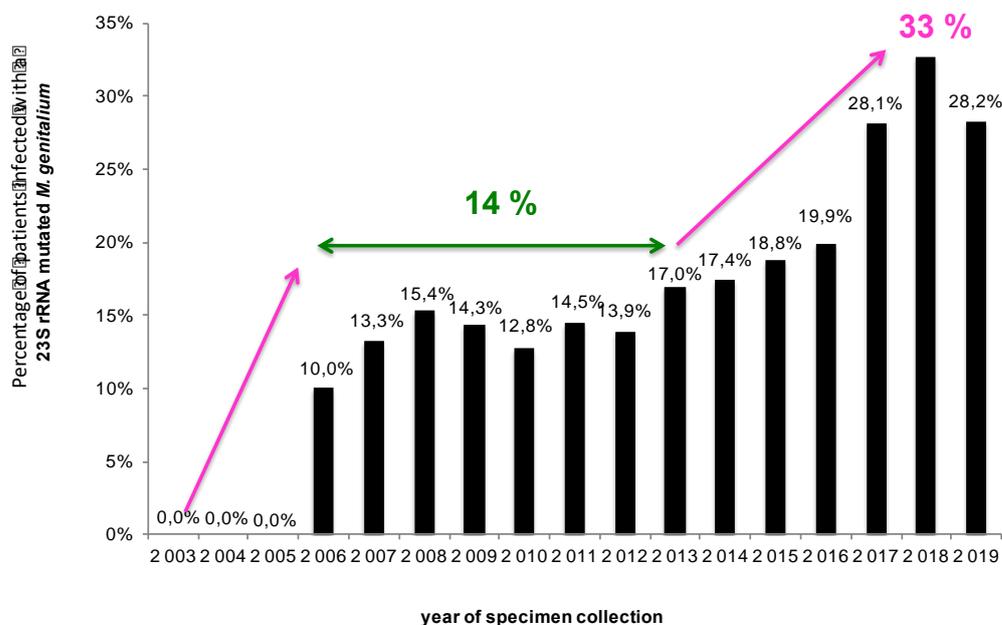


Figure. Evolution de la résistance aux macrolides de *M. genitalium* au CHU de Bordeaux 2003-2019.

• La résistance aux fluoroquinolones a été étudiée en 2019 dans une étude rétrospective portant sur l'année 2018, sur les échantillons positifs à *M. genitalium* collectés au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux pour lesquels la sensibilité ou la résistance aux macrolides avait été établie. La recherche de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones a été réalisée par amplification et séquençage de la 'Quinolone Resistance Determining Region' (QRDR) du gène *parC*, codant la topoisomérase IV, cible de ces antibiotiques.

Au total, 202 patients ont pu être analysés. Sept mutations différentes décrites dans la littérature comme associées à la résistance aux fluoroquinolones chez *M. genitalium* ont été retrouvées au niveau de la séquence protéique de ParC parmi 22 patients : 2 patients présentant la mutation Gly81(78)Cys, 2 patients présentant la mutation Ser83(80)Asn (récemment décrite comme non associée à une augmentation de CMI de la moxifloxacine et un échec thérapeutique chez *M. genitalium*), 14 patients présentant la mutation Ser83(80)Ile, 2 patients présentant Asp87(84)Asn et 2 patients présentant la mutation Asp87(84)Tyr (numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèses). La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones de *M. genitalium* de la cohorte bordelaise en 2018 était de 9,9% (20/202). Cette prévalence a augmenté par rapport à celle de 2017 (1,9%, 6/320). De plus, 14 patients présentaient une double résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones soit une prévalence de double résistance de 6,43% (13/202). A noter qu'en 2017, il n'y avait pas de double résistance identifiée parmi les patients bordelais.

### 3.3.3.2 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine (MYCOMET 2019)

L'objectif de cette enquête a été de déterminer la prévalence nationale de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en 2019.

Dans les centres participants, pendant un mois, du 15 septembre au 15 octobre 2019, tous les échantillons positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge) ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier Excel comportant le sexe, la date de naissance, la nature de l'échantillon, le service demandeur, la notion de dépistage et de symptômes, le traitement antérieur par macrolides.

Au CNR, les extraits d'ADN des échantillons ont été obtenus avec le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume sur l'instrument MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics). La résistance aux macrolides a été recherchée par PCR en temps réel de type FRET ou par une PCR multiplex commercialisée (ResistancePlus, SpeedX) en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET. Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature précise de la mutation. Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR du gène *parC*.

Un total de **391 échantillons positifs à *M. genitalium*** ont été reçus de **19 centres** en France métropolitaine (Figure ci-dessous).

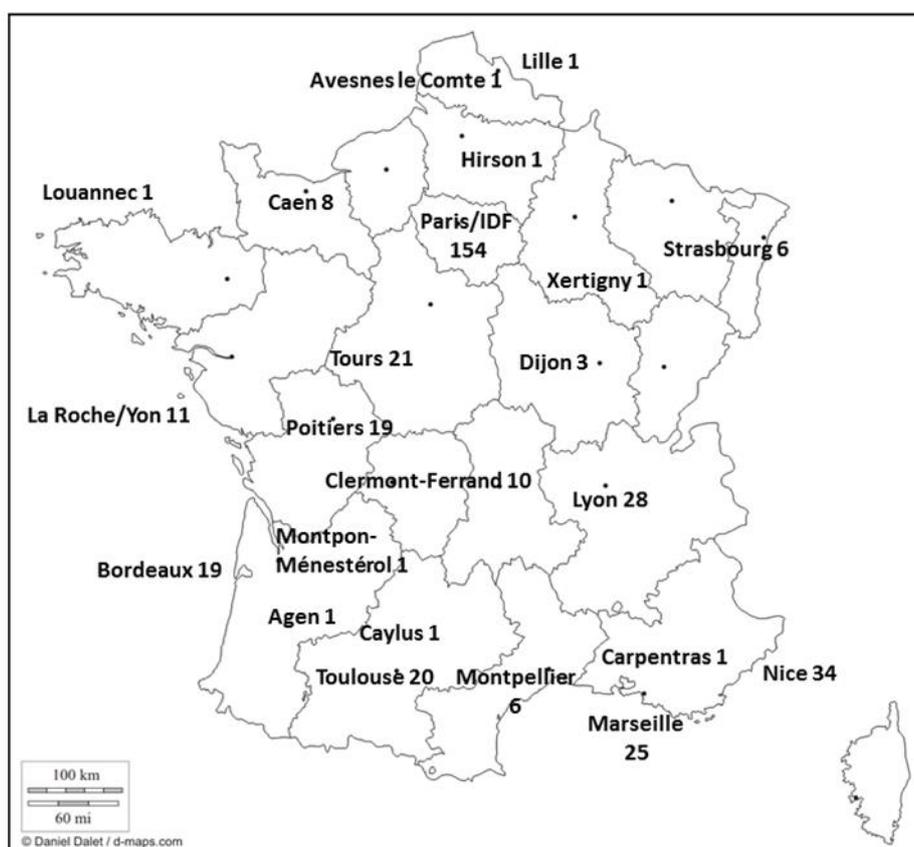


Figure. Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par ville.

### Population étudiée

Au total, 391 échantillons provenant de 379 patients (48,8% de femmes et 51,2% d'hommes) ont été collectés. Parmi les échantillons féminins, 80,2% (150/187) étaient des écouvillons cervicovaginaux, 8,6% (16/187) des échantillons d'endomètre, 8,6% (16/187) des premiers jets d'urine, 2,1% (4/187) des échantillons anorectaux, 0,5% des écouvillonnages de gorge (1/187) et l'information était manquante pour deux prélèvements. Les échantillons masculins comprenaient 59,1% (119/202) d'urines de premier jet, 29,2% (59/202) d'échantillons anorectaux, 7,9% (16/202) d'écouvillonnages urétraux, 3,5% (7/202) d'écouvillonnages de gorge et 0,5% (1/202) de prélèvement génitaux.

**L'âge moyen des patients était de 30,1 ans** et l'âge médian était de 27 ans (avec une amplitude de 16 ans à 76 ans). Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 32,7 ans vs 27,2 ans ( $p < 0,001$  ; test de Student). Nous n'avons pas d'information concernant l'âge pour deux patientes. La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe 21-25 ans (27,3%) suivi de la classe 26-30 ans (27,1%) ; 35,5% des femmes avaient entre 21 et 25 ans et 32,0% des hommes étaient âgés de 26 à 30 ans.

Parmi les personnes ayant accepté de renseigner leurs pratiques sexuelles, **66,3% (53/80) déclaraient avoir des pratiques hétérosexuelles**. Sur les 31 hommes ayant déclaré leurs pratiques, 80,6% (25/31) étaient des HSH. À noter que 78,9% (299/379) des patients avaient des pratiques **inconnues**.

Parmi les patients pour lesquels une recherche de *C. trachomatis* a été faite, 9,8% étaient positifs (32/327). La prévalence de la **coinfection *M. genitalium* et *C. trachomatis*** était de 11,6% chez les femmes (19/163) vs 7,9% chez les hommes (13/164) ( $p = 0,25$  ; test du Chi2). En ce qui concerne *N. gonorrhoeae*, 3,7% des patients testés (12/328) étaient positifs. La prévalence de la **coinfection *M. genitalium* et *N. gonorrhoeae*** était de 3,7% chez les femmes (6/163) vs 3,6% chez les hommes (6/165) ( $p = 0,98$  ; test du Chi2).

Parmi les patients pour lesquels le **statut HIV** était connu, une séronégativité était notée pour 89,6% (95/106) des

patients, tandis que **10,4% (11/106) d'entre eux était séropositifs**. Le statut sérologique pour le HIV était inconnu pour 72,03% (273/379) des patients. Aucune différence statistiquement significative n'était à noter entre les hommes et les femmes ; en effet, 15,4% des hommes (8/52) pour lesquels nous avons le statut HIV étaient positifs vs 5,6% des femmes (3/54) ( $p=0,09$  ; test de  $\chi^2$ ).

### Prévalence de la résistance aux macrolides

Parmi les 291 échantillons pour lesquels une amplification de l'ARNr 23S a été obtenue, 64,6% (188/291) étaient sensibles aux macrolides tandis que 35,4% (103/291) d'entre eux étaient résistants. **La proportion de patients ayant une souche résistante aux macrolides était de 34,5% (99/287)**.

Tableau. Prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones par centre participant.

Centre	Type de centre	Nb de patients	Nb (%) de patients avec résistance aux macrolides*	Nb (%) de patients avec sensibilité aux macrolides*	Nb (%) de patients avec résistance aux fluoroquinolones*	Nb (%) de patients avec sensibilité aux fluoroquinolones*	Nb (%) de patients avec une double résistance**
BARLA NICE	Privé	33	10 (37)	17 (63)	4 (14)	25 (86)	2 (8)
CLINIQUE PASTEUR TOULOUSE	Privé	4	2 (50)	2 (50)	0	4 (100)	0
BIO 67 STRASBOURG	Privé	6	0	4 (100)	0	4 (67)	0
BIORYLIS	Privé	11	2 (25)	6 (75)	0	8 (73)	0
CERBA	Privé	45	13 (37)	22 (63)	4 (15)	22 (85)	4 (25)
LDA 13, MARSEILLE	CeGIDD	5	2 (67)	1 (33)	0	5 (100)	0
CH CAEN	CH	8	0	5 (100)	2 (29)	5 (71)	0
CHU BORDEAUX	CHU	11	2 (20)	8 (80)	0	7 (64)	0
CHU CLERMONT FERRAND	CHU	10	2 (22)	7 (78)	1 (11)	8 (89)	0
CHU DIJON	CHU	3	1 (50)	1 (50)	0	2 (67)	0
CHU LYON	CHU	28	11 (58)	8 (42)	4 (21)	15 (79)	1 (6)
CHU MARSEILLE	CHU	20	3 (20)	15 (80)	1 (8)	11 (92)	0
CHU MONTPELLIER	CHU	6	4 (67)	2 (33)	0	1 (17)	0
CHU POITIERS	CHU	19	3 (20)	12 (80)	2 (22)	7 (78)	2 (22)
CHU TOULOUSE	CHU	16	3 (21)	11 (79)	0	16 (100)	0
CHU TOURS	CHU	20	4 (37)	7 (63)	0	15 (75)	0
ANTOINE BECLERE	CHU APHP	7	0	3 (100)	0	2 (29)	0
LOUIS MOURIER	CHU APHP	16	1 (8)	11 (92)	0	9 (56)	0
SAINT-LOUIS	CHU APHP	111	36 (44)	46 (56)	26 (27)	72 (63)	13 (16)
<b>19</b>		<b>379</b>	<b>99 (34,5)</b>	<b>188 (66)</b>	<b>44 (15,6)</b>	<b>238 (74)</b>	<b>22 (9,2)</b>

\*Le % de résistance et de sensibilité aux macrolides et aux fluoroquinolones est calculé à partir des patients pour lesquels une amplification de l'ARNr 23S ou du gène *parC* a pu être obtenue. \*\*Le % de double résistance est calculé à partir des patients pour lesquels une amplification de l'ARNr 23S et du gène *parC* a pu être obtenue

Parmi les 103 échantillons présentant une mutation associée à la résistance, les mutations A2058G et A2059G (numérotation *E. coli*) étaient les plus fréquentes dans 63,1% (65/103) des cas (45 A2059G ; 17 A2058G ; 2 A2058G/WT ; 1 A2058G/A2059G/WT), suivi de la substitution A2058T dans 11,6% (12/103) des cas. Dans 25,2% (26/103) des cas, la position exacte de la mutation n'a pas pu être déterminée.

Aucune différence statistiquement significative n'apparaissait entre le taux de résistance aux macrolides dans les CeGIDD 41,1% (37/90), les centres hospitaliers 31,4% (37/118) et le secteur privé 31,4% (25/97) ; ( $p>0,05$  ; test du Chi2).

**La prévalence de la résistance aux macrolides était de 52,7% chez les hommes (77/146) versus 15,7% chez les femmes (22/140) ( $p<0,001$  ; test du Chi2).** En ce qui concerne les hommes, la prévalence de la résistance était de 65,8% (25/38) sur les prélèvements anaux versus 49,6% (56/113) pour les autres sites de prélèvement ( $p=0,08$  ; test du Chi2). Il n'y avait pas non plus de différence significative de la résistance aux macrolides chez les patients d'Ile de France (40/102=39,2%) versus les patients de métropole hors Ile de France (52/164=31,7 %), ( $p=0,2$  ; test du Chi2). Les pratiques sexuelles des patients n'étaient connues que pour 51 d'entre eux ; **Parmi les HSH, 71,4% (10/14) étaient résistants aux macrolides versus 21,6% (8/37) dans la population hétérosexuelle ( $p<0,05$  ; test exact de Fisher).** Un meilleur recueil des données aurait pu donner plus de robustesse à cette significativité. La résistance aux macrolides chez les patients négatifs pour le VIH était de 33,8% (22/65) versus 44,4% (4/9) chez les patients positifs au VIH ( $p=0,7$  ; test exact de Fisher).

### **Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones**

Les échantillons positifs à *M. genitalium* ont été soumis à une PCR en point final ciblant la QRDR *parC* suivie d'un séquençage pour rechercher les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones. Aucune amplification ou séquençage du gène *parC* n'a pu être obtenue chez 25,1 % (98/391) des échantillons.

Parmi les 293 échantillons, correspondant à 282 patients, analysés par séquençage, 82,3% (241/293) étaient sauvages tandis que 17,7 % (52/293) présentaient une mutation dans la QRDR. Néanmoins, selon les données de la littérature, toutes les mutations observées dans la QRDR du gène *parC* ne sont pas associées à la résistance aux fluoroquinolones. Dix mutations différentes ont été retrouvées.

**Tableau. Description des substitutions de la protéine ParC.**

Mutation de la protéine ParC	Nombre de patients porteur de la mutation	Données de la littérature concernant la résistance aux fluoroquinolones
<b>Ser83(80)Arg</b>	<b>3</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
Ser83(80)Asn	2	Décrite récemment comme non associée à la résistance à la moxifloxacine chez <i>M. genitalium</i>
<b>Ser83(80)Ile</b>	<b>36</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
<b>Asp87(84)Asn</b>	<b>2</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
<b>Asp87(84)Tyr</b>	<b>3</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
Ser95(92)Asn	1	Décrite dans l'étude DROM18 du CNR
Ser95(92)Cys	1	Non décrite à ce jour
His106(103)Gln	1	Position décrite dans les études MycoMet18 et DROM18 du CNR mais avec une autre substitution (His106(103)Arg / His106(103)Tyr) .
Ser111(108)Leu	1	Non décrite à ce jour
Asn116(114)Asp	2	Non décrite à ce jour-Position proche du site actif
<b>Total général</b>	<b>50</b>	

D'après les connaissances actuelles, seules les substitutions d'acides aminés en position 83 et 87, à l'exception de Ser83Asn, sont associées à une augmentation de la CMI de la moxifloxacine et à un échec thérapeutique. De fait, la proportion de patients ayant un échantillon contenant une souche mutée en *parC* aux fluoroquinolones était de 17,3% (50/282) et la **prévalence de la résistance aux fluoroquinolones chez les patients testés en France métropolitaine de 15,6% (44/282).**

La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était de 17,8% chez les hommes (26/146) versus 13,2% chez les femmes (18/136) ( $p=0,3$  ; test du Chi2). On constate une différence significative de la résistance aux fluoroquinolones chez les patients d'Ile de France (28/103=27,2%) versus les patients de métropole hors Ile de France (15/153=9,8 %), ( $p<0,05$  ; test du Chi2). La résistance aux fluoroquinolones chez les patients négatifs pour le VIH était de 7,7% (5/35). Parmi les 11 patients VIH-positifs, 4 hébergeaient une souche sensible et aucun n'hébergeait de souche résistante.

La prévalence de la **résistance aux macrolides et fluoroquinolones** a été étudiée en fonction **d'éventuels traitements antérieurs par macrolides**. L'information a pu être recueillie chez 13,8% (52/379) des patients. Parmi les patients préalablement traités par les macrolides, 100% (7/7) étaient infectés par une souche résistante aux macrolides tandis que parmi les patients n'ayant pas reçu de traitement préalable par les macrolides, seulement 24% (6/25) des patients étaient infectés par une souche résistante aux macrolides ( $p < 0,001$ ; test exact de Fisher). La différence de prévalence de résistance aux fluoroquinolones entre les patients préalablement traités ou non traités par les macrolides (11,1% versus 13,6%) n'était, quant à elle, pas significative ( $p = 0,1$ ; test exact de Fisher).

**En conclusion**, la prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* a atteint 34,5%, valeur élevée mais pouvant paraître en baisse par rapport à 2018 où nous rapportions une prévalence de 42,5%. Cependant si nous comparons les résultats en laboratoires constants, c'est-à-dire ceux qui ont participé les deux années (en excluant Cerballiance et le CHU du Mans qui n'ont participé qu'en 2018 et l'hôpital Saint-Louis qui n'a envoyé que 2 échantillons en 2018 vs 120 en 2019), nous obtenons **un taux de résistance aux macrolides de 30,3% en 2019 vs 31% en 2018. La résistance aux macrolides de *M. genitalium* est donc stable entre 2018 et 2019.**

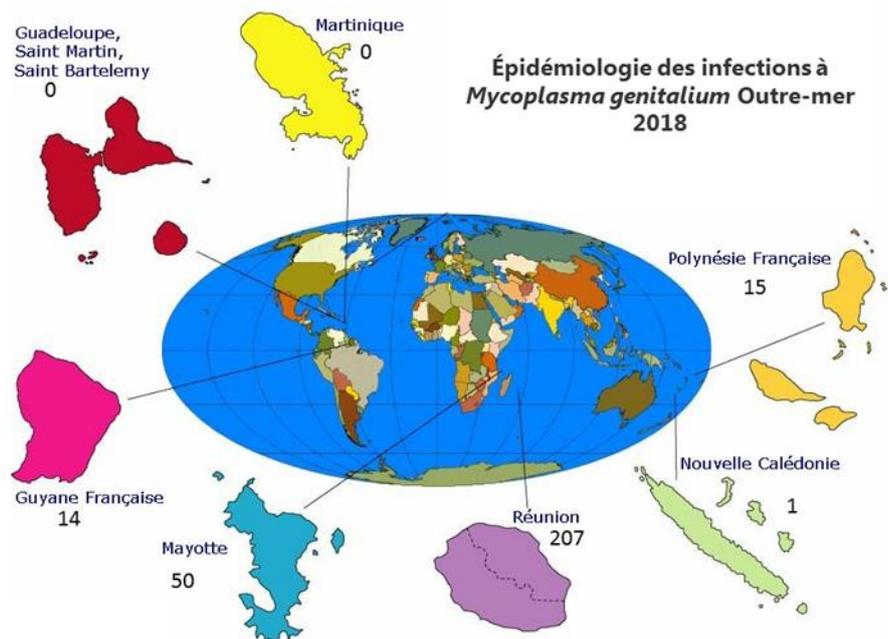
**La résistance aux fluoroquinolones**, moins élevée, se stabilise au niveau national puisque la prévalence était de 7,5% en 2017 versus **15,7% en 2018 puis 15,6% en 2019**. En laboratoires constants, la prévalence était de 10,8% en 2019 vs 15,2% en 2018 ( $p = 0,2$ ). A titre de comparaison, la prévalence à Bordeaux de 6% en 2013-2014 (Le Roy et al, Emerg Infect Dis 2016), 13,2% en 2015 et de 6,3% en 2016. Cette augmentation sur les deux dernières années est préoccupante, la moxifloxacine étant pratiquement la seule alternative en cas d'échec des macrolides.

**Au total**, 244 échantillons positifs à *M. genitalium* provenant de 239 patients, ont pu être analysés pour la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones. Le taux de double résistance s'élève à 9% (22/244) des échantillons. **La proportion de double résistance, calculée pour les 239 patients, s'élève à 9,2% (22/239)**. À noter que 72,7% (16/22) des patients présentant une double résistance étaient des hommes dont l'âge médian était de 31,5 ans.

### **3.3.3.3 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'outre-mer en 2018 (DROM 2018)**

Les résultats de cette enquête ont été présentés dans le rapport 2018 en ce qui concerne la résistance aux macrolides. L'étude de la résistance aux fluoroquinolones, finalisée depuis, est présentée ci-dessous.

Pour rappel, l'objectif de cette enquête était de déterminer la **prévalence de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les territoires et départements d'outre-mer en 2018**, Guadeloupe et Martinique n'ayant pas été incluses. Dans les centres participants, il s'agissait de récolter pendant 3 mois, du 1er août au 31 octobre 2018, tous les échantillons urogénitaux positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge). Les échantillons ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées ou par des transporteurs agréés. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier Excel comportant le sexe, la date de naissance, la nature de l'échantillon, le service demandeur, la notion de dépistage et de symptômes, le traitement antérieur par macrolides.



**Figure. Répartition géographique et nombre d'échantillons reçus par centre.**

Les résultats détaillés de la résistance aux macrolides figurent dans le rapport précédent, avec pour rappel un taux de résistance aux macrolides de 6,1% (14/228) des patients.

#### **Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones**

Les échantillons positifs à *M. genitalium* ont été soumis à une PCR en point final ciblant la QRDR du gène *parC* suivie d'un séquençage pour rechercher les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones. Aucune amplification ou séquençage du gène *parC* n'a pu être obtenue chez 14% (39/278) des échantillons.

Parmi les échantillons analysés provenant de 233 patients, 96,1% (224/233) ne présentaient pas de mutation *parC* tandis que **3,9% (9/233) présentaient une mutation de la QRDR *parC*.**

Nous avons détecté cinq mutations différentes localisées dans la QRDR : Ser83(80)Ile, Ser95(92)Asn, His106(103)Arg, His106(103)Tyr et Ala119(117)Ser (numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèses). Parmi l'ensemble des mutations retrouvées, la mutation Ser83(80)Ile retrouvée chez trois patients (2 hommes et 1 femme de La Réunion) est un « hotspot » de mutation responsable de résistance aux fluoroquinolones. La mutation Ser95(92)Asn retrouvée chez deux patients (1 homme de Mayotte et 1 homme de La Réunion) et la mutation His106(103)Arg retrouvée chez une femme de Mayotte ne sont pas décrites dans la littérature pour *M. genitalium*. La mutation His106(103)Tyr retrouvée chez deux femmes de Cayenne n'a pas été décrite dans la littérature mais a été décrite dans l'enquête effectuée en métropole (MycoMet 2018). La mutation Ala119(117)Ser retrouvée chez un homme de La Réunion n'a pas été décrite dans la littérature mais elle se situe juste à côté du site actif de l'enzyme, l'Alanine en position 116 chez *E. coli*.

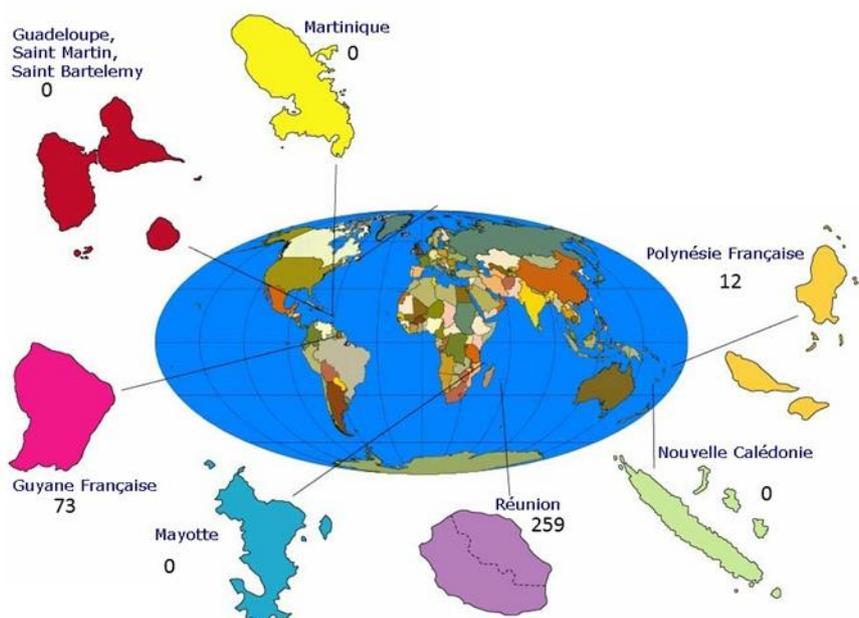
**Tableau. Description des mutations de la protéine ParC.**

Mutation de la protéine ParC	Nombre d'échantillons porteur de la mutation	Données de la littérature concernant la résistance aux fluoroquinolones
Ser83(80)Ile	3	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
Ser95(92)Asn	2	Non décrite à ce jour.
His106(103)Arg	1	Non décrite à ce jour.
His106(103)Tyr	2	Position décrite dans l'étude MycoMet 2018 mais pas d'étude démontrant son association à la résistance aux fluoroquinolones.
Ala119(117)Ser	1	Non décrite à ce jour-Position proche du site actif de la topoisomérase IV, Ala(116) chez <i>E. coli</i> .
<b>Total général</b>	<b>9</b>	

D'après les connaissances actuelles, seules certaines substitutions d'acides aminés en position 83 et 87 sont associées à une augmentation de la CMI aux fluoroquinolones et confèrent une résistance. De fait, **la proportion de patients ayant une souche résistante aux fluoroquinolones en outre-mer était de 1,3% (3/233) en 2018.**

### 3.3.3.4 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'Outre-Mer en 2019 (DROM 2019)

Nous avons récolté, du 1<sup>er</sup> septembre au 30 novembre 2019, tous les échantillons positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouillons rectaux et de gorge). Les objectifs étaient les mêmes que pour DROM 2018.



**Figure. Répartition géographique et nombre d'échantillons reçus par centre.**

#### **Population étudiée**

Au total, 344 échantillons provenant de 342 patients (63,3% femmes, 35,5% hommes 1,2% dont le sexe n'était pas renseigné) ont été collectés entre le 1<sup>er</sup> septembre et le 30 novembre 2019. L'âge moyen des patients était de 29,5 ans et l'âge médian était de 27 ans (avec une amplitude de 14 à 63 ans). Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 33,37 ans vs 27,23 ans ( $p < 0.05$ ; test de Student). La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population et chez les femmes était la classe 20-24 ans (22,2% pour la population totale et 25,5% chez les femmes). Chez les hommes, les deux classes les plus représentées sont les 25-29 et 35-39 ans (19,7% chacune).

Parmi les échantillons féminins, 71,1% (155/218) étaient des écouvillons cervicovaginaux, 22,5% (49/218) des premiers jets d'urine, 5,5% d'endocol (12/218) et 0,9% (2/218) des prélèvements anaux. Les échantillons masculins comprenaient 88,5% (108/122) d'urine de premier jet, 4,1% (5/122) de prélèvements anaux, 4,1% (5/122) de sperme, 3,3% (4/122) de prélèvements urétraux.

### **Prévalence de la résistance aux macrolides**

Les échantillons ont été analysés par PCR en temps réel pour rechercher les mutations associées à la résistance aux macrolides. Aucune amplification du gène de l'ARNr 23S n'a pu être obtenue chez 24,6% (84/342) des échantillons. Parmi les 258 patients pour lesquels une amplification des échantillons a été obtenue, 85,3% (220/258) étaient sensibles aux macrolides tandis que **14,7% (38/258) d'entre eux étaient résistants aux macrolides**.

Parmi les 38 patients présentant une mutation associée à la résistance, six présentaient une mutation A2059G (numérotation *E. coli*). Dans 84,2% (32/38) des cas, la position exacte de la mutation n'a pas pu être déterminée. Cet échec de séquençage peut être dû à une faible charge bactérienne et/ou une qualité de conservation du prélèvement ayant affecté par la suite la qualité de l'ADN. Trente-trois des 38 échantillons résistants étaient issus de la Réunion (22 femmes et 11 hommes), 4 venaient de Polynésie (4 femmes et 1 homme) et un de la Guyane française (1 homme).

### **Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones**

Les échantillons positifs à *M. genitalium* ont été soumis à une PCR en point final ciblant la QRDR *parC* suivie d'un séquençage pour rechercher les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones. Aucune amplification ou séquençage du gène *parC* n'a pu être obtenue chez 21,6 % (74/342) des échantillons.

Parmi les 268 patients dont les échantillons ont été analysés par séquençage du gène *parC*, 93,7% (251/268) hébergeaient une souche sauvage tandis que **6,3% (17/268) hébergeaient une souche mutée au niveau de la QRDR *parC***. Neuf mutations différentes ont été retrouvées (Tableau ci-dessous).

**Tableau. Description des substitutions de la protéine ParC.**

Mutation de la protéine ParC	Nombre d'échantillons porteur de la mutation	Données de la littérature concernant la résistance aux fluoroquinolones
<b>Gly81(78)Cys</b>	<b>1</b>	Mutation associée à la résistance aux fluoroquinolones
<b>Ser83(80)Ile</b>	<b>2</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
<b>Asp87(84)Asn</b>	<b>2</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
<b>Asp87(84)Tyr</b>	<b>2</b>	« Hotspot » associé à la résistance aux fluoroquinolones
Ser83(80)Asn	2	Mutation non associée à la résistance aux fluoroquinolones
Arg91(88)Trp	1	Non décrite dans la littérature. Association à la résistance non déterminée.
Arg91(88)Lys	5	Non décrite dans la littérature. Association à la résistance non déterminée.
Ser104(101)Phe	1	Non décrite dans la littérature. Association à la résistance non déterminée.
Ile105(102)Phe	1	Non décrite dans la littérature. Association à la résistance non déterminée.
<b>Total général</b>	<b>17</b>	

Seules les substitutions d'acides aminés en position 81, 83 et 87 sont associées à une augmentation de la CMI aux fluoroquinolones et confèrent une résistance, à l'exception de la mutation Ser83(80)Asn. **De fait, le taux de résistance aux fluoroquinolones en outre-mer est de 2,6% (7/268)**.

### **Double résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones**

Parmi les échantillons reçus des 342 patients, 216 ont pu être analysés pour la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones. **Le taux de double résistance s'élève à 0,9% (2/216)**. Ce taux était nul en 2018.

En 2018 et en 2019, la résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones et la double résistance étaient statistiquement plus élevées en France métropolitaine qu'en outre-mer (Tableau ci-dessous). En outre-mer, la prévalence de la résistance aux macrolides était de 14,7% en 2019, sans différence entre hommes et femmes, mais globalement significativement plus élevée qu'en 2018 où elle était mesurée à 6,1% (p=0,002). Cette augmentation significative concernait seulement les femmes avec 15,6% de résistance aux macrolides en 2019 versus 6,0% en 2018 (p=0,006).

**Tableau. Comparaison de la prévalence des mutations associées à la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez *M. genitalium* en France métropolitaine et en outre-mer en 2018 et 2019.**

Mutations associées à la résistance	Année	Total France métropolitaine % (N / N total) [IC 95%]	Total France d'outre-mer % (N / N total) [IC 95%]	p-value
Mutations ARNr 23S associées à la résistance aux macrolides	2018	42,9 113/263 [36,9-48,9]	6,1 14/228 [3,0-9,2]	< 0,001
	2019	34,7 99/285 [29,2-40,3]	14,7 38/258 [10,4-19,0]	< 0,001
Mutations QRDR <i>parC</i> associées à la résistance aux fluoroquinolones	2018	15,7 40/254 [11,3-20,2]	1,3 3/233 [0,2-2,7]	< 0,001
	2019	15,6 44/282 [11,3-19,7]	2,6 7/268 [0,7-5,4]	< 0,001
Double résistance macrolides/fluoroquinolones	2018	11,2 24/214 [7,0-15,4]	0	-
	2019	9,2 22/239 [5,5-12,9]	0,9 2/216 [0,0-2,2]	< 0,001

IC 95% : intervalle de confiance à 95%

Un manuscrit présentant les résultats de la prévalence de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine et d'outre-mer de 2017 à 2019 est en cours de rédaction.

### 3.3.4 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* en France en 2018 et 2019 (ENGON 2018-2019)

#### 3.3.4.1 Modification des règles du CA-SFM en 2019, homogénéisation avec celles de l'EUCAST

En 2019, la méthode de détermination de la sensibilité aux antibiotiques pour le gonocoque a été harmonisée par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CA-SFM**) avec les méthodes du Comité Européen pour les Tests de Susceptibilité aux Antimicrobiens (**EUCAST**) (cf. Tableau ci-dessous) avec l'aide du CNR IST bactériennes (B. Berçot). La réalisation de l'antibiogramme repose sur la méthode par diffusion en milieu gélosé (gélose chocolat PolyViteX®) ensemencé à partir d'un inoculum à 0,5 McFarland. Les géloses sont incubées sous environ 5% de CO<sub>2</sub> à 35°C±2°C. La détermination de la sensibilité du gonocoque repose sur la réalisation de CMI en technique E-test des molécules recommandées : le céfixime qui sert au dépistage des souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, la pénicilline G, la ceftriaxone, l'azithromycine, la spectinomycine, la ciprofloxacine, la tétracycline. L'interprétation par la méthode des disques a été supprimée. La production de bêta-lactamase doit être détectée par une technique chromogénique. Les souches productrices de bêta-lactamase seront catégorisées résistantes à la pénicilline G et aux aminopénicillines.

Ces modifications sont accompagnées de **recommandations de traitement**. Ainsi, si la CMI de la ceftriaxone est proche de 0,125 mg/L, une posologie de 500 mg est suffisante pour une éradication du gonocoque au niveau du site génital mais pas du site pharyngé. Des échecs ayant été décrits en localisation pharyngée, pour obtenir une éradication lorsque la CMI de la ceftriaxone est supérieure ou égale à 0,125 mg/L, il convient d'utiliser soit la ceftriaxone à la posologie de 1g, soit une association 500 mg de ceftriaxone + 1g d'azithromycine. Les souches résistantes au céfixime

et/ou à la ceftriaxone étant rares, il convient de les adresser au CNR IST.

Pour l'azithromycine, les concentrations critiques de sensibilité ont été supprimés par l'EUCAST dans la version de janvier 2020 sur la base d'échecs de traitement rapportés avec l'azithromycine pour des souches de gonocoque présentant une CMI de l'azithromycine à 0,25 mg/L. Les souches seront considérées résistantes si la CMI est supérieure ou égale à la valeur de l'Ecoff (1 mg/L). Cette mesure n'a pas été encore appliquée en France mais fera l'objet d'un prochain ajustement.

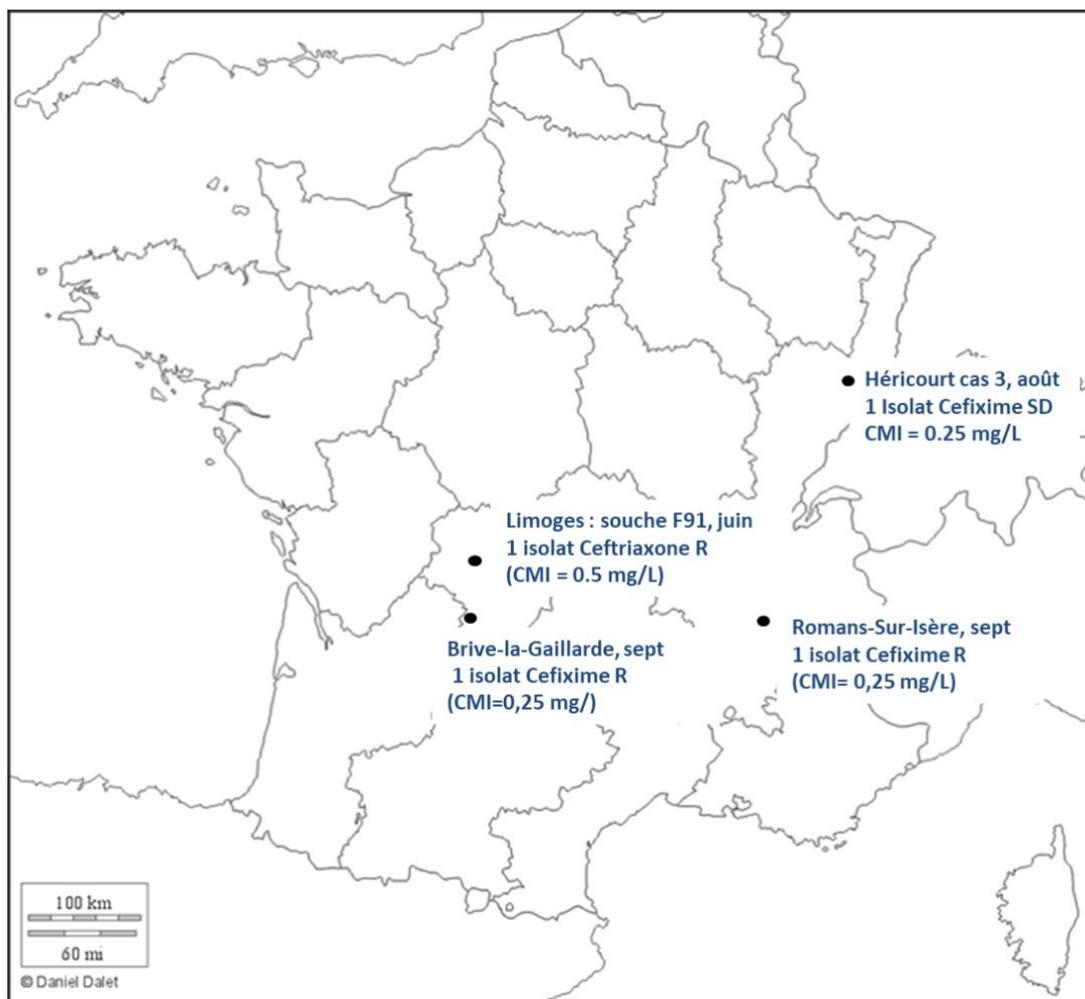
Par ailleurs, la gentamicine étant proposée comme alternative de traitement, cette molécule pourrait rejoindre le panel recommandé à tester. Il n'y a pas de concentrations critiques disponibles pour cette molécule en 2020, mais une valeur d'Ecoff pour laquelle la population sauvage se situe à une valeur de CMI inférieure ou égale à 16 mg/L (<https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?id=20939>).

**Tableau. Catégorisation des gonocoques en sensible, intermédiaire ou résistant (SIR) en fonction des concentrations critiques pour chaque antibiotique (d'après le CA-SFM 2020).**

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)	
	S ≤	R >
Pénicilline G	0,06	1
Amoxicilline	0,25	2
Céfixime	0,125	0,125
Ceftriaxone	0,125	0,125
Céfotaxime	0,125	0,125
Spectinomycine	64	64
Tétracycline	0,5	1
Minocycline	0,5	1
Azithromycine	0,25	0,5
Ofloxacin	0,125	0,25
Ciprofloxacine	0,03	0,06

#### 3.3.4.2 Souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération en 2019

Des souches de *N. gonorrhoeae* à haut niveau de résistance à la ceftriaxone en France ont été observées sporadiquement en 2017 (souche F90, Paris) et en 2010 (souche F89, Finistère). Durant l'année 2019, 4 cas d'infections à gonocoques résistants ou de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ont été identifiés. Deux souches étaient résistantes à haut niveau à la ceftriaxone et étaient reliées à une acquisition en Asie ; les 3 autres étaient de sensibilité diminuée ou résistantes au céfixime et acquises en France métropolitaine. La répartition des souches est visualisée sur la carte ci-dessous et les cas détaillés plus bas.



**Figure. Distribution géographique des souches de gonocoque de sensibilité diminuée ou résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération en 2019.**

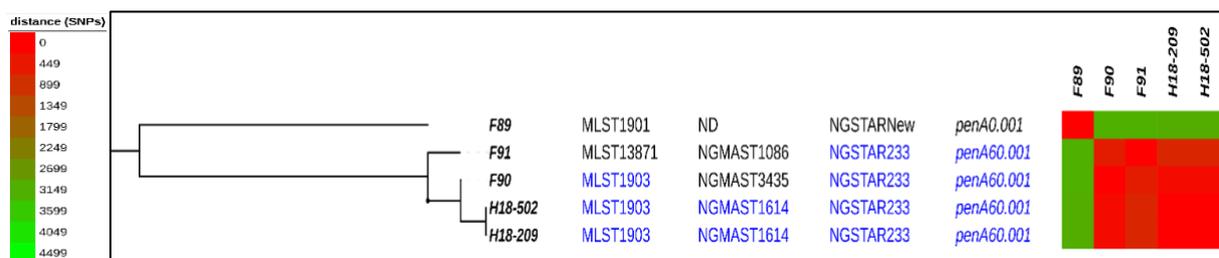
- Transmission de souches de gonocoque résistantes à haut niveau à la ceftriaxone en lien avec un voyage.

En juin 2019, deux observations d'infection à une souche de gonocoque hautement résistante à la ceftriaxone ont été faites pour un couple d'hétérosexuels en Nouvelle Aquitaine. Les deux patients ont été traités avec succès par une injection IM unique de 1g de ceftriaxone. L'homme, présentait une urétrite non compliquée, au retour d'un voyage de plusieurs semaines au Cambodge (province du Battambang) où il déclarait avoir eu des relations sexuelles non protégées avec un(e) personne en situation de prostitution. Sa compagne, qui n'avait pas voyagé, a également présenté 2 semaines plus tard des signes de vaginite. La souche issue du prélèvement vaginal de la patiente (souche F91) a fait l'objet d'un envoi au CNR pour investigation phénotypique et génotypique en juillet 2019.

**La souche F91** présentait un phénotype **multi-résistant avec un haut niveau de résistance à la ceftriaxone (CMI = 0,5 mg/L), au céfixime (CMI = 2 mg/L)**, à la ciprofloxacine (CMI  $\geq$  32 mg/L), une résistance de bas niveau à la tétracycline (CMI = 4 mg/L), une activité  $\beta$ -lactamase positive (disque à la nitrocéfine). L'isolat était cependant sensible à la spectinomycine (CMI = 8 mg/L) et à l'azithromycine (CMI = 0,5 mg/L, le cut-off épidémiologique étant fixé à 1mg/L).

L'analyse *in silico* des données de séquençage à haut débit (technologie illumina, hôpital Saint-Louis) a permis d'attribuer à la souche le type **MLST13871, NG-MAST ST1086** et les déterminants de résistance suivants : allèle mosaïque *penA60.001* (PLP2 mosaïque, résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération), gène *blaTEM-1B* (pénicillinase TEM-1B sur un plasmide pJD4, résistance aux pénicillines), mutations des QRDR GyrA S91F et ParC S87R (haut niveau de résistance à la ciprofloxacine), mutation V57M dans la protéine ribosomique S10 (bas niveau de résistance à la tétracycline), délétion d'une adénine du promoteur de *mtrR* (hyperexpression du système d'efflux MtrCDE) et haplotype G120K/A121D dans la porine PorB.

Une **comparaison du core-genome de la souche F91** à ceux de souches cliniques à haut niveau de résistance isolées précédemment en France, au Japon (souche index FC428), au Royaume-Uni et en Irlande a été réalisée et illustrée par l'arbre phylogénétique (cf. Figure ci-dessous).



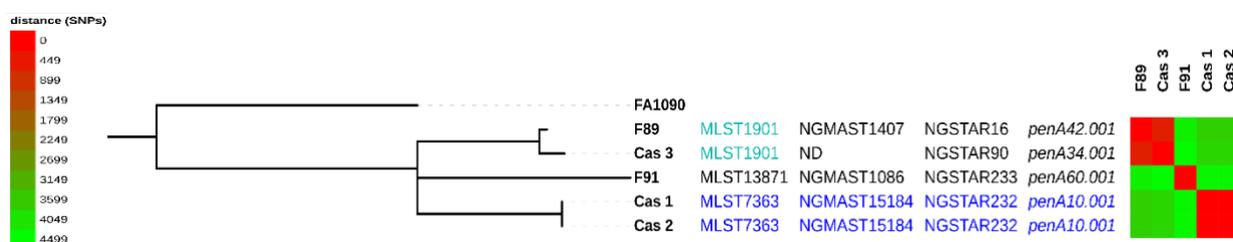
**Figure. Phylogénie de l'isolat F91 de *N. gonorrhoeae* résistant de haut niveau à la ceftriaxone décrit en France par rapport aux isolats de *N. gonorrhoeae* résistants à la ceftriaxone décrits en France (isolat F90, 2017) et observés en Europe et au Japon. L'arbre est enraciné sur l'isolat F89.**

Cette comparaison a permis le rattachement de la souche F91 au clone « FC-428 », de diffusion mondiale depuis 2015. Ce clone de MLST1901 a émergé en Asie du Sud-Est et est associé à un phénotype multirésistant (allèle *penA60.001* responsable du haut niveau de résistance à la ceftriaxone) et des échecs de traitement. Les observations ont surtout concerné des patients hétérosexuels (hommes et femmes) au retour de voyages en Asie du Sud-Est, avec une notion de rapport sexuel non protégé sur le lieu de vacances. Concernant les 2 souches de patients britanniques (H18-502 et H18-509), Eyre et al. Eurosurveill 2019 rapportent la probable acquisition de ce clone lors d'un séjour touristique sur l'île d'Ibiza, Espagne. Cette observation permet de suspecter l'implantation et la circulation de ce nouveau clone dans les réseaux de transmission en Europe. Ces travaux ont été publiés dans **Eurosurveill en 2019**, T. Poncin, et al., <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.36.1900528>).

- Souches de gonocoques résistantes ou de sensibilité diminuée au céfixime en dehors d'un contexte de voyage

En septembre 2019, un patient de 21 ans hétérosexuel (**cas n°1**), résidant dans la région de Limoges (87), a consulté pour une uréthrite gonococcique suite à un rapport non protégé. La souche isolée à partir du prélèvement urétral était résistante au céfixime (CMI=0,25 mg/L) aux fluoroquinolones, aux tétracyclines mais sensible à la ceftriaxone (CMI= 0,064 mg/L). La CMI de l'azithromycine était de 0,25 mg/L. Le patient a été traité avec une bithérapie associant la ceftriaxone (500 mg) et l'azithromycine (1g). En parallèle, une patiente de 17 ans a consulté la même semaine dans la Drome (Romans sur Isère) pour une cervicite à gonocoque (**cas n°2**). La souche a été isolée d'un prélèvement vaginal et présentait le même profil de résistance que celle isolée dans le cas n°1.

Le séquençage du génome entier de ces 2 souches de gonocoque a révélé que les isolats des cas n°1 et 2 étaient étroitement liés phylogénétiquement. Les 2 clones correspondent au MLST 7363, NG-MAST 15184 et NGSTAR 232 (cas n°11 et 2, Figure ci-dessous) et avaient une distance de 8 nucléotides d'écart (SNP) en core genome. Ces deux cas n'ont pas pu être liés et les 2 patients ont été perdus de vue.



**Figure. Phylogénie des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération en 2019.**

Le **cas n°3** concerne un patient bisexuel âgé de 20 ans souffrant d'une uréthrite gonococcique qui n'avait pas voyagé et qui résidait en Haute-Saône (Héricourt). La souche était de sensibilité diminuée au céfixime (CMI=0,125 mg/L), résistante aux fluoroquinolones et tétracyclines, mais restait sensible à la ceftriaxone (CMI= 0,032 mg/L). La CMI de l'azithromycine était à 0,25 mg/L. Le patient a été traité de manière probabiliste au moment du prélèvement par 1,5 g d'azithromycine et une dose de céfixime puis a été perdu de vue. Le NGS a permis de retrouver une souche de MLST

1901, de NGMAST non déterminé, de NGSTAR 90 et hébergeant l'allèle mosaïque *penA34.001* (codant une protéine liant les pénicillines de faible affinité aux  $\beta$ -lactamines). Cette souche est reliée au clone de NGMAST ST 1407 qui circulait en France en 2010-2012 ; elle est phylogénétiquement proche de la souche F89 hautement résistante à la ceftriaxone isolée en 2010 (578 SNP d'écart).

Ces différents cas illustrent l'importance de la description moléculaire des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. Elles doivent être suspectées en contexte de retour de voyage, et/ou d'échec de traitement. La réalisation des cultures à la recherche de gonocoque est nécessaire en cas de symptômes pour réaliser l'antibiogramme et guider l'antibiothérapie. Pour les perdus de vue, il est probable que les souches décrites au niveau génital ont été éradiquées par un traitement par céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération. La surveillance constante et l'envoi des souches résistantes au CNR des IST bactériennes pour expertise est primordiale pour le suivi de la diffusion des souches sur le territoire.

### 3.3.4.3 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* en France métropolitaine (enquête ENGON 2018)

En 2018, le Réseau Renago qui assurait la surveillance de la résistance aux antibiotiques chez le gonocoque s'est arrêté en fin d'année. Une surveillance reposant sur des enquêtes appelées ENGON qui relie à la fois les informations cliniques aux collections de souches recueillies a débuté en 2018.

Les données de résistance en 2018 reposent sur l'association de ces deux collections soit :

- Un total de 205 informations cliniques et 160 souches provenant de 30 centres recueilli dans le cadre de l'enquête ENGON 2018 entre le 1 septembre 2018 et le 31 décembre 2018.
- Un total de 317 souches isolées entre le 3 janvier 2018 et le 28 décembre 2018 (Renago).

La détermination des CMI de 6 antibiotiques (céfixime, ceftriaxone, gentamicine, tétracycline, ciprofloxacine, azithromycine) a été effectuée par la technique de E-test (Biomérieux/i2A, France). Les résultats ont été compilés dans le Tableau ci-dessous.

**Tableau. Interprétation S/I/R des CMI des antibiotiques testés pour 477 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2018 et l'enquête ENGON 2018.**

Antibiotiques	Sensible	Intermédiaire	Résistant
<b>Céfixime</b>	476/477 (99,8%)	0	1/477 (0,2%)
<b>Ceftriaxone</b>	477/477 (100%)	0	0
<b>Tétracycline</b>	103/477 (21,6%)	125/477 (26,2%)	249/477 (52,2%)*
<b>Ciprofloxacine</b>	227/477 (47,6%)	2/477 (0,4%)	248 (52%)
<b>Azithromycine</b>			45 (9,4%)
<b>Spectinomycine</b>	160/160 (100%)**		

\* La résistance de haut niveau aux tétracyclines est de 51,8% (129/249 souches résistantes).

\*\* Les CMI de la spectinomycine ont été réalisées dans l'enquête ENGON uniquement.

La production de bêta-lactamase a été observée pour 67/444 souches (15,1%).

Dans les deux réseaux observés, toutes les souches sont sensibles à la ceftriaxone et une seule souche est résistante au céfixime (0,2%). La répartition des CMI du céfixime et de la ceftriaxone est objectivée dans la Figure ci-dessous et une seule souche (0,2%) présente une CMI de la ceftriaxone supérieure à l'Ecoff (0,032 mg/L). Ces données confirment la tendance de diminution des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération avec, en parallèle, la diminution de souches dont la CMI est supérieure à l'Ecoff, signifiant la circulation de moins d'isolats avec des PLP remaniées.

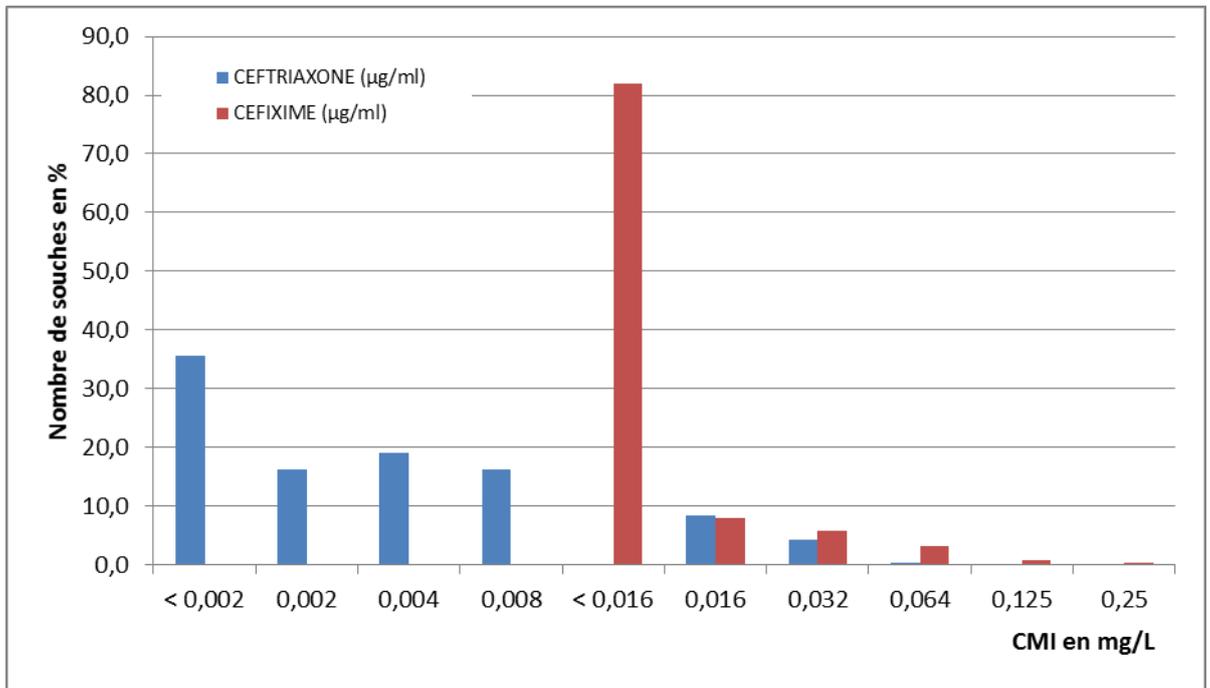


Figure. Répartition des CMI du céfixime et de la ceftriaxone des 477 souches de gonocoques isolées dans l'enquête ENGON 2018 et le réseau Renago en 2018.

Pour les autres molécules, la répartition des CMI est visualisée dans la Figure ci-dessous. On observe une augmentation des résistances aux fluoroquinolones (52% vs 37,7% en 2017) et à l'azithromycine (9,4% vs 5,5% en 2017). La résistance à la tétracycline diminue à 52,2 % en 2018 vs 65% en 2017, mais avec une augmentation des souches de haut niveau de résistance (51,8%). La répartition des CMI de la gentamicine est comprise entre 1 et 16 mg/L.

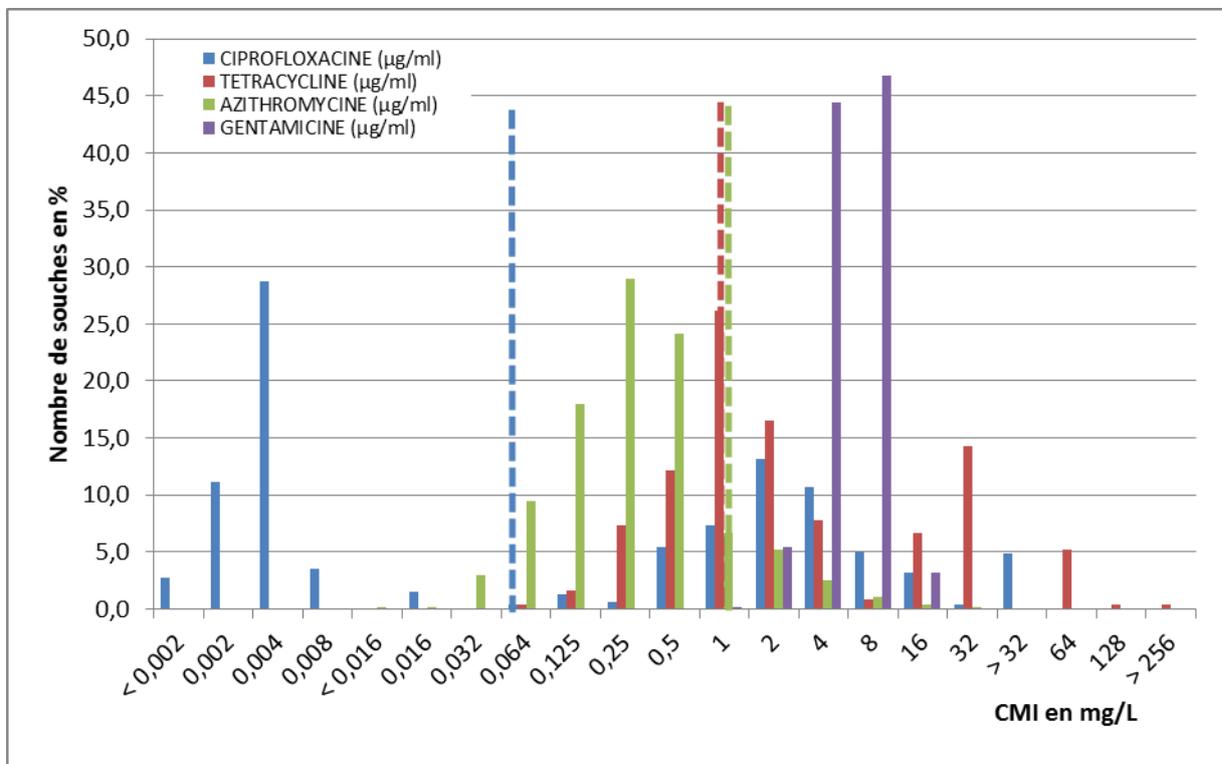


Figure. Répartition des CMI de l'azithromycine, gentamicine, ciprofloxacin et tétracycline des 477 gonocoques isolés dans l'enquête ENGON 2018 et le réseau Renago en 2018. Les barres pointillées représentent les concentrations critiques.

En 2019, le CNR a réalisé le séquençage complet de 158 souches isolées. Ces souches ont été explorées pour leur clonalité par l'extraction du MLST et du NG-MAST *in silico*. Les isolats étaient séparés en 42 types MLST avec peu de clustérisations, les ST1583 (n=20; 12,7%) et ST9263 (n=17; 10,8%) étant les plus fréquents.

Les souches présentaient une diversité importantes avec 34 numéros NG-MAST référencés, 37 non déterminés et 49 nouveaux ST. Le ST12302 était le plus fréquent (n=10 ; 6,4%) suivi du ST12547 (n=8 ; 5,1%) et du ST5441 (n=6 ; 3,8%). Le ST1407 n'était pas retrouvé et une quantité importante de ST restait non répertoriée (nouveau ST ou non déterminé) dans les bases de données (n=86 ; 54,4%).

Les 158 génomes séquencés ont permis de dresser l'arbre phylogénétique ci-dessous.

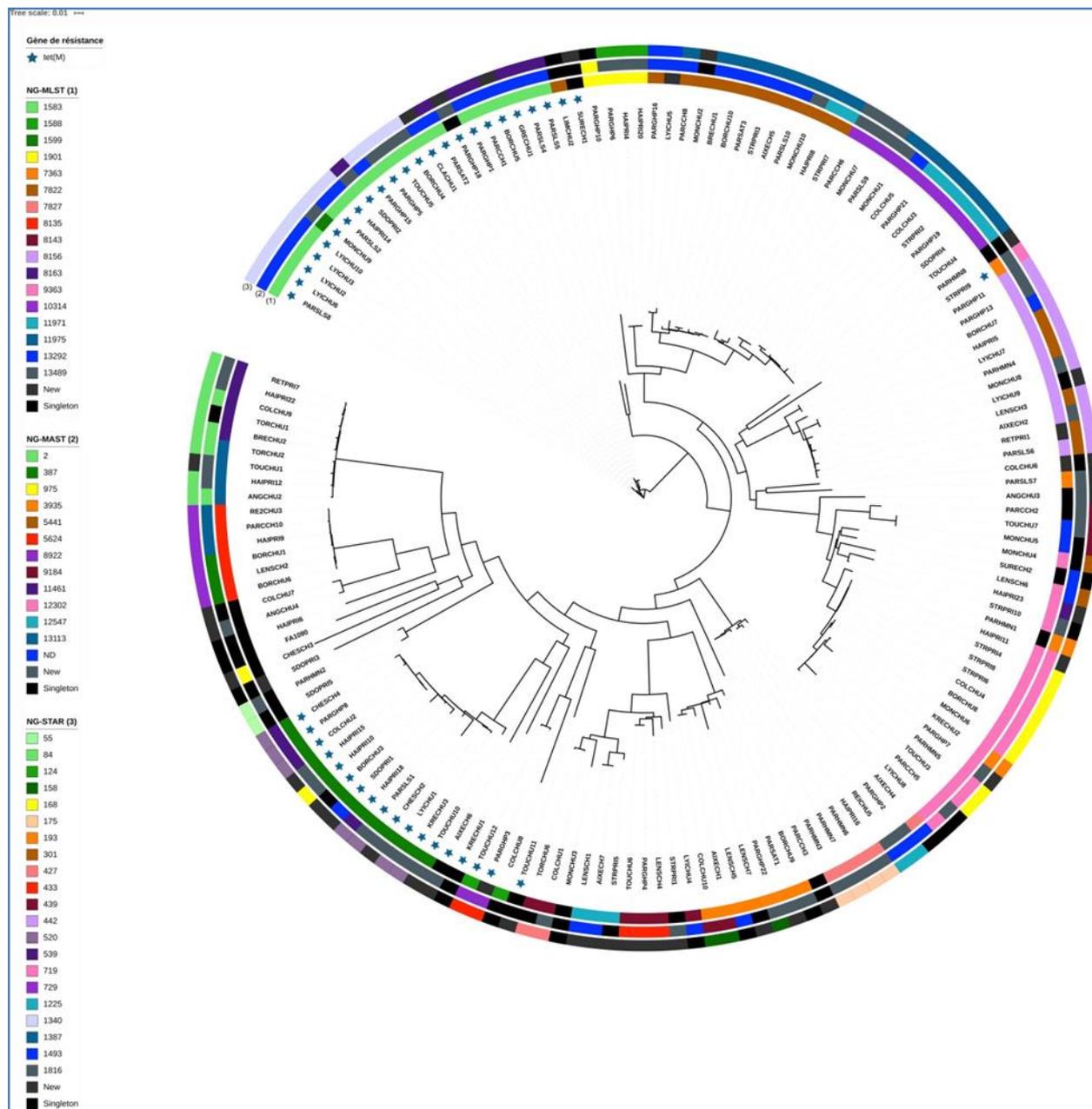


Figure. Arbre phylogénétique représentant les 158 génomes de gonocoques séquencés lors de l'enquête ENGON 2018.

### 3.3.4.4 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* en France métropolitaine (enquête ENGON 2019)

La surveillance de la résistance aux antibiotiques du gonocoque a été effectuée sur les souches de gonocoque recueillies dans le cadre de l'enquête ENGON 2019 résultant du recueil de l'intégralité des souches en France métropolitaine et dans les DOM entre le 1 septembre 2019 et le 31 décembre 2019. Les souches sont arrivées au laboratoire au premier trimestre 2020. A ce jour, le laboratoire de l'Hôpital Saint Louis a reçu les prélèvements provenant de **35 centres, un total de 438 informations cliniques et 411 souches** congelées dont **376** ont pu être étudiées.

Parmi les 376 souches investiguées, la production de bêta-lactamase a été observée pour 67/376 souches (17,8%). La détermination des CMI de 6 antibiotiques (céfixime, ceftriaxone, gentamicine, tétracycline, ciprofloxacine, azithromycine) a été effectuée par la technique de E-test (Biomérieux/i2A, France). Les résultats ont été compilés dans le Tableau ci-dessous.

**Tableau. Interprétation S/I/R des CMI des antibiotiques testés pour 376 souches de gonocoques isolées lors de l'enquête ENGON 2019.**

Antibiotiques	Sensible	Intermédiaire	Résistant
<b>Céfixime</b>	373/376 (99,2%)	0	<b>3/376 (0,8%)</b>
<b>Ceftriaxone</b>	376/377 (97,8%)**	0	1/377 (0,2%)
<b>Tétracycline</b>	41/376 (10,9%)	90 (23,9%)	245/376 (65,2%)*
<b>Ciprofloxacine</b>	148/376 (39,4%)	2 (0,5%)	226/376 (60,1%)
<b>Azithromycine</b>			26/376 (6,9%)
<b>Spectinomycine</b>	376/376 (100%)		

\*La résistance de haut niveau aux tétracyclines est de 38,4% (94/245 souches résistantes)

\*\* Absence de souche résistante pendant cette enquête, mais une souche résistante à la ceftriaxone est décrite en France en 2019 et a été ajoutée pour le calcul de ces valeurs (cf. chapitre 3.3.4.2)

Parmi les souches isolées lors de l'enquête ENGON 2019, toutes sont sensibles à la ceftriaxone (la souche résistante décrite au chapitre 3.3.4.2 est hors enquête) et 3 sont résistantes au céfixime (0,8%). La répartition des CMI du céfixime et de la ceftriaxone est objectivée dans la Figure ci-dessous ; 5 souches (1,3%) présentent une CMI de la ceftriaxone supérieure à l'Ecoff (0,032 mg/L). Ces données indiquent une légère augmentation des souches résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération par rapport à l'année dernière (0,2% de résistance au céfixime en 2018) avec, en parallèle, une légère augmentation de souches dont la CMI est supérieure à l'Ecoff (0,2% en 2018), signifiant la circulation de plus d'isolats avec des PLP remaniées.

Nous avons testé **la céfoxitine** qui est proposée dans les recommandations pour le traitement des infections génitales hautes (CNGOF et SPILF 2018). Il est intéressant de noter que les CMI de la céfoxitine pour le gonocoque sont beaucoup plus élevées que celles du céfixime et de la ceftriaxone.

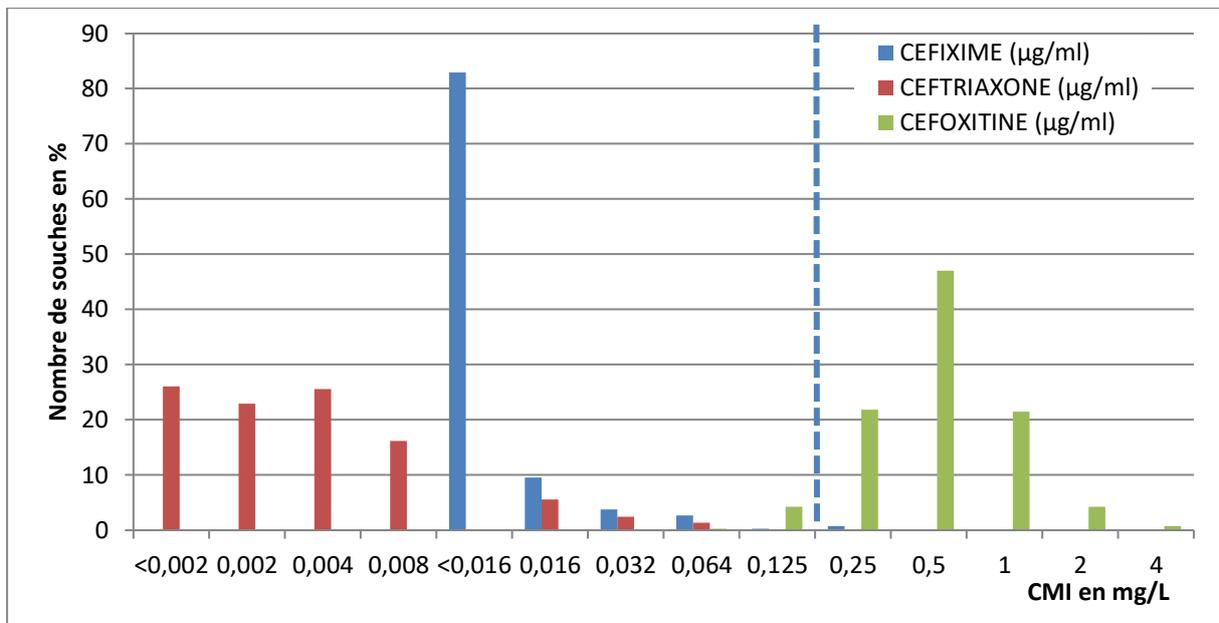


Figure. Répartition des CMI du céfixime, de la ceftriaxone et de la céfoxitine pour les 376 souches de gonocoques isolées dans l'enquête ENGON 2019.

Pour les autres molécules, la répartition des CMI est visualisée dans la Figure ci-dessous. On observe une augmentation des résistances aux fluoroquinolones (60,1% vs 52% en 2018) et à la tétracycline (65,2 % vs 52,2% en 2018), mais avec une diminution des souches à haut niveau de résistance (38,4% vs 51,8% en 2018). La résistance à l'azithromycine diminue à 6,9% vs 9,4% en 2018. La répartition des CMI de la gentamicine est comprise entre 2 et 16 mg/L et n'est pas interprétée en l'absence de concentrations critiques.

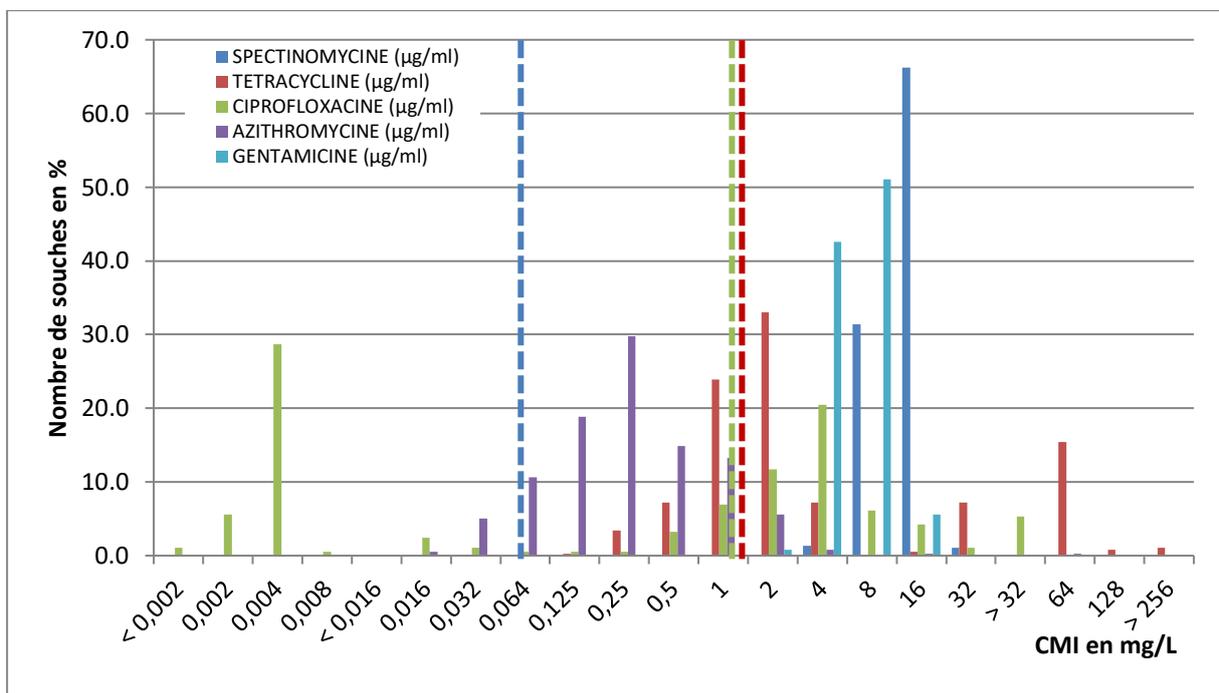


Figure. Répartition des CMI de l'azithromycine, gentamicine, ciprofloxacin et tétracycline des 376 gonocoques isolés dans l'enquête ENGON 2019. Les barres pointillées représentent les concentrations critiques.

Le séquençage NGS des génomes des 376 souches de l'enquête ENGON 2019 est en cours. Les données de séquençage des génomes de *N. gonorrhoeae* de l'enquête ENGON 2018 seront comparées à celles obtenues lors de l'enquête ENGON 2019 et soumises à publication.

### 3.3.4.5 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques dans les DROM La Réunion, Mayotte (cohorte 2016-2017)

Le CNR a participé à la caractérisation des souches de gonocoque circulantes entre 2016 et 2017 sur l'île de la Réunion et Mayotte. Quarante-huit souches cliniques (72 à la Réunion et 16 à Mayotte) ont été sélectionnées et l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques par E-tests réalisées dans le laboratoire des Dr Belmonte et Rocquebert à CHU Félix Guillon, Saint-Pierre, La Réunion. Des analyses phylogéniques et de typage moléculaire de séquences multi-antigènes de *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire associé gonocoque du CNR IST bactériennes (hôpital Saint-Louis).

Les souches cliniques de gonocoques ont été isolées chez 38 femmes (43,2%) et 50 hommes (56,8%). Les patients étaient âgés de 5 à 63 ans, l'âge médian étant de 25 ans pour les hommes et les femmes. Les souches de gonocoques ont tous été isolées chez des patients symptomatiques, principalement au niveau des sites génitaux : 30 (60%) écouvillons urétraux et 20 (40%) urines de 1<sup>er</sup> jet pour les hommes et 35 (92,2%) écouvillons vaginaux, 2 (5,2%) urines de 1<sup>er</sup> jet et 1 (2,6%) écouvillon conjonctival pour les femmes.

Dans cette étude, nous avons caractérisé les principaux génotypes des gonocoques circulants et leur résistance aux antibiotiques à la Réunion et à Mayotte.

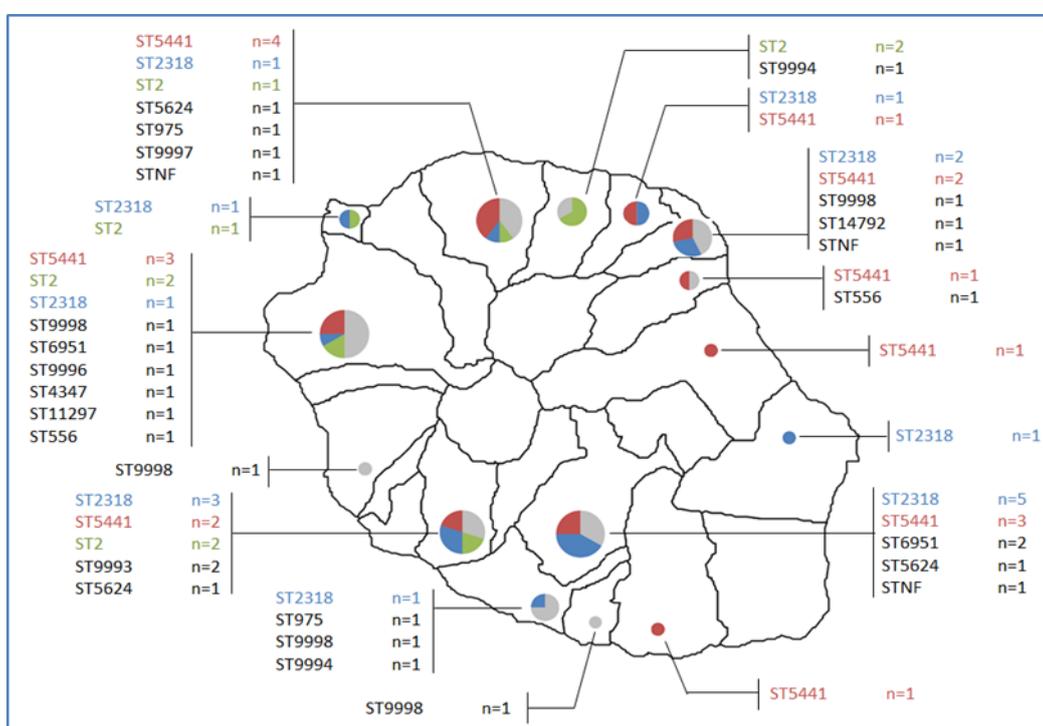


Figure. Répartition géographique et génotypique des 72 isolats cliniques de *N. gonorrhoeae* à la Réunion.

À la Réunion, une faible diversité a été observée et les génotypes appartenaient principalement au ST5441, ST2318 et ST2 (25,0%, 22,2% et 12,5%, respectivement). ST2 et ST5441 sont parmi les génotypes les plus nombreux en France métropolitaine en 2017, avec respectivement 6,4% et 3,6%. Ces résultats mettent en évidence l'impact des flux de population entre la France métropolitaine et l'île de la Réunion sur l'épidémiologie de la gonorrhée. Les souches de type ST2318 trouvées dans notre étude avaient des CMI plus élevées pour la ceftriaxone et étaient toutes résistantes à la ciprofloxacine et à la tétracycline. Ce complexe clonal est peu représenté en France mais prédomine en Chine, en particulier chez les souches ayant des CMI de la ceftriaxone élevées. De même, la forte représentation de ce complexe clonal à la Réunion est probablement liée à l'importante communauté chinoise de l'île. L'identification des types ST9993 et ST12496 comme les principaux génotypes de l'île de Mayotte, particulièrement résistants à la ciprofloxacine et à la tétracycline, nous encourage à renforcer la surveillance sur cette île. L'épidémiologie des souches de gonocoque circulant à Mayotte est particulièrement complexe, en raison de l'immigration massive d'Afrique de l'Est vers cette île où 50% de la population est étrangère.

**Ce travail a été publié dans Sex Transl Infect** : H. Jacquier, G. Miltgen, D. Hoarau, S. Kumanski, O. Rollot, S. Bruniquet, N. Ndeikoundam, G. Li Pat-Yuen, O. Belmonte, B. Bercot, B. Roquebert. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in Reunion and Mayotte. 2020. Sex Transm Infect. May 4, sextrans-2019-054374.

### 3.3.4.6 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques dans les DROM Guyane Française, Martinique, Polynésie française (cohorte 2017-2018)

Entre mai 2017 et mai 2018, une collaboration avec le laboratoire privé CERBA (Sabine Trombert) et des praticiens des DROM a permis de collecter des données sur **6876 demandes de PCR gonocoque**. Le calcul de la prévalence des infections à gonocoque dans les DROM a été évaluée à 6,4%.

Parmi ces prélèvements positifs, **67 échantillons positifs en PCR** étaient disponibles pour des études moléculaires avec 21 de Guyane Française (FRG), 17 de Martinique (MAT) et 29 de Polynésie Française. Après extraction, amplification, détection et séquençage, nous avons pu déterminer les mutations responsables des résistances à trois antibiotiques : la ciprofloxacine, la tétracycline et les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (cf. Tableau ci-dessous).

**Tableau. Analyse des résistances aux fluoroquinolones, céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et tétracyclines du gonocoque dans les DROM en 2017-2018.**

Zone géographique	Mutations et variants								
	<i>penA</i>		<i>gyrA</i>		<i>tet(M)</i>				
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%			
Polynésie française	2.001	5	17,2	WT	29	100	Présent	8	27,6
	<b>9.001</b> *	1	3,4				Absent	21	72,4
	14.001	10	34,5						
	Non déterminé	13	44,8						
<b>Total</b>	<b>29</b>		<b>29</b>		<b>29</b>				
Guyane française	2.001	1	4,8	WT	17	81,0	Présent	7	33,3
	14.001	5	23,8				Absent	22	66,6
	15.001	1	4,8						
	<b>19.001</b> *	1	4,8	S91F	4	19,0			
	22.001	1	4,8						
	Non déterminé	12	57,1						
<b>Total</b>	<b>21</b>		<b>21</b>		<b>21</b>				
Martinique	2.001	1	5,9	WT	7	41,2	Présent	3	17,6
	2.002	1	5,9				Absent	14	82,4
	<b>13.001</b> *	2	11,8						
	14.001	2	11,8				S91F	10	58,8
	22.001	1	5,9						
	<b>34.001</b> *	1	5,9						
	68.001	1	5,9						
	Non déterminé	8	47,1						
<b>Total</b>	<b>17</b>		<b>17</b>		<b>17</b>				
<b>Total général</b>	<b>67</b>		<b>67</b>		<b>67</b>				

La résistance aux fluoroquinolones variait de 0 à 58,8% [0 % en Polynésie Française, 19 % en Guyane Française et 58,8 % en Martinique]. Une résistance à la tétracycline à haut niveau médiée par la présence du gène *tet(M)* a été observée dans 17,6%, 33,3 % et 27,6% des cas en Martinique, en Guyane Française et en Polynésie Française, respectivement. D'après la séquence du gène *penA*, des souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sont suspectées par la présence des variants *penA9.001*, *penA13.001*, *penA19.001* et *penA34.001*. Le variant le plus représenté est *penA14.001*, suivie par *penA2.001* et *penA13.001*. Il est intéressant de noter qu'une souche portant l'allèle mosaïque *penA34.001* (codant une protéine liant les pénicillines de faible affinité aux  $\beta$ -lactamines) circule en Martinique ; cet allèle a été relié au clone NGMAST ST 1407 qui circulait en France en 2010-2012.

La clonalité des souches basées sur la technique de NG-MAST a été obtenue pour 25 échantillons. Les 3 clades ST5441, ST10385 et ST645 sont les plus représentés (cf. Figure ci-dessous). Ce travail a été présenté en **poster au congrès européen de l'IUSTI 2019 à Tallin et à la RICAI 2019 à Paris** (voir annexes).

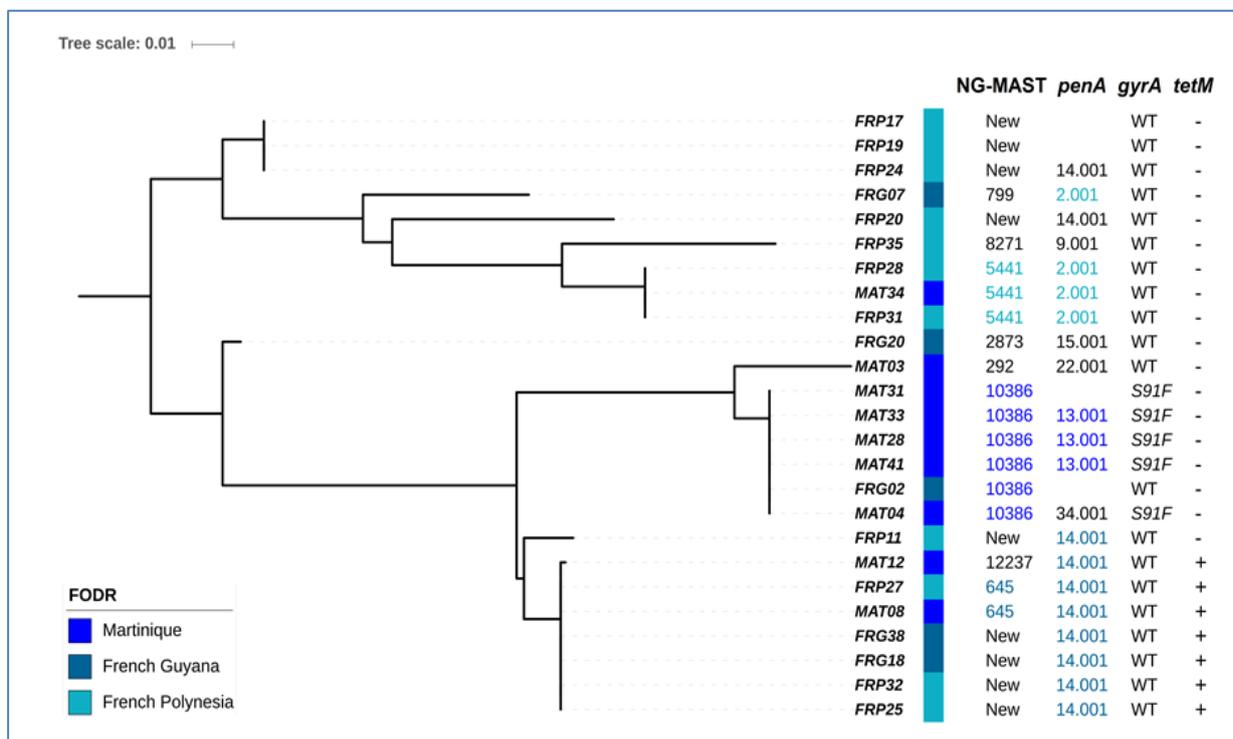


Figure. Arbre phylogénétique représentant les prélèvements positifs à gonocoque de la cohorte DROM2017-2018.

Nos résultats sont établis sur de petits effectifs et sur un petit nombre de prélèvements. Ils seront à consolider par l'analyse d'une seconde collection en cours d'investigation, dans le cadre de la même collaboration. Cette collection est composée de 140 prélèvements (44 de Guyane, 22 de Guadeloupe et 74 de Martinique) isolée sur la période de juillet 2017 à octobre 2018. Quarante-deux prélèvements proviennent d'hommes et 60 de femmes. Les prélèvements sont des 1<sup>er</sup> jets d'urine (n=78), 42 prélèvements génitaux (32 cervico-vaginaux et 10 urétraux) et enfin 20 prélèvements extragénitaux (13 gorges et 7 anus). L'âge des patients de cette étude s'étend de la naissance jusqu'à 54 ans. L'analyse de ces échantillons est en cours.

### 3.3.5 Surveillance de la résistance de *T. pallidum* aux macrolides et aux tétracyclines en 2019

#### Résistance aux macrolides

Les échantillons positifs à *T. pallidum* testés pour la recherche d'une résistance à l'azithromycine sont tous ceux qui ont été envoyés au laboratoire associé syphilis et qui ont été détectés par le test diagnostique de nPCR *tp47*.

*T. pallidum* ne se cultivant pas sur milieu synthétique, il est impossible de mesurer la résistance à l'azithromycine à l'aide des techniques de bactériologie classique. Les cas de résistance clinique au traitement de la syphilis par l'azithromycine sont associés à la présence d'une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNr 23S, détectée par une PCR-RFLP sur le gène de l'ARNr 23S. En 2005, des cas de résistances cliniques du tréponème à l'azithromycine ont été reportés aux USA (Lukehart *et al.* (2004) N Engl J Med 351:154). La prévalence des mutations responsables de la résistance à l'azithromycine varie de 10% à 90% des souches isolées en Europe et aux USA.

Le CNR a analysé 104 échantillons issus du protocole GENOSYPH provenant d'ulcérations cutané-muqueuses de patients suspectés de syphilis récente. Nous montrons que 88 (85%) échantillons possèdent la mutation A2058G sur le gène de l'ARN 23S correspondant à la résistance clinique de la syphilis à l'azithromycine.

## Résistance aux tétracyclines

Dans un contexte de l'utilisation accrue de la doxycycline pour le traitement de la syphilis (rupture de distribution de la BPG en 2017, augmentation de la PrEP et mise en place de la PeP), l'évaluation de la présence de marqueurs moléculaires potentiels responsables d'une résistance à la doxycycline a été mise en place en France par le CNR.

Le CNR a analysé **130 échantillons** issus du protocole **GENOSYPH** provenant d'ulcérations cutané-muqueuses de patients suspectés de syphilis récente. Nous montrons **qu'aucun (0%) des échantillons** ne possède les mutations 926-928, 939, 965-967 et 1058 localisées au niveau du gène de l'ARNr 16S (numérotation *E. coli*) correspondant aux marqueurs moléculaires de la résistance aux tétracyclines connus pour d'autres bactéries.

### 3.3.6 Sensibilité aux antibiotiques de *C. trachomatis*

La sensibilité de souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux en 2018 aux molécules les plus utilisées comme les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones est en cours d'étude. Il est très compliqué de récupérer des échantillons adaptés pour permettre la culture de *C. trachomatis* d'autres centres. Aussi, nous avons décidé de nous focaliser sur celles isolées au CHU de Bordeaux.

**Vingt-cinq souches cliniques de *C. trachomatis*** isolées en 2018 (24 femmes et 1 homme) ont été sélectionnées. Trois antibiotiques sont testés : **l'azithromycine, la doxycycline et l'ofloxacine**. La détermination de la CMI est réalisée par inoculation d'une souche de *C. trachomatis* titrée à  $10^5$ - $10^7$  UFI/ml sur des cellules de la lignée McCoy en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. La souche de référence L2/434/Bu (ATCC VR-902B) est utilisée comme contrôle positif. La lecture de la CMI est réalisée au microscope à fluorescence. Celle-ci est définie comme étant la concentration d'antibiotique correspondant à la dilution suivant celle pour laquelle 90% ou plus des inclusions sont altérées en taille et morphologie.

A ce jour, 15 souches cliniques de *C. trachomatis* (11 isolées de col et 4 isolées de prélèvements vaginaux) ont été mises en culture :

- 5 souches (1 génovar la ; et 4 génovar E) sont prêtes à être titrées et ont été produites en volume suffisant pour la réalisation des 3 CMI (environ 8 ml). Selon les souches, 7 à 13 passages ont été nécessaires pour obtenir ce volume.
- 6 souches (1 génovar D ; 1 génovar F, et 4 génovar E) sont en cours de culture (entre passage 2 et passage 8).
- 4 souches n'ont pas pu être relancées, ou présentaient un inoculum trop faible pour la réalisation des CMI.

En raison des restrictions hospitalières et de la fermeture de l'Université suite à la crise sanitaire Covid-19, nous n'avons pas pu continuer la remise en culture des autres souches et avons dû arrêter cette étude qui reprendra dès que possible.

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

En 2019, **Santé publique France** a reconduit **l'enquête Labo IST** pour les données 2018. Cette enquête a été améliorée par rapport à celle sur les données 2016 et le CNR a participé aux réunions avec les collègues du secteur privé pour améliorer le recueil des données. *M. genitalium* a notamment été inclus dans l'enquête. Les laboratoires du CHU de Bordeaux et de Saint-Louis ont été pilotes pour tester le processus de recueil des données.

**Santé publique France et le réseau Sentinelles de médecins généralistes** ont souhaité faire évoluer le volet IST de leur surveillance, qui ne réalisait jusqu'alors qu'une surveillance clinique des urétries masculines. Six réunions téléphoniques entre le réseau sentinelles (Thierry Blanchon et collègues, IPLESP, UMR-S 1136 Inserm, Sorbonne Université), Florence Lot, Ndeindo Ndeinkoundam, Delphine Viriot pour SpF et les 3 directeurs des laboratoires du CNR IST, ont permis de finaliser le protocole et le questionnaire afférent pour recueillir les données des cas d'IST collectés et des médecins généralistes participants. Les objectifs de cette étude observationnelle prospective permettant une surveillance de type sentinelle sont (1) décrire les patients vus en consultation de médecine générale en France métropolitaine pour une IST bactérienne (syphilis, gonococcie, chlamydie) ; (2) estimer les taux d'incidence annuel des cas diagnostiqués d'infections à chlamydia, de gonococcies et de syphilis vus en consultation de médecine générale en France métropolitaine. Cette surveillance devrait démarrer en janvier 2020.

B. de Barbeyrac. C. Cazanave et N. Dupin ont participé au recueil de données et aux travaux analysant l'évolution du

**dépistage des IST dans le secteur privé en France**, à partir des données individuelles de remboursement de soins de l'Assurance Maladie entre 2006 et 2018. Ce travail, piloté par Santé publique France a été publié dans le **Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire en 2019** (D. Viriot, N. Ndeikoundam Ngangro, E. Lucas, N. Dupin, B. de Barbeyrac, A. Bertolotti, C. Cazanave, S. Fouéré, C. Pioche, F. Lot. 2019. Dépistage des IST bactériennes dans le secteur privé en France, 2006-2018. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire N° 31-32.).

**Sur le plan européen**, le CNR IST bactériennes et Santé publique France collaborent avec Gianfranco Spiteri dans le cadre de la surveillance des IST bactériennes par **l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)**, Stockholm, Sweden. Le CNR participe aux enquêtes annuelles dans le cadre du groupe de travail européen **EURO-GASP** (voir 3.4.2). Une alerte à propos d'un défaut diagnostique de *C. trachomatis* sur le kit Aptima Combo 2 NG/CT (Hologic) a été publiée par l'ECDC ; cette alerte a été gérée par le CNR au niveau national en collaboration avec SpF (voir chapitre alerte).

### 3.4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Notre laboratoire collabore étroitement avec **plusieurs spécialistes de *C. trachomatis* européens** internationalement reconnus et avec lesquels nous avons publié :

- Bjorn Herrmann, Uppsala University, Sweden
- Servaas A. Morré, VU University Medical Centre Amsterdam and University of Maastrich, The Netherlands.
- Ian Clarke, University of Southampton, UK
- Helena Seth-Smith, University of Basel, Switzerland

Notre laboratoire collabore étroitement avec plusieurs spécialistes des **mycoplasmes urogénitaux** internationalement reconnus et avec lesquels nous avons publié :

- Roger Dumke, Dresden University of Technology, Germany
- Birgit Heinrich, Dusseldorf University, Germany
- Jorgen S. Jensen, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark
- Lisa E. Manhart, University of Washington, Seattle, USA
- Owen B. Spiller, Cardiff University, UK
- Patricia Totten, University of Washington, Seattle, USA
- Ken B. Waites, University of Alabama, Birmingham, USA.

Les liens étroits avec l'International Organization for Mycoplasma et l'European Study Group on Mycoplasma Infections (ESGMI) de l'ESCMID nous permettent d'initier ou de participer à des études épidémiologiques internationales et européennes sur les mycoplasmes urogénitaux. A noter qu'à l'initiative du CNR des IST (Cécile Bébéar) et des collègues européens, l'ESGMI a inclus la thématique Chlamydia et est devenu **l'ESGMAC** (European Study Group on Mycoplasma and Chlamydia) en 2019. C. Bébéar est secretary of ESGMAC.

Le laboratoire continuera à collaborer **sur le plan national** pour les infections à *C. trachomatis* et aux mycoplasmes urogénitaux avec :

- avec l'ensemble des laboratoires métropolitains parisiens et de province et des laboratoires d'outre-mer qui participent au réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis* et aux enquêtes annuelles sur la résistance aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux,
- avec les CeGIDD notamment ceux de Bordeaux, Paris et Marseille, et des services hospitaliers tels que le CAUVA (Centre d'Aide aUx Victimes d'Agresions, CHU de Bordeaux) et le centre de planification familiale et d'orthogénie du CHU de Bordeaux.

### 3.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Notre laboratoire collabore étroitement avec **plusieurs spécialistes de *N. gonorrhoeae* européens** internationalement reconnus et avec lesquels nous avons publié :

- Magnus Unemo, WHO Collaborating Centre for Gonorrhoea and other STIs, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine and Health, Örebro University, Örebro, Sweden
- Michele Cole, Public Health England, London,
- Gianfranco Spiteri, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.

Le laboratoire participe avec Santé publique France et l'équipe de Florence Lot aux enquêtes annuelles dans le cadre du groupe de travail européen **EURO-GASP** (27 pays participants). Les données épidémiologiques sont transmises à

**l'ECDC via TESSY** comme chaque année par Santé publique France. Depuis 2019, le CNR transfère également les données de typage NG-MAST (B. Berçot).

Le laboratoire continuera à collaborer **sur le plan national** pour les infections gonocoques avec :

- avec les laboratoires CERBA et Biomnis,
- avec l'ensemble des laboratoires métropolitains parisiens et de province et des laboratoires d'outre-mer qui participent aux enquêtes annuelles sur la résistance aux antibiotiques des gonocoques,
- avec les CeGIDD et partenaires hospitaliers.

### 3.4.3 Laboratoire APHP Cochin

Le CNR envoie ses données à Santé publique France sous la responsabilité de N. Ndeikoundam. La surveillance de la syphilis n'est possible que grâce à la participation des centres IST sur la région parisienne ainsi que des centres de province dont les responsables font partie de la section MST-SIDA ou Dermatologie-Infectiologie de la Société Française de Dermatologie.

## 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

### 3.5.1 Enquête de surveillance européenne TESSY et contrôles de qualité européens pour le gonocoque

#### 3.5.1.1 EU STI Microbiology Network: Sentinel Surveillance of Gonococcal Antimicrobial Susceptibility

L'ECDC coordonne le programme européen de surveillance de la résistance du gonocoque aux antimicrobiens (Euro-GASP) depuis 2009. Le projet a été externalisé à une équipe internationale qui est actuellement dirigée par Public Health England (Royaume-Uni) en collaboration avec l'hôpital universitaire d'Örebro (Suède).

En février 2019, 3248 souches consécutives de *N. gonorrhoeae* isolées en 2018 dans 27 pays différents participants au réseau de surveillance TESSY ont été envoyées et centralisées par Michèle Cole et son équipe en Angleterre pour exploration par séquençage haut débit des génomes. En 2019, le CNR a fourni 55 souches françaises associées aux données épidémiologiques de 110 cas cliniques transmises par Santé publique France à **l'ECDC via TESSY**. L'analyse des données est en cours pour publication.

En septembre 2019, B. Bercot a participé à l'Euro-GASP Coordination Meeting à Tallinn en Estonie, réunion coordonnée par G. Spiteri, M. Unemo et M. Cole. La réunion de coordination Euro-GASP visait à (i) présenter les principales réalisations depuis la dernière réunion de coordination, en se concentrant sur les activités de surveillance, la formation, les contrôles de qualité externe (EQA) et le typage moléculaire, (ii) présenter les résultats pertinents de l'évaluation de la surveillance des IST, (iii) discuter des changements potentiels des objectifs l'Euro-GASP, y compris concernant la surveillance et l'EQA, (iv) informer les participants sur les activités de typage moléculaire du gonocoque.

Lors de cette réunion annuelle, il a décidé de rapporter le nombre d'isolats inclus à la taille du pays et ainsi d'augmenter le nombre d'isolats inclus pour des pays de surfaces importantes comme la France, l'Allemagne, la Suède, la Norvège, la Belgique, le Danemark, la Hongrie, l'Irlande, l'Espagne et l'Angleterre à 200 isolats/pays. En parallèle, des éléments additionnels à collecter comme la localisation du patient, le pays de naissance et les IST associées seront recueillies pour les prochaines enquêtes. La surveillance s'effectuera sur 200 isolats de patients consécutifs d'origines géographiques différentes, appartenant à différents groupes (homme, femme, HSH ou non, etc.). Les antibiotiques surveillés pour lesquelles les CMI sont attendues sont : la ciprofloxacine, l'azithromycine, le céfixime, la ceftriaxone, la gentamicine et la spectinomycine ainsi que la recherche phénotypique de  $\beta$ -lactamase.

Pour les années suivantes, il a été proposé que les pays réalisant le NGS en routine (France, Espagne, Italie) pourront effectuer le séquençage de manière décentralisée et participeront aux enquêtes suivantes par l'envoi des fichiers fastq. Cette surveillance européenne pourrait s'étendre à celle de la syphilis, *M. genitalium* et *C. trachomatis*.

L'ECDC propose un plan de réponse (MDR/XDR *N. gonorrhoeae* response plan, G. Spiteri) dans la définition et les mesures à prendre face à des cas de gonocoques MDR ou XDR. Ces mesures sont décrites en annexe de ce rapport.

### 3.5.1.2 Contrôles de qualité européens

- *EU STI Microbiology Network: N.gonorrhoeae antimicrobial resistance quality assurance programme* : (4/an)

Dix souches WHO de *N. gonorrhoeae* ont été testées pour la détermination des CMI sur un panel de 6 antibiotiques (ciprofloxacine, ceftriaxone, céfixime, azithromycine, gentamicine, spectinomycine) et la recherche de bêta-lactamase. Les séquences ST ont été déterminées par la technique NG-MAST.

- *Contrôles de qualité de séquençage avec Euro-GASP*

Le CNR effectue en parallèle le séquençage des génomes des souches dans un but de contrôle qualité de son processus bioinformatique. Il a ainsi réalisé en 2019 le séquençage des 55 souches françaises envoyées à Euro-GASP/Tessy. Il est prévu pour les enquêtes suivantes en 2020 l'envoi des fichiers fastq. Ainsi, le CNR a rendu dans le fichier 2020, envoyé pour la surveillance, le typage NG-MAST obtenu par le séquençage complet des génomes.

## 4 Alerte

Des échanges ont eu lieu entre le CNR et Santé publique France pour objectiver une procédure de déclaration de cas inhabituels d'IST. Une fiche décrivant succinctement la démarche autour d'un signalement d'IST et un guide d'investigation et de gestion des clusters d'IST sont en cours de finalisation sous la coordination de N. Ndeinkoundam.

### 4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Suite à l'alerte de la circulation d'un **variant de *C. trachomatis* non détecté par le test Aptima Combo (AC2) d'Hologic** détectant en duplex *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* en Finlande en avril 2019 relayée par l'ECDC, un courrier de la société Hologic préconisant l'utilisation du test Aptima ACT détectant seulement *C. trachomatis* pour contrôler certains échantillons a été envoyé à tous les clients en France. En effet, ce variant a montré une mutation dans le gène ARN 23S ciblé par le test AC2, alors que le test ACT cible une région de l'ARNr 16S. La mise en évidence de discordance entre les deux tests AC2/ACT pourrait être due à la présence de ce mutant. Une autre explication pourrait être la meilleure sensibilité du test simplex ACT par rapport au test duplex AC2 CT/NG. La seule façon d'identifier la présence de ce mutant pour les échantillons discordants AC2-négatif, ACT-positif est de séquencer la partie ciblée de l'ARNr 23S.

Pour évaluer la prévalence de ce variant sur le territoire français, le CNR des IST bactériennes en accord avec Santé publique France et Hologic, a proposé à tous les clients d'Hologic de lui envoyer leurs échantillons discordants AC2/ACT. L'ECDC a proposé en septembre 2019 de centraliser tous les échantillons discordants en Europe et de les analyser par séquençage. En janvier 2020, le CNR a envoyé 190 échantillons discordants provenant de 18 laboratoires répartis sur le territoire français. Les analyses sont en cours. Le laboratoire Hologic devrait mettre sur le marché courant 2020, un nouveau test Aptima Combo AC2 capable de détecter les mutants ARNr 23S que le CNR évaluera.

### 4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Une procédure d'alerte de souche de gonocoque résistante à la ceftriaxone et d'alerte d'échec de traitement a été validée en septembre 2019 par le groupe européen **EURO-GASP**. Cette procédure est disponible en annexe de ce rapport. Elle est en cours de mise en place sur le site internet du CNR.

Le CNR a réalisé cette année **3 alertes pour les infections à gonocoques**.

1. Description des 2 cas de kératoconjonctivites à Bordeaux (cf. chapitre 3.2.2.2)
2. Description d'une souche importée d'Asie (Cambodge) hautement résistante à la ceftriaxone chez un patient habitant dans la région de Limoges (cf. chapitre 3.3.4.2)
3. Choc septique avec décès chez une jeune femme de 34 ans hospitalisée au CH de Melun (3.2.2.2).

L'analyse des souches virulentes par NGS a permis de mettre en évidence l'émergence de souches phylogénétiquement proches. L'analyse fine du génome de ces souches virulentes est en cours d'investigations complémentaires. Dans une première approche, nous rechercherons la présence de gènes de virulence ou de leur acquisition. Puis les génomes seront comparés à ceux de la collection ENGON dont les situations cliniques ont été clairement identifiées.

## 4.3 Laboratoire APHP Cochin

### 4.3.1 La procédure

Tout signalement de cas anormaux est transmis directement par Nicolas Dupin à N. Ndeikoundam de Santé publique France, soit par messagerie électronique soit par téléphone.

Toutes les demandes d'analyse sur des échantillons extérieurs (écouvillons, prélèvements sanguins, LCR, biopsies), positives par nPCR sont transmises à Santé publique France sur une base périodique de 3 mois et le CNR envoie une fiche de demande de renseignements complémentaires au centre qui a envoyé le prélèvement. En ce qui concerne les échantillons périnataux analysés positifs en nPCR et/ou sérologie (liquide amniotique, placenta, cordon), Santé publique France est immédiatement informé par courrier électronique et/ou téléphone par le CNR. C'est Santé publique France qui se charge de contacter le centre demandeur pour classer le cas.

### 4.3.2 Pour l'année 2019

#### - Alertes de suspicion de syphilis congénitale

Trois alertes de suspicion de syphilis congénitale ont été déclenchées par le CNR IST bactériennes à Santé publique France.

Numéro CNR	Centre	Age	Sexe	PRELEVEMENTS	Date du prélèvement	Date de réception	Rendu résultat	
							Amplification génique	
							nPCR	Date
03193	Avignon	19	F	Placenta	28/02/19	04/03/19	pos	08/03/19
031932	Poitiers	3 j	F	sang total / écouvillon buccal / écouvillon nasal	12/03/19	13/03/19	neg/neg/pos	15/03/19
07193	Pointe à Pitre	4 j	M	Aspiration naso-pharyngée	27/06/19	02/07/19	pos	05/07/19

#### - Alertes de suspicion de neurosyphilis

Trente-neuf alertes de suspicion de neurosyphilis ont été déclenchées par le CNR IST bactériennes.

Numéro CNR	Centre	Age	Sexe	PRELEVEMENTS	Date du prélèvement	Date de réception	Rendu résultat				
							Amplification génique		Examen sérologique sur LCR		
							nPCR	Date	VDRL	POS	Date
011955	Créteil	71	M	LCR	16/01/19	23/01/19	neg	25/01/19	1	1	29/01/19
011956	La Reunion	25	M	LCR	16/01/19	23/01/19	pos	25/01/19	1	0	29/01/19
02198	St Louis	32	M	LCR	01/02/19	04/02/19	pos	08/02/19	1	0	07/02/19
021924	Dunkerque	54	M	LCR	07/02/19	11/02/19	neg	15/02/19	1	1	14/02/19
021929	Dax	60	M	LCR	07/02/19	11/02/19	pos	15/02/19	1	0	14/02/19
021948	Cochin/Med int	54	F	LCR	08/02/19	09/02/19	neg	22/02/19	1	1	14/02/19
021992	Lille	26	M	LCR	13/02/19	22/02/19	neg	28/02/19	1	1	14/03/19
0219104	Lens	27	M	LCR	22/02/19	26/02/19	pos	28/02/19	1	1	14/03/19
03192	Troyes	67	F	LCR / Sérum pour expertise sérologique	01/03/19	04/03/19	qtité insuffisante	/	1	1	11/03/19
031922	Libourne	48	M	LCR	04/03/19	08/03/19	neg	15/03/19	1	1	11/03/19
031929	Lariboisière	48	M	LCR	11/03/19	13/03/19	neg	15/03/19	1	1	14/03/19
031931	Le Mans	60	M	LCR	07/03/19	13/03/19	neg	15/03/19	1	1	21/03/19
031941	Poitiers	46	M	LCR	08/03/19	15/03/19	neg	22/03/19	1	1	19/03/19
031943	Troyes	67	M	LCR	13/03/19	15/03/19	neg	22/03/19	1	1	19/03/19
031965	Papeete	40	M	LCR	09/03/19	21/03/19	pos	04/04/19	1	0	26/03/19
031980	Bethune	34	M	LCR	23/03/19	26/03/19	neg	29/03/19	1	1	28/03/19
031983	Perpignan	66	M	LCR	25/03/19	26/03/19	neg	29/03/19	1	1	28/03/19
031984	Cochin/Urgence	41	M	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	26/03/19	26/03/19	/	/	1	1	26/03/19
04194	Le Mans	61	M	LCR	29/03/19	02/04/19	neg	05/04/19	1	1	04/04/19
041970	Blois	51	M	LCR	11/04/19	17/04/19	pos	19/04/19	1	0	18/04/19
041994	Avignon	59	M	LCR	25/04/19	26/04/19	neg	03/05/19	1	1	02/05/19
0419105	St Antoine	54	M	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	25/04/19	26/04/19	/	/	1	1	02/05/19
051912	St Louis	28	M	LCR	27/04/19	30/04/19	neg	10/05/19	1	1	13/05/19
051920	Blois	49	M	LCR	07/05/19	13/05/19	pos	17/05/19	1	1	16/05/19
051934	Avignon	56	M	LCR	15/02/19	13/05/19	neg	24/05/19	1	1	23/05/19
051947	Strasbourg	81	F	LCR	20/05/19	28/05/19	neg	31/05/19	1	1	04/06/19
061913	Libourne	84	M	LCR	28/05/19	29/05/19	neg	14/06/19	1	1	13/06/19
061914	Troyes	74	M	LCR / Sérum	04/06/19	07/06/19	neg	14/06/19	1	1	13/06/19
061921	Libourne	49	M	LCR	07/06/19	12/06/19	neg	21/06/19	1	1	20/06/19
08194	Blois	49	M	LCR	01/08/19	05/08/19	neg	09/08/19	1	1	13/08/19
091928	Haguenau	65	M	LCR	04/09/19	13/09/19	neg	20/09/19	1	1	19/09/19
091932	Haguenau	65	M	LCR	12/09/19	18/09/19	neg	20/09/19	1	1	19/09/19
091956	Avignon	56	M	LCR	23/09/19	26/09/19	neg	03/10/19	1	1	30/09/19
101976	Grenoble	70	M	LCR	28/10/19	29/10/19	dout	31/10/19	1	1	05/11/19
11195	Pointe à Pitre	46	M	LCR	24/10/19	06/11/19	neg	08/11/19	1	1	07/11/19
111939	Troyes	67	M	LCR	15/11/19	19/11/19	neg	21/11/19	1	1	25/11/19
111954	Strasbourg	42	M	LCR	19/11/19	26/11/19	neg	29/11/19	1	1	28/11/19
111961	Strasbourg	62	M	LCR	21/11/19	26/11/19	POS faible	29/11/19	1	1	28/11/19
121910	Libourne	49	M	LCR	03/12/19	09/12/19	neg	13/12/19	1	1	12/12/19

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

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le site de web du CNR des IST bactériennes est en ligne depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2019 ([www.cnr-ist.fr](http://www.cnr-ist.fr)). Nos correspondants y trouvent tous les documents à envoyer pour expertise d'un échantillon ou d'une souche. Ils ont également accès aux rapports du CNR (2017, 2018 et 2019 à venir), aux recommandations de traitement des IST, à des documents et publications de référence et aux actualités concernant le CNR.

#### 5.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

- Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ; Conférences visant les professionnels de santé :

- S. Pereyre. Mycoplasmes : vérités et erreurs. Journée Annuelle du Collège de Gynécologie de Bordeaux, Bordeaux. Février 2019.

- C. Cazanave. 2019. Interview sur la résistance de *M. genitalium* aux antibiotiques chez les Prepeurs lors la CROI, février 2019, pour le site VIH.org.

- S. Pereyre. *Mycoplasma genitalium* : un agent d'IST émergent. Congrès du syndicat des jeunes biologistes : Journées BIOMED-J, Paris. Formation agréée ANDPC n° 12161900002, organisme Bioqualité 1216. Mars 2019.

- B de Barbeyrac. Le microbiote et les infections génitales basses à reconnaître, identifier et traiter. EPUNG, Enseignement Post universitaire National de Gynécologie. 15 mars 2019, Paris. Communication orale.

- S. Pereyre, C. Bébéar. Epidémiologie des IST bactériennes. LABEXA formation, Anglet. Formation agréée ANDPC n°8245190005. Juin 2019.

- S. Pereyre. Diagnostic et indications de dépistage des IST bactériennes. LABEXA formation, Anglet. Formation agréée ANDPC n°8245190005. Juin 2019.

- C. Bébéar. 2019. Interview sur les vaccins contre les IST lors du STI and HIV world congress, Vancouver, juillet 2019, pour le site VIH.org.

- S. Pereyre. 2019. Interview sur la résistance de *M. genitalium* aux antibiotiques lors du STI and HIV world congress, Vancouver, juillet 2019, pour le site VIH.org.

- C. Cazanave. 2019. IST et PrEP : enjeux en 2019. 7<sup>ème</sup> Journée Régionale d'Infectiologie d'Aquitaine. 13 décembre, Pessac.

- C. Bébéar. 2019. Augmentation des IST bactériennes, Web newsletter de la Société Française de Microbiologie, Décembre 2019.

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

- S. Pereyre, C. Bébéar. Mycoplasmes urogénitaux : Quand les rechercher? Comment les traiter ? La lettre de l'infectiologue, sous presse.

- K.B. Waites, C. Bébéar. 2019. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In Manual of Clinical Microbiology, 12<sup>th</sup> edition, ASM Press, Washington DC.

- C. Bébéar, J. S. Dumler. 2019. Algorithms for identification of *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and obligate intracellular bacteria. In Manual of Clinical Microbiology, 12<sup>th</sup> edition, ASM Press, Washington DC.

S. Pereyre, C. Bébéar. 2019. Infections à *Mycoplasma hominis*. In :Encycl.Méd. Chir. Maladies Infectieuses, 37, 1, p1-9, article 8-039-V10. Elsevier SAS, Paris.

- *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :*  
- *Rétro-information aux partenaires ;*

Un poster résumant **l'activité du réseau LGV** est envoyé chaque année aux partenaires cliniciens et laboratoires participant au réseau. Le poster de l'année **2018** est joint en annexe et est disponible sur le site web du CNR. Celui de l'année 2019 est en préparation et devrait être envoyé au dernier trimestre 2020.

Un poster résumant la **surveillance des génovars de *C. trachomatis* des infections urogénitales et la résistance de *M. genitalium* aux antibiotiques** en outre-mer en 2018 et un poster résumant **la prévalence de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones et la sensibilité aux antibiotiques de *M. hominis* et *Ureaplasma spp.* en France métropolitaine en 2018** ont été envoyés à tous les laboratoires participants et est disponible sur le site web du CNR. Ils sont joints en annexe.

- *Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le site internet (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;*

Voir ci-dessus.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé :*

- Une adresse email générique [cnr.ist@chu-bordeaux.fr](mailto:cnr.ist@chu-bordeaux.fr) dont les destinataires sont les membres du CNR permet de réceptionner les questions relatives à *C. trachomatis* et aux mycoplasmes urogénitaux. Les appels téléphoniques concernant *C. trachomatis* et les mycoplasmes urogénitaux sont centralisés par la secrétaire au 0557571625 et transmis aux responsables de chaque domaine.

- Nous répondons, par email ou téléphone, à environ 2 ou 3 demandes par semaine concernant les activités d'expertise

sur les mycoplasmes urogénitaux (conseils techniques pour la détection et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, conseils thérapeutiques) avec dans la moitié des cas confirmation de l'identification, recherche de résistance aux antibiotiques ou envoi d'extrait d'ADN de souches de référence à différents laboratoires.

- En ce qui concerne les infections à *C. trachomatis*, nous répondons à en moyenne un email ou un appel téléphonique par semaine pour des conseils techniques ou thérapeutiques.

### 5.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

- *Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ; Conférences visant les professionnels de santé*

- B. Berçot. 2019. Epidémiologie et résistance des IST en 2018. Staff d'Immuno-infectiologie, Pr Salmon, APHP Hôtel Dieu, 25 mai, Paris.

- B. Berçot. 2019. Quel risque de contagiosité pendant et au décours de traitement d'une IST? Journées d'échanges entre les CeGGID (JEEC2). COREVIH Ile de France Sud, 22 novembre (table ronde).

- *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :*  
- *Rétro-information aux partenaires ;*

Un poster résumant la **surveillance des souches de gonocoque et de leur résistance aux antibiotiques** en outre-mer en 2016-2017 et un poster résumant l'analyse de la résistance aux fluoroquinolones du gonocoque en France directement à partir du prélèvement est disponible en annexe et sur le site web du CNR. L'analyse des 2 enquêtes ENGON 2018-2019 est en cours pour une rétroinformation en 2020.

- *Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le site internet (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;*

Voir ci-dessus.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé :*

Une adresse email générique [cnr.ist.sls@aphp.fr](mailto:cnr.ist.sls@aphp.fr) dont les destinataires sont les membres du CNR permet de réceptionner les questions relatives à *N. gonorrhoeae*. Les appels téléphoniques sont centralisés par la secrétaire au 0142499348 et retransmis à l'équipe ou joignable directement au 0142494240.

Le site de St Louis répond, par email ou téléphone, à environ 2 ou 3 demandes par semaine concernant les activités d'expertise

- Conseils techniques pour la détection et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des gonocoques,
- Confirmation de l'identification,
- Recherche de résistance aux antibiotiques,
- Conseils thérapeutiques.
- Typage moléculaire sur souches et prélèvements et analyse de cas groupés au sein du cercle familial.

### 5.1.3 Laboratoire APHP Cochin

- *Liste des enseignements, des formations aux professionnels de santé ;*  
- *Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;*

**Nicolas Dupin, participation à de nombreux FMC et congrès :**

- Congrès EADV 2019, Madrid : *diagnosin and manging syphilis in 2019*
- 53<sup>ème</sup> Journées de Biologie Praticienne, Paris : *La syphilis et autres IST*
- Séminaire des IST pour les DES de Dermatologie, Musée des Moulages, Hôpital Saint-Louis, Octobre 2019 : *La syphilis (co-organisateur du séminaire pour le CEDEF)*
- DIU de Dermatologie Infectieuse et Tropicale Paris XII et Paris VI, *La syphilis*
- 13<sup>èmes</sup> Journées Nationales Provinciales de Dermatologie, Le Havre
- Flash actualité 4 : *les IST*

- Atelier IST, Leçon de simulation au féminin
- EADV Course, STDs part I and II, Maison de la dermatologie
- DIU Infectiologie : MST chez l'homme et cas clinique
- Séminaire des DES Paris et IDF 2019 : La syphilis
- Journées dermatologiques de Paris, Décembre 2019 :
- Plénière Actualité, Vendredi 6 Décembre 2019 : VIH et autres IST sur le grill
- Best of QSD, Mercredi 4 Décembre 2019 : La bouche un organe sexuel comme les autres
- Communication orale, CO125, Vendredi 6 Décembre 2019, exploration de lésions cutanéomuqueuses en PCR multiplex dans le cadre de la suspicion d'une syphilis
- Hot topics, Jeudi 5 Décembre 2019 : comment interpréter une sérologie syphilitique

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

- *Information/formation des professionnels de santé : mentionner notamment le site internet (adresse, date de création, rythme des actualisations, date du dernier rapport annuel d'activité mis en ligne) ;*

Voir ci-dessus.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé : préciser l'organisation du CNR pour réceptionner les appels ou e-mails, le volume d'activités (si ces données sont disponibles), ...*

Parallèlement aux échantillons qui nous sont confiés pour expertise sérologique et moléculaire, nous avons également une très forte activité d'assistance dans la prise en charge des patients. En 2019, cette activité a consisté en moyenne à 4-5 appels par semaine.

Sur l'année, le CNR a répondu à plus de 200 appels. Les appels sont assez homogènes sur la période. Le CNR propose également une assistance par courrier électronique, plus de 150 demandes par mail ont été reçues pour 2019. Une adresse email générique [cnr.ist.cch@aphp.fr](mailto:cnr.ist.cch@aphp.fr) à cet effet.

La durée d'un appel est d'une dizaine de minutes avec des demandes portant sur :

- L'interprétation sérologique des résultats pour le diagnostic final de syphilis
- Les tests sérologiques à réaliser dans le cas de suspicion de neurosyphilis et de syphilis congénitale. A cette occasion le laboratoire associé syphilis propose d'expertiser à nouveau le ou les sérums et de réaliser le test VDRL charbon sur le LCR
- Les modes de contamination
- Les signes cliniques évocateurs
- Demande de renseignement pour l'envoi de prélèvements
- Aide à la mise en place du traitement, notamment dans les cas de neurosyphilis et de syphilis congénitale

## 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

### 5.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

B. de Barbeyrac a participé au groupe de travail de l'International Union of Sexually Transmitted infections (IUSTI) révisant les recommandations de prise en charge de la lymphogranulomatose vénérienne, coordonné par Henri de Vries. Ces recommandations ont été publiées en mai 2019 (**H.C.J. de Vries, B. de Barbeyrac et al. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2019**) et sont accessibles via le site de l'IUSTI et du CNR.

B. de Barbeyrac participe au **groupe de travail de microbiologie** dépendant de la CNAM en relation avec la CHAB (Commission de Hiérarchisation des Actes de Biologie médicale) pour la mise à jour du diagnostic des infections génitales et des IST. Les finalités du groupe de travail sont de planifier l'inscription de nouveaux tests biologiques à la NABM en définissant des indications validées par la HAS et en proposant des taux de remboursements et le déremboursement des actes obsolètes.

### 5.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

B. Berçot a expertisé les dossiers de demande de renouvellement de Centres Nationaux de Référence pour la microbiologie humaine sur l'expertise des IST bactériennes en Belgique.

B. Berçot est la représentante française du réseau de surveillance européen EURO-GASP pour le gonocoque en contact avec l'ECDC.

### 5.2.3 Laboratoire APHP Cochin

N. Dupin et N. Benhaddou sont experts auprès de l'ANSM et la HAS en matière de syphilis.

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

### 5.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

#### C. Bébéar

- Interview TV and reportage TV dans le laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux, Journal télévisé, France 3, 3 février 2020. Sujet : augmentation des IST bactériennes.
- Journal Le Figaro, pages Santé, IST, ce qu'il faut savoir pour s'en prémunir, octobre 2019.
- Website topic : Les Infections sexuellement transmissibles bactériennes, Porphyre, avril 2019, 551, [www.porphyre.fr](http://www.porphyre.fr)

#### B. de Barbeyrac

- Journal Le Quotidien du Médecin, article sur l'augmentation des infections à Chlamydia, 2019.

#### C. Cazanave

- Interview TV and reportage TV dans le laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux, Journal télévisé, France 3, 3 février 2020. Sujet : augmentation des IST bactériennes.

## **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**

#### **6.1.1 Projet de recherche clinique Remind/ Memodépistages, 2018-2021, Santé Publique France**

Le projet **Remind/ Memodépistages** vise à promouvoir le dépistage répété du VIH chez les HSH en France. Il vise à proposer une solution personnalisée reposant sur les préférences des individus, évolutive dans le temps et combinant les différents types de tests et de dispositifs (autotest, consultation en CEGIDD, en médecine générale, dépistage communautaire) et sur une offre expérimentale (envoi à domicile d'un kit pour des auto-prélèvements sanguin, urinaire, oropharyngé et anal). Cette étude s'adresse aux HSH régions IDF, ARA et PACA et a débuté en avril 2018 avec un recrutement en ligne via un site internet dédié. Une fois inclus dans l'étude, les sujets reçoivent à domicile un kit d'auto-prélèvement pour le dépistage du VIH, du VHB, du VHC, de la syphilis, de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Ils seront suivis pendant 18 mois tous les 3 mois. A M12, un kit d'auto-prélèvement pour le dépistage combiné du VIH, du VHB, du VHC, de la syphilis, de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* leur seront à nouveau proposés afin de respecter la recommandation d'au moins un dépistage des IST par an.

Le recrutement s'est fait du 11 avril au 10 juin 2018. Deux mille vingt participants ont renvoyé un kit complet. Parmi les 1930 échantillons urinaires, pharyngés et anaux tests, **13,2% des sujets avaient au moins un site positif à *C. trachomatis* ou à gonocoque** (cf Tableau ci-dessous).

	N=1 930		<i>C. trachomatis</i> (CT)		<i>N. gonorrhoeae</i> (NG)		CT ou NG	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>1 site infecté</b>	<b>153</b>	<b>7,9</b>	<b>144</b>	<b>7,5</b>	<b>254</b>	<b>13,2</b>		
Urine seule	23	1,2	1	0,1	19	1,0		
Pharynx seul	17	0,9	98	5,1	104	5,4		
Anus seul	113	5,9	45	2,3	131	6,8		
<b>2 sites infectés</b>	<b>24</b>	<b>1,2</b>	<b>38</b>	<b>2,0</b>	<b>65</b>	<b>3,4</b>		
Urine et pharynx	0	0,0	3	0,2	2	0,1		
Urine et anus	10	0,5	2	0,1	12	0,6		
Anus et pharynx	14	0,7	33	1,7	51	2,6		
<b>3 sites infectés</b>	<b>3</b>	<b>0,2</b>	<b>4</b>	<b>0,2</b>	<b>10</b>	<b>0,5</b>		
<b>Urine - total</b>	<b>36</b>	<b>1,9</b>	<b>10</b>	<b>0,5</b>	<b>43</b>	<b>2,2</b>		
<b>Pharynx - total</b>	<b>34</b>	<b>1,8</b>	<b>138</b>	<b>7,2</b>	<b>167</b>	<b>8,7</b>		
<b>Anal - total</b>	<b>140</b>	<b>7,3</b>	<b>84</b>	<b>4,4</b>	<b>204</b>	<b>10,6</b>		
<b>Total</b>	<b>180</b>	<b>9,3</b>	<b>186</b>	<b>9,6</b>	<b>329</b>	<b>17,1</b>		

Les échantillons positifs à *C. trachomatis* (202 dont 133 en Ile de France) et *N. gonorrhoeae* (223 dont 169 en Ile de France) ont été envoyés par les 4 centres participants (Paris, Lyon, Montpellier et Marseille) au CNR des IST bactériennes pour :

- Le typage des échantillons *C. trachomatis* (+) à Bordeaux (C. Bébéar)  
Sur les 202 échantillons positifs à *C. trachomatis* seulement **3 correspondaient à une souche de type L**. Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale en 2019 à l'IUSTI Europe Congress, 5-7 septembre, Tallinn, Estonia.

- La recherche de résistance aux bêta-lactamines et fluoroquinolones des échantillons *N. gonorrhoeae* (+) (B. Berçot)  
Sur les 239 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* détectés dans les laboratoires partenaires régionaux par PCR en temps réel, 219 ont été transmis à l'Hôpital Saint-Louis, dont 175 souches isolées à l'Hôpital Saint-Louis (IDF), 31 échantillons ont été transmis par les laboratoires de Lyon (ARA) et 13 de Montpellier (LR), les sites de prélèvement des échantillons sont décrits dans le Tableau ci-dessous.

**Tableau. Origine des prélèvements positifs à gonocoque par provenance géographique.**

Prélèvement	Ile de France	Lyon	Montpellier	Total
Oro-pharyngé	106	6	19	131
Rectal	62	5	11	78
Uro-génital	7	2	1	10
<b>Total</b>	<b>175</b>	<b>13</b>	<b>31</b>	<b>219</b>

Les 219 prélèvements positifs pour le gonocoque reçus à l'hôpital Saint-Louis ont été analysés avec la trousse Resistance Plus GC (SpeedX) détectant le gonocoque et sa résistance aux fluoroquinolones par qPCR (cf paragraphe 6.1.3), afin d'établir des données de prévalence dans cette population d'HSH n'utilisant pas la PrEP.

Le gonocoque n'est détecté par la qPCR SpeedX que dans 90% (196/219) des extraits d'ADN positifs à gonocoque. **La mutation Ser91Phe conférant la résistance aux fluoroquinolones est détectée dans 48,5% (95/196) des prélèvements positifs à gonocoque**, la séquence non mutée Ser91 est détectée dans 42,3% (83/196) des prélèvements positifs et 9% (18/196) des prélèvements positifs ont un statut Ser91 indéterminé. Les résultats obtenus par la trousse SpeedX des 219 échantillons testés sont présentés dans le Tableau ci-dessous.

**Tableau. Résultats de la résistance aux fluoroquinolones obtenus par PCR SpeeDx pour les 219 échantillons positifs à gonocoque dans le cadre de l'étude Remind/Mémodépistages.**

	<i>N. gonorrhoeae</i> non détecté	<i>N. gonorrhoeae</i> détecté		Statut indéterminé	Total
		Mutation Ser91Phe (résistance aux fluoroquinolones)	Souche sauvage		
Ile de France	21	73	66	15	175
Lyon	2	14	13	2	31
Montpellier	0	8	4	1	13
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>95/196 (48,5%)</b>	<b>83/196 (42,3%)</b>	<b>18/196 (9,2%)</b>	<b>219</b>

Suite à l'envoi du 2<sup>ème</sup> kit IST à M12 en avril 2019, le CNR a collecté, au dernier trimestre 2019, pour typage et recherche de résistance aux antibiotiques 39 échantillons positifs à *C. trachomatis* de Saint Louis, Montpellier et Lyon et 54 échantillons échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* de Saint Louis, Montpellier et Marseille.

Le travail a été commencé pour les prélèvements positifs à gonocoque de la phase 2 et l'analyse finalisée en 2020.

Les échantillons positifs à *C. trachomatis* provenaient de 33 patients et ont été reçus de 3 sites (Lyon, Montpellier et Saint Louis) (voir Tableau ci-dessous). Sur les 39 prélèvements testés, aucun échantillon n'était positif pour une souche de type L.

Type de prélèvement	Lyon	Montpellier	Saint Louis	Total général
Pharynx	2	1	6	9
Anus	6	3	14	23
Urines	3	1	3	7
<b>Total général</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>23</b>	<b>39</b>

Lors de ce 2<sup>ème</sup> envoi, la recherche de *M. genitalium* a été réalisée à partir des échantillons reçus à Saint-Louis. Trente et un échantillons positifs à *M. genitalium* (16 anus, 9 urines et 6 gorges) collectés de 28 patients ont été envoyés au CNR à Bordeaux. Sur les 15 échantillons qui ont pu être amplifiés, 13 hébergeaient une souche de *M. genitalium* résistante aux macrolides. Pour les fluoroquinolones, sur les 30 échantillons amplifiés par la PCR de la QRDR *parC*, tous hébergeaient une souche sauvage de *M. genitalium* à l'exception d'un seul (Tableau ci-dessous).

Résistance aux macrolides <i>M. genitalium</i>	31 échantillons	28 patients
Non déterminé	16	13
Souche Sensible (WT)	2	2
Mutations ARNr 23S (A2058G ou A2059G)	13	13

Résistance aux fluoroquinolones <i>M. genitalium</i>	31 échantillons	28 patients
Non déterminé	1	1
Sensible (WT)	29	26
Mutation <i>parC</i> (Asp87(84)Asn)	1	1

### 6.1.2 Laboratoire CHU de Bordeaux

#### - Eléments intégratifs conjugatifs (ICE) et résistance aux tétracyclines chez *M. hominis*

Les ICE ayant été décrits chez des espèces de mycoplasmes de ruminants, nous avons recherché la présence d'ICE au sein du génome de 12 souches de *M. hominis* par séquençage complet du génome et estimé leur prévalence au sein de 120 isolats cliniques de *M. hominis* de notre collection.

Des ICE de près de 30 kpb ont été trouvés en une ou plusieurs copies dans sept des 12 souches de *M. hominis* séquencées. Seulement cinq de ces ICE semblaient fonctionnels puisqu'une forme circulaire a pu être détectée. Tous les ICE de *M. hominis* présentaient une structure similaire avec un module inhabituel et spécifique de *M. hominis*

d'environ 4-5 kpb, codant des protéines ayant des caractéristiques structurales similaires à des effecteurs TAL (transcription activator-like), impliqués dans la reconnaissance de nucléotides et dans la transduction de signaux chez les bactéries pathogènes de plantes. Le screening de 120 isolats cliniques a révélé une prévalence élevée des ICE dans l'espèce *M. hominis*, mesurée à 45%. Il n'y avait pas de prédominance des ICE dans les isolats portant le gène *tet(M)*, suggérant que les ICE n'étaient pas responsables de la dissémination de la résistance à la tétracycline.

Des expériences complémentaires de conjugaison seront nécessaires pour confirmer la fonctionnalité des ICE retrouvés dans l'espèce *M. hominis*. Cependant, la forte prévalence et le caractère très conservé des ICE chez *M. hominis* suggèrent que ces ICE pourraient conférer un avantage sélectif pour la physiologie ou la physiopathologie de la bactérie.

Cette étude a fait partie des travaux de **doctorat d'Alexandra Meygret** dont la thèse a été soutenue le 14 octobre 2019. **Une publication a été acceptée dans Frontiers in Microbiology en 2019** : A. Meygret, O. Peuchant, E. Dordet-Frisoni, P. Sirand-Pugnet, C. Citti, C. Bébéar, L. Béven, S. Pereyre. High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*. 10: 2385.

#### **- Etude des mécanismes de résistance à la doxycycline chez *M. genitalium***

Les tétracyclines ne sont actives que dans 30% des infections à *M. genitalium*, bien que les CMI de ces antibiotiques vis à vis de cette espèce soient basses (CMI <0,5 mg/l) et sans qu'un mécanisme de résistance acquise ait été identifié à ce jour. Du fait de l'augmentation des résistances acquises aux macrolides et aux fluoroquinolones, les tétracyclines peuvent être prescrites comme alternative dans le traitement de ces infections et sont déjà proposées dans le traitement séquentiel guidé par la résistance recommandé au Royaume Uni (BASHH) et en Australie.

**Une sélection de mutants résistants** a été réalisée par passages répétés de la souche de référence G37 en présence de concentrations subinhibitrices croissantes de doxycycline. Après 30 passages, aucune augmentation de CMI de la doxycycline n'a été observée et les clones sélectionnés aux passages 5, 10 et 30 ne présentaient pas de mutations au niveau du site d'action des tétracyclines dans l'ARNr 16S. **Une recherche par amplification et séquençage de mutations de l'ARNr 16S** a été également réalisée à partir de 181 échantillons positifs à *M. genitalium* issus de patients sans antécédents de traitement connu ou ayant reçu un traitement par azithromycine, moxifloxacine ou doxycycline de la collection du CNR et de 42 échantillons positifs à *M. genitalium* issus de patients HSH de la cohorte Ipergay ayant reçu ou pas une PEP par doxycycline. Huit échantillons (2 de l'essai Ipergay et 6 de la collection du CNR) présentaient une mutation de l'ARNr 16S connue pour entraîner une résistance à la doxycycline chez *Helicobacter pylori* et d'autres espèces de mycoplasmes humaines ou animales.

Ces travaux ont fait l'objet du Master 2 de Carla Balcon en 2019 et **un manuscrit regroupant ces travaux et ceux de 2018 étudiant les supports génétiques de la résistance aux tétracyclines chez *C. trachomatis*** a été soumis au **J Antimicrob Chemother** (C. Le Roy, A. Touati, C. Balcon, J. Garraud, J.-M. Molina, B. Berçot, B. de Barbeyrac, S. Pereyre, O. Peuchant, C. Bébéar. Identification of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma genitalium* potentially associated with tetracycline resistance *in vivo* but not selected *in vitro* in *M. genitalium* and *Chlamydia trachomatis*).

#### **- PHRC national I-Predict**

**Dépistage précoce et traitement des infections à *C. trachomatis* chez les jeunes femmes pour prévenir les infections génitales hautes : un essai de prévention randomisé (i-PREDICT)**

Cet essai clinique rentre dans le cadre de la cohorte i-Share ([www.i-share.fr](http://www.i-share.fr), IDEX Bordeaux) portée par l'Université de Bordeaux en collaboration avec l'Université de Versailles Saint-Quentin (UVSQ) et l'Inserm depuis 2013. L'objectif principal de cette cohorte est d'étudier les maladies dont les IST (coordination Didier Guillemot et Elisabeth Delarocque-Astagneau, GH Raymond Poincaré, APHP, UMR 1181 Inserm/Institut Pasteur/UVSQ), les comportements à risque et la santé de 30 000 étudiants sur 10 ans.

Cette cohorte devrait permettre d'évaluer **l'efficacité du dépistage et du traitement de l'infection à *C. trachomatis* dans la prévention des complications chez les femmes de moins de 25 ans, et d'améliorer la connaissance de l'histoire naturelle de la maladie et de ses complications lors d'un essai clinique de prévention randomisé appelé i-PREDICT**, financé par le PHRC national 2015. Des étudiantes âgées de 18 à 24 ans participant à la cohorte I-Share et provenant des Universités de Bordeaux, Versailles Saint-Quentin, Nice Sofia Antipolis et Paris intra-muros, sont suivies sur une période de 2 ans et incluses dans 2 bras, un bras contrôle, non dépisté avec conservation des échantillons, et un bras intervention dépisté et traité, avec analyse des échantillons et rendu des résultats positifs. Le CNR en tant que principal co-investigateur assure toute la logistique des échantillons vaginaux, réalise les tests diagnostiques CT/NG et participe à l'analyse des résultats. Les inclusions ont commencé en janvier 2016 et se sont

terminées le 10/01/2020. **Au total 546 étudiantes ont été incluses dans le bras intervention et 547 dans le bras témoin.**

Dans le bras intervention, le taux de positivité de *C. trachomatis* est de 2,56% (14/546) à l'inclusion, de 1,71% (7/409) à M6, de 0,94% (3/320) à M12 et 0,42% (1/239) à M18. Dans le bras témoin pour les suivis terminés, le taux de positivité est de 4% (13/329) à l'inclusion, 4% (10/274) à M6, 4% (11/250) à M12 et 3% (7/234) à M18. Aucun diagnostic de *N. gonorrhoeae* n'a été fait à ce jour. A ce jour, 330 femmes incluses ont effectué leur visite finale.

**Une publication** a été issue de ces travaux en 2019 dans **Clin. Microbiol. Infect.** (J. Tamarelle, A.C.M. Thiébaud, B. de Barbeyrac, C. Bébéar, J. Ravel, E. Delarocque-Astagneau. 2019. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. Clin. Microbiol. Infect. 25 : 35-47).

#### **- PHRC national Chlazidoxy**

**Essai multicentrique, randomisé, en double aveugle comparant l'azithromycine à la doxycycline pour le traitement de l'infection anorectale à *C. trachomatis* concomitante à l'infection vaginale**

Il s'agit d'un essai clinique randomisé ouvert, multicentrique (CHU de Bordeaux, Tours, Lille, Nantes, Marseille et Paris -APHP hôtel Dieu-) coordonné par B. de Barbeyrac au sein du CNR IST. L'étude a démarré en octobre 2018 et à la fin 2018 les 7 centres étaient ouverts. L'objectif principal de cette étude est de **comparer l'efficacité de l'azithromycine monodose versus la doxycycline 100 mg 2 fois par jour pendant une semaine sur le traitement de l'infection anorectale chez la femme associée à l'infection vaginale**. A ce jour, les 460 femmes prévues, âgées de plus de 18 ans vues en consultation pré-IVG dans ces CHU ou dans les centres gratuits d'information, de dépistage et de diagnostic (CeGIDD) de Bordeaux, Nantes et Marseille et ayant une infection vaginale prouvée ont été incluses, avec 230 dans chaque bras, bras expérimental azithromycine versus bras contrôle doxycycline. Le taux de guérison microbienne (résultat de PCR négatif pour *C. trachomatis*) est évalué à partir d'un échantillon anorectal six semaines après le début du traitement dans chaque bras (azithromycine et doxycycline). Un échantillon anorectal est prélevé 4 mois après le traitement pour les femmes qui avaient un prélèvement anorectal positif et un prélèvement vaginal négatif à 6 semaines. L'auto-inoculation du rectum au vagin sera étudiée en évaluant le nombre de femmes pour lesquelles le même profil génotypique de *C. trachomatis* sera identifié dans l'échantillon anorectal positif obtenu six semaines après le début du traitement et dans l'échantillon vaginal positif obtenu quatre mois après le traitement. Cette étude permettra d'évaluer si le site anorectal est un réservoir potentiel de *C. trachomatis* chez la femme et si ce site joue un rôle dans l'infection cervicale répétée chez la femme par auto-inoculation. Si le traitement par azithromycine monodose s'avérait moins efficace que la doxycycline, les recommandations pour le traitement des infections urogénitales à *C. trachomatis* pourraient être revues pour tenir compte de l'infection anorectale concomitante.

**Le protocole a été publié en 2019** : O. Peuchant, E. Lhomme, M. Krêt, B. Ghezzoul, C. Roussillon, C. Bébéar, F. Perry, B. de Barbeyrac and the Chlazidoxy study group. 2019. Randomized, open-label, multicenter study of azithromycin compared with doxycycline for treating anorectal *Chlamydia trachomatis* infection concomitant to a vaginal infection (CHLAZIDOXY study). **Medicine** 98 : e14572.

### **6.1.3 Laboratoire APHP Saint-Louis**

#### **- La résistance antimicrobienne des gonocoques en France et les caractéristiques cliniques et épidémiologiques associées**

Ce travail effectué en collaboration avec l'équipe de Florence Lot de Santé publique France a pour objectif de fournir une mise à jour des indicateurs déterminants corrélés à la résistance aux antimicrobiens gonococciques précédemment décrits par La Ruche et al. sur la période 2001-2012. Cette étude décrit **l'évolution de la résistance aux antibiotiques des gonocoques de 2013 à 2017, la mise en évidence des corrélations entre la mise en œuvre des directives successives et l'évolution de la résistance et la mise en évidence de l'étude des déterminants épidémiologiques liés à la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques.**

L'analyse multivariée basée sur les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération soutient l'hypothèse d'une diminution de la résistance au céfixime avec une diminution de 3,75 fois entre 2012 (3,0%) et 2017 (0,8%). Les isolats résistants au céfixime semblent avoir été remplacés par des isolats plus sensibles. Cette situation est similaire à l'observation Euro-GASP en 2017 : un faible taux de résistance au céfixime à 1,7% et une résistance inquiétante à l'azithromycine autour de 7%. Il convient d'examiner si ces tendances sont dues au récent déclin du clone de gonocoque multirésistant ST1407 depuis 2013 ou à une bonne conformité aux directives de traitement.

Les seuils de CMI choisis pour les analyses du modèle statistique actuel sont différents de ceux choisis dans la précédente étude (2001 - 2012). La situation étayée par l'analyse multivariée basée sur les CMI ne recoupe pas celle de la précédente étude sur les isolats 2001-2012. Nous n'avons trouvé aucune association de corrélation entre la perte de sensibilité aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et le groupe d'âge ou le site anatomique. Avant 2012, une plus grande proportion d'isolats présentant une baisse de sensibilité a été trouvée chez des patients âgés de 25 ans et plus, des isolats provenant de prélèvements pharyngés et obtenus dans des laboratoires situés dans le nord-est de la France. Pour les isolats de 2013-2017, une corrélation a été trouvée entre une plus grande proportion de souches ayant des CMI élevées pour la ceftriaxone et le Nord de la France, alors que des CMI élevées pour le céfixime étaient plus fréquentes parmi les isolats du Sud-Ouest de la France. Les souches présentant une perte de sensibilité aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération étaient plus fréquentes parmi les isolats présentant des CMI élevées pour la tétracycline, la ciprofloxacine et l'azithromycine. Cette constatation pourrait confirmer que la perte de sensibilité aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération est un trait phénotypique associé à des souches multirésistantes aux antibiotiques. En ce qui concerne les isolats de 2013-2017, une proportion plus faible d'isolats présentant des CMI plus élevées pour les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération a été observée chez les patients examinés dans les hôpitaux et les établissements spécialisés dans les IST.

Ces travaux sont en cours de rédaction pour publication avec Thibaut Poncin, Béatrice Berçot et Ndeindo Ndeikoundam et Delphine Viriot de Santé publique France.

#### **- Exploration des souches de gonocoque résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération sur la période 2008-2016 par NGS.**

Le taux de souches de gonocoques de sensibilité diminuée ou résistantes au céfixime (CFM<sub>SD/R</sub>, définies par une CMI au céfixime  $\geq 0,125$  mg/L) avait atteint un pic en 2012, avec 3% des souches, contre 0,7% en 2011. Depuis 2014, le taux de souches de gonocoques CFM<sub>SD/R</sub> s'était stabilisé aux alentours de 1% en France. Ce changement semblait corrélé aux recommandations européennes de 2012 pour le traitement probabiliste des gonococcies non compliquées, associé à l'intensification des dépistages. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux **structures des populations de CFM<sub>SD/R</sub> isolées entre 2008 et 2016 avec une investigation par NGS pour déterminer la clonalité de ces souches et les déterminants génétiques responsables du phénotype CFM<sub>SD/R</sub>.**

Le précédent rapport du CNR des IST bactériennes présentait les premières données génomiques et épidémiologiques, obtenues pour 180 souches de phénotype CFM<sub>SD/R</sub>. Il s'agissait du **travail de thèse d'exercice** pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie de Thibaut Poncin soutenue en avril 2019. Un complément de 112 souches également reliées à des données épidémiologiques a été ajouté à la première partie de l'étude. Cette collection de souches plus importante (15 en 2016 ; 14 en 2015 ; 18 en 2014 ; 20 en 2013 ; 77 en 2012 ; 39 en 2011 ; 49 en 2010 ; 52 en 2009 ; 8 en 2008) fournira une puissance supplémentaire afin de faire une analyse multivariée plus robuste que la précédente.

Les analyses génomiques complémentaires (typage *in silico*, recherche des déterminants de résistance) et l'analyse statistique, en partenariat avec Santé publique France, sont en cours. Les 1<sup>ers</sup> résultats complémentaires consolidés étaient la première analyse, avec une population de souches de *N. gonorrhoeae* multirésistant divisés en 2 principaux clades. Le clade I regroupe 210 (72%) souches porteuses de l'allèle mosaïque *penA*-34.001 (PLP2 mosaïque) et un type MLST proche du ST1901 habituellement retrouvé en Europe et Amérique du Nord. Le clade II regroupe 79 (27%) souches porteuses de l'allèle mosaïque *penA*-10.001 (PLP2 mosaïque) et un type MLST proche du ST7363 endémique en Asie du Sud-Est. La multirésistance aux antibiotiques est fréquente dans la collection avec 291 souches (>99%) résistantes à haut niveau à la ciprofloxacine, 277 souches (95%) intermédiaires ou résistantes à la tétracycline. La résistance à l'azithromycine est faible (4% des souches). Aucune souche n'est résistante à la spectinomycine.

La poursuite de cette étude génomique sur les souches de *N. gonorrhoeae* CFM<sub>SD/R</sub> circulant en France métropolitaine entre 2008 et 2016 a pour perspectives de : (i) confirmer le remplacement de clones suggéré dans la première partie de l'étude (cf. rapport CNR 2018) : prédominance du MLST1901 avant 2012 puis diversification des clones avec l'émergence du MLST7363 depuis 2013, (ii) identifier les caractéristiques démographiques et cliniques corrélées avec l'acquisition d'une souche de gonocoque CFM<sub>SD/R</sub>, (iii) décrire les remaniements des gènes *penA* codant la PLP2 – insertions, délétions, recombinaisons – figurant dans les 2 clades décrits, (iv) comparer la phylogénie de notre étude (basée sur une comparaison des SNP des core-genome des 292 souches) avec l'épidémiologie moléculaire observée dans d'autres pays d'Europe.

Cette étude a fait partie des **travaux de doctorat de Thibaut Poncin**.

**- Evaluation de molécules dérivées de la gatifloxacine – QUIN (Projet en partenariat avec Sorbonne Université – Hôpital Pitié-Salpêtrière – CNR Mycobactérie)**

Ce projet rentre dans le cadre de la **synthèse de nouvelles fluoroquinolones** en collaboration avec l'équipe de G. Anquetin (Faculté des Sciences, Université Paris 5) guidée par les données de relation structure-activité obtenues à travers des travaux menés au CNR-MyRMA: brevet européen (n°EP 14 173 040.8) 2014, brevet international (n° PCT/EP2015/063752) 2015. Grâce à un financement d'un programme de maturation par la SATT Lutec, **l'évaluation de ces composés actifs a été poursuivie dans un modèle murin de tuberculose et évaluer leurs activités vis-à-vis d'autres bactéries d'intérêt médical.**

Le CNR IST expertise gonocoque a participé à ce projet en apportant une collection de 12 souches de référence de l'OMS, les souches *N. gonorrhoeae* (WHO A, B, C, D, E, G, K, M, O, Q, Z), une souche résistante à haut niveau à l'azithromycine. Pour les 2 nouvelles molécules testées appelées A et B qui sont des dérivées de la gatifloxacine, une activité antimicrobienne est retrouvée avec des valeurs de CMI allant de 0,03 à 256 mg/L pour la molécule A et allant de 0,008 à 256 mg/L pour la molécule B. Pour les souches sauvages, comme la WHO A, les valeurs de CMI des deux composés se situe entre 0,03 et 0,06 mg/L et 0,5 µmg/L. Concernant les isolats résistants aux fluoroquinolones, la CMI des deux composés a été trouvée plus élevée que celles de la ciprofloxacine et de la moxifloxacine.

Une valorisation de cette étude est en cours avec **un manuscrit en cours de soumission en 2020**. E. Sadowski, B. Berçot, C. Gomez, E. Varon, M. Mainardis, C. Mayer, E. Sachon, W. Sougakoff, G. Anquetin, A. Aubry. Synthesis of gatifloxacin derivatives and in vitro antibacterial evaluation.

**- Evaluation de l'automate NeumoDx pour la détection d'IST (partenariat avec Qiagen)**

**Le système NeumoDx CTNG (Qiagen) a été comparé à l'automate cobas 6800 CT/NG (Roche Diagnostics) pour la détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sur une collection de 283 échantillons**, 190 positifs (95 prélèvements positifs à *C. trachomatis*, 95 prélèvements positifs à *N. gonorrhoeae*) recueillis entre mai et décembre 2018 et 95 échantillons négatifs recueillis entre mai et juin 2019 à l'Hôpital Saint Louis. Les 283 échantillons provenaient de prélèvements d'anus (n=49), de gorge (n=53), de prélèvements vaginaux (n=67), de prélèvements urétraux (n=24) et de 90 urines. Nos premiers résultats sont :

Pour *C. trachomatis*, la sensibilité du NeumoDx, était de 93,6% quel que soit l'échantillon, la spécificité était de 100%. Pour *N. gonorrhoeae*, la sensibilité était de 86,2% et la spécificité de 98,9%. Les discordances entre les deux systèmes sont actuellement en cours d'analyse.

**- Évaluation de kit pour la détection de gonocoque et détermination de la résistance à la ciprofloxacine (partenariat avec SpeeDx)**

**Le kit ResistancePlus GC assay (SpeeDx, Australie) un test de PCR en temps réel marqué CE-IVD qui permet de détecter simultanément la présence de *N. gonorrhoeae* et d'une mutation du gène *gyrA* codant la résistance aux fluoroquinolones.** La PCR détecte la présence de *N. gonorrhoeae* sur 2 cibles, la cible multicopie *opa* et la cible *porA* et permet de déterminer la résistance aux fluoroquinolones en indiquant si le gène *gyrA* est de type sauvage ou s'il code pour la mutation Ser91Phe principalement impliquée dans la résistance aux fluoroquinolones chez le gonocoque. Un contrôle interne est inclus dans chaque réaction. **Le test ResistancePlus GC assay (SpeeDx, Australie) a été testé sur les 248 échantillons recueillis pour l'étude ENGON 2017 (voir annexe).** Les échantillons cliniques d'ENGON 2017 ont été extraits avec l'automate m2000sp (Abbott).

Les résultats ont permis d'observer 2 échantillons invalidés par l'absence d'amplification du contrôle interne, 14 échantillons pour lesquels une des cibles d'identification de *N. gonorrhoeae* est restée négative (*opa* et/ou *porA* négatif) et 12 échantillons où les deux cibles de *N. gonorrhoeae* étaient détectées mais le gène *gyrA* restait non détecté.

Pour les 220 échantillons cliniques analysables, 135 échantillons (61,4%) et 85 (38,6%) avaient respectivement un gène *gyrA* sauvage et muté. Le taux de résistance aux fluoroquinolones détecté par biologie moléculaire (38,6%) est très proche de celui observé sur les souches isolées en 2017 (37,2%). Les résultats ininterprétables (hors contrôle interne invalide) provenaient majoritairement de prélèvements de gorge à 21,2% (11/52 prélèvements de gorge) et possédait un Ct moyen de 37,7 (±1,7). Les résultats interprétables provenaient majoritairement des prélèvements vaginaux et des urines avec respectivement 96,9% (31/32 urines) et 94,7% (71/75 prélèvements vaginaux). Le Ct moyen était de 27 (±5,6).

Cette étude a fait l'objet d'une présentation affichée à l'IUSTI 2019 à Tallin, Estonie, et d'une présentation orale à la RICAI 2019 (voir annexe).

#### 6.1.4 Laboratoire APHP Cochin

##### - Exploration des bases génétiques de la résistance de *T. pallidum pallidum* à la doxycycline

**Introduction :** La syphilis reste un problème de santé publique en France et le nombre de cas augmente depuis les années 2000. La doxycycline est recommandée en traitement de seconde intention des syphilis précoces après la benzathine pénicilline G. Des mutations ponctuelles sur le gène de l'ARNr 16S et la présence du gène *tet(B)* sont connues pour induire une résistance à la doxycycline chez d'autres bactéries et *tet(B)* a seulement été décrit chez *Treponema denticola* (*T. denticola*). L'objectif de cette étude est de rechercher les mutations ponctuelles sur le gène de l'ARNr 16S et la présence du gène *tet(B)* chez *T. pallidum pallidum* (TPA) en France.

**Matériels et Méthodes :** La recherche des mutations ponctuelles 926-928, 939, 965-967 et 1058 (numérotation *E. coli*) a été réalisée sur 146 extraits d'ADN de TPA par PCR nichée et séquençage des amplicons. Par un essai de clonage, la création d'un contrôle positif contenant le gène *tet(B)* de *T. denticola* chez TPA a été tenté.

**Résultats :** le gène de l'ARNr 16S a été amplifié chez 139 des 146 extraits d'ADN de TPA et le séquençage des amplicons obtenus n'a révélé aucune mutation ponctuelle dans les positions nucléotidiques d'intérêt. La tentative de clonage n'a pas permis de créer un contrôle positif de *tet(B)* de *T. denticola* chez TPA ce qui confirme l'absence de *tet(B)* chez TPA à ce jour.

**En conclusion,** aucun support génétique de la résistance aux tétracyclines n'a été identifié dans les échantillons TPA-positifs testés dans la collection du CNR au cours de l'étude.

Ces travaux ont fait l'objet du **Master 2 d'Adrien Sanchez** en 2019.

##### - Etude rétrospective multicentrique Neurocef

L'étude NeuroCef, ceftriaxone vs pénicilline G pour le traitement de la neurosyphilis, a été menée pendant l'année 2019 sur 8 centres. Nous avons pu réunir 207 cas de neurosyphilis dont 42 traités par ceftriaxone et 165 par pénicilline G.

#### Introduction

La benzylpénicilline par voie intraveineuse est le gold standard pour le traitement de la neurosyphilis précoce mais requiert une hospitalisation prolongée. Le traitement alternatif est la ceftriaxone mais son efficacité demeure débattue.

#### Méthodes

Nous avons réalisé une étude rétrospective multicentrique dans 8 centres tertiaires français de 1997 à 2017. Les centres investigateurs sont des Services des Maladies Infectieuses et Tropicales qui ont été coordonnés par le CNR : centres APHP, Hôpital Saint-Louis (Pr. Molina), Bichat (Pr. Ghosn), Necker (Dr. Charlier), Cochin (Prs Terrier et Dupin, Dr Régent) ; centres en province, CHU de Rennes (Pr Tattevin), de Bordeaux (Pr Cazanave), de Toulouse (Pr Martin-Blondel et Dr. Jourdes), de Tourcoing (Drs Alcaraz et Robineau). La neurosyphilis précoce incluait les formes cliniques suivantes : uvéites, otosyphilis, méningites, vasculites cérébrales et formes parenchymateuses et paralysies faciales. Les patients étaient classés en deux groupes en fonction du traitement reçu. Le critère de jugement principal était la réponse clinique globale (RG) un mois après l'initiation du traitement. Les critères de jugement secondaires étaient la réponse complète (RC) à 1 mois, la réponse sérologique à 6 mois et la durée d'hospitalisation. Un score de propension était réalisé.

#### Résultats

Deux cent sept patients ont été inclus (ceftriaxone, 42 et benzylpénicilline 165). Quarante et unes RG (98%) ont été observées dans le groupe ceftriaxone versus 125 (76%) dans le groupe pénicilline. Après pondération par le score de propension, les deux groupes différaient selon la RG (OR 1,22 [1,12-1,33],  $p < 10^{-5}$ ), mais pas la RC (OR 1,08 [0,94-1,24],  $p = 0,265$ ). La réponse sérologique ne différait pas dans les deux groupes (88% vs 82%,  $p = 0,50$ ), mais la durée d'hospitalisation était plus courte dans le groupe ceftriaxone que dans le groupe pénicilline ( $13,8 \pm 6,4$  vs  $8,9 \pm 9,9$  jours,  $p = 0,005$ ). La réponse en sous-groupe était également homogène.

En conclusion, cette étude suggère que **la ceftriaxone est aussi efficace que la benzylpénicilline pour traiter la neurosyphilis précoce et peut réduire la durée d'hospitalisation**. Plusieurs bénéfices potentiels en découlent. Tout d'abord, pour les patients allergiques à la pénicilline et sans contre-indication aux céphalosporines, la ceftriaxone pourrait représenter le traitement de première ligne. Ensuite, pour des patients prêts à un retour au domicile, la ceftriaxone permettrait de réduire la durée d'hospitalisation, et ainsi réaliser des économies et améliorer la qualité de vie. A l'opposé, le spectre antibactérien plus large expose à un risque accru d'émergence de résistances. Nous reconnaissons les limites de l'étude, principalement le design rétrospectif ainsi que le biais d'indication. Des essais prospectifs randomisés devraient être conduits pour confirmer ces résultats.

Ce travail a fait l'objet d'un **manuscrit soumis au Lancet Infect. Dis.** et est actuellement en révision.

## 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

### 6.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

#### Publications nationales

D. Viriot, N. Ndeikoundam Ngangro, E. Lucas, N. Dupin, B. de Barbeyrac, A. Bertolotti, C. Cazanave, S. Fouéré, C. Pioche, F. Lot. 2019. Dépistage des IST bactériennes dans le secteur privé en France, 2006-2018. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire N° 31-32.

S. Pereyre, C. Bébéar. Mycoplasmes urogénitaux : Quand les rechercher? Comment les traiter ? La lettre de l'infectiologue, sous presse.

S. Pereyre, C. Bébéar. 2019. Infections à *Mycoplasma hominis*. In: Encycl. Méd. Chir., Maladies Infectieuses, Elsevier SAS, Paris. 37, 1, p 1-9. Article 8-039-V10.

J.-L. Brun, B. Castan, B. de Barbeyrac, C. Cazanave, A. Charvériat, K. Faure, S. Mignot, R. Verdon, X. Fritel, O. Graesslin. 2019. Les infections génitales hautes. Mise à jour des recommandations pour la pratique clinique – texte court. Gynecol Obstet Fertil Senol. 47 : 398-403.

C. Cazanave, B. de Barbeyrac. 2019. Les infections génitales hautes : diagnostic microbiologique - Mise à jour des recommandations pour la pratique clinique. Gynecol. Obstet. Fertil. Senol. 47 : 409-417.

S. Pereyre, C. Bébéar, Ch. Bébéar. 2019. Mycoplasmes, pp. 1535-1548. In : Précis de Bactériologie clinique, 3<sup>ème</sup> édition. J. Freney, P. Riegel (ed) ESKA, Paris.

B. de Barbeyrac, O. Peuchant, C. Bébéar. 2019. *Chlamydia*, pp. 1549-1565. In : Précis de Bactériologie clinique, 3<sup>ème</sup> édition. J. Freney, P. Riegel (ed) ESKA, Paris.

#### Publications internationales

A. Touati, C. Laurier-Nadalié, C. Bébéar, O. Peuchant, B. de Barbeyrac. 2020. Evaluation of four commercial real-time PCR assays for the detection of Lymphogranuloma venereum in *Chlamydia trachomatis*-positive anorectal samples. Clin Microbiol Infect. 2020 Aug 6:S1198-743X(20)30448-1.

O. Peuchant, A. Touati, C. Laurier, N. Hénin, C. Cazanave, C. Bébéar, B. de Barbeyrac. 2020. Prevalence of lymphogranuloma venereum among anorectal *Chlamydia trachomatis*-positive men who have sex with men using pre-exposure prophylaxis. Sex Transm Infect. Apr 17:sextrans-2019-054346.

M. Mehlen, V. Saunier, B. de Barbeyrac, T. Gaboriau, C. Bébéar, B. Bercot, C. Castor, D. Levesque, C. Cazanave, M. Puges. Keep an eye on *Neisseria gonorrhoeae*. Clin Microbiol Infect. 2020 Mar 7. pii: S1198-7432(20)30144-0.

C. Legouy, A. Hu, F. Mochel, N. Weiss, A. Collin, S. Pereyre, M. Perrin, N. Engrand. 2020. *Ureaplasma parvum* causes hyperammonemia presenting as refractory status epilepticus after kidney transplant. J Crit Care. 57:79-83.

C. Le Roy, C. Bébéar, S. Pereyre. 2020. Clinical evaluation of three commercial PCR assays for the detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium*. J. Clin. Microbiol. 28;58(2). pii: e01478-19.

A. Meygret, O. Peuchant, E. Dordet-Frisoni, P. Sirand-Pugnet, C. Citti, C. Bébéar, L. Béven, S. Pereyre. 2019. High prevalence of integrative and conjugative elements encoding transcription activator-like effector repeats in *Mycoplasma hominis*. Front. Microbiol. 10 : 2385.

- F. Rideau, C. Le Roy, E. Sagné, H. Renaudin, S. Pereyre, B. Henrich, E. Dordet-Frisoni, C. Citti, C. Lartigue, C. Bébéar. 2019. Random transposon insertion in the *Mycoplasma hominis* minimal genome. Sci. Rep. 9 : 13554.
- O. Peuchant, E. Lhomme, M. Krêt, B. Ghezzoul, C. Roussillon, C. Bébéar, F. Perry, B. de Barbeyrac and the Chlazidoxy study group. 2019. Randomized, open-label, multicenter study of azithromycin compared with doxycycline for treating anorectal *Chlamydia trachomatis* infection concomitant to a vaginal infection (CHLAZIDOXY study). Medicine 98 : e14572.
- H.J.C de Vries, B. de Barbeyrac, N.H.N. de Vrieze, J.D. Viset, J.A. White, M. Vall-Mayans, M. Unemo. 2019. 2019 European guideline on the management of Lymphogranuloma venereum. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 33 : 1821-1828.
- M. Deborde, S. Pereyre, M. Puges, C. Bébéar, A. Desclaux, M. Hessamfar, C. Le Roy, F. Le Marec, F. Dabis, C. Cazanave. 2019. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection and macrolide resistance in patients enrolled in HIV Pre-exposure Prophylaxis program. Med. Mal.Infect. 49, 5, 347-349.
- K.B. Waites, C. Bébéar. 2019. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, pp.1117-1136. In Manual of Clinical Microbiology, 12<sup>th</sup> edition. ASM Press, Washington DC.
- C. Bébéar, J. S. Dumler. 2019. Algorithms for identification of *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and obligate intracellular bacteria, pp. 1109-1116. In Manual of Clinical Microbiology, 12<sup>th</sup> edition. ASM Press, Washington DC.
- N. Ngangro Ndeikoundam, D. Viriot, N. Fournet, C. Pioche, B. de Barbeyrac, A. Goubard, N. Dupin, B. Berçot, S. Fouéré, I. Alcaraz, M. Ohayon, N. Spenatto, C. Vernay-Vaisse, Referents For The Regional Offices Of The French National Public Health Agency, J. Pillonel, F. Lot. 2019. Bacterial sexually transmitted infections in France: recent trends and patients' characteristics in 2016. Euro Surveill. 24(5).
- M. Ducours, L. Alleman, M. Puges, M. Deborde, M. Hessamfar, F. Le Marec, F. Dabis, S. Pereyre, C. Bébéar, A. Desclaux, C. Cazanave. Incidence of sexually transmitted infections during Pre-Exposure Prophylaxis for HIV: a worrying outcome at two years ! Sex. Transm. Inf. 2019, 95, 7 : 552.
- C. Rouard, S. Pereyre, S. Abgrall, C. Guillet-Caruba, P. Diviné, N. Bourgeois-Nicolaos, S. Roy, V. Mangin d'Ouince, C. Bébéar, T. Bégué, F. Doucet-Populaire. Early prosthetic joint infection due to *Ureaplasma urealyticum*: benefit of 16S rRNA gene sequence analysis for diagnosis. J. Microbiol. Immunol. Infect. 2019, 52, 167-169.
- H. Pailhoriès, R. Chenouard, M. Eveillard, M. Kempf, S. Pereyre, C. Bébéar, C. Lemarié. A case of *Ureaplasma parvum* meningitis in an adult after transphenoidal ablation of cranopharyngioma. Int. J. Inf. Dis. 2019, 84, 5-7.
- T. Schmitz., L. Sentilhes, E. Lorthe, D. Gallot, H. Madar, M. Doret-Dion, G. Beucher, C. Charlier, C. Cazanave, P. Delorme, C. Garabédian, E. Azria, V. Tessier, M.-V. Sénat, G. Kayem. 2019. Preterm premature rupture of the membranes: Guidelines for clinical practice from the French College of Gynaecologists and Obstetricians (CNGOF). Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 236 : 1-6.
- T. Poncin, M. Merimeche, A. Braille, M. Mainardis, C. Bébéar, H. Jacquier, B. Berçot. 2019. Two cases of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* related to travel in south-eastern Asia, France, June 2019. Euro Surveill. 24. Doi : 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.36.1900528.
- J. Tamarelle, A.C.M. Thiébaud, B. de Barbeyrac, C. Bébéar, J. Ravel, E. Delarocque-Astagneau. 2019. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. Clin. Microbiol. Infect. 25 : 35-47.

## Communications nationales

- S. Pereyre, C. Laurie-Nadalié, M. Gardette, C. Le Roy, C. Bébéar. Résistance aux antibiotiques chez *Mycoplasma genitalium* en France en 2018. 39<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. Décembre 2019. Communication orale.
- C. Le Roy, C. Bébéar, S. Pereyre. Evaluation of three *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance kits. 39<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. Décembre 2019. Poster commenté.
- A. Touati, C. Laurier-Nadalié, P. Grange, N. Dupin, C. Bébéar, O. Peuchant, B. de Barbeyrac. 2019. Evaluation de trousse commercialisées pour le diagnostic de la LGV. 39<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 16-17 décembre, Paris. Poster commenté.

C. Le Roy, S. Pereyre, A. Alonso-Marrau, B. de Barbeyrac, C. Bébéar. 2019. Detection of STIs in semen and eSwab by Aptima assays. 39<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 16-17 décembre 2019. Poster.

E. Laugel, S. Berger, C. Laurain, S. Pereyre, B. de Barbeyrac, C. Bébéar, A. Lozniewski, C. Alauzet. 2019. Trois ans d'utilisation du système Panther® (Hologic) pour la détection des IST d'origine bactérienne au CHRU de Nancy. 15<sup>ème</sup> Congrès national de la Société Française de Microbiologie. 30 septembre-2 octobre, Paris. Poster.

C. Hobson, J. Gaschignard, M. Caseris, S. Bonacorsi, A. Cointe, P. Bidet, S. Pereyre, B. Dozieres, S. Wanin, H. Cogo. 2019. Mycoplasme résistant et EBV chez un enfant traité par Everolimus. Congrès de la Société Française de Pédiatrie. 19-21 juin, Paris. Poster.

C. Cazanave. 2019. IST : le point de vue de l'infectiologue 20<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie. 5-7 Juin Lyon. Communication orale.

C. Cazanave. 2019. Traitement des infections sexuellement transmissibles résistantes. 20<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie. 5-7 Juin Lyon. Communication orale.

M. Ducours, L. Alleman, M. Puges, M. Deborde, C. Bébéar, C. Le Roy, H. Dutronc, D. Neau, S. Pereyre, C. Cazanave. 2019. Traitement des infections rectales à *Mycoplasma genitalium* chez les HSH : un problème complexe. 20<sup>èmes</sup> Journées Nationales d'Infectiologie. 5-7 Juin Lyon. Poster.

### Communications internationales

D. Rahib, B. Berçot, H. Salord, M.N. Didelot, A. Touati, C. Bébéar, N. Lydié. 2019. Positivity for CT and GC in self-taken genital and extra-genital samples via free postal STI test kit in multipartner MSM. International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. Communication orale.

A. Braille, N. Schnepf, T. Poncin, P. Fernandes, C. Sevin, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. Survey of *Neisseria gonorrhoeae* fluoroquinolone susceptibility by using the ResistancePlus@GC assay SpeeDX on clinical sample. International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. Poster.

M. Mainardis, S. Trombert-Paolantoni, T. Poncin, A. Braille, S. Lastere, R. Theodose, J.F. Carod, C. Loreaux, P. Blanco, O. Belmonte, B. Rocquebert, N.N. Ndeikoundam, H. Jacquier, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. Prevalence and survey of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility in French Overseas Departments on clinical samples (2017-2018). International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. Poster.

C. Le Roy, S. Pereyre, A. Alonso-Marrau, B. de Barbeyrac, C. Bébéar. 2019. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in semen and eSwab medium using Hologic aptima assays. STI and HIV 2019 world congress. 14-17 juillet, Vancouver, Canada. Poster.

C. Le Roy, C. Bébéar, S. Pereyre. 2019. Clinical evaluation of three commercial PCR assays for the detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance. STI and HIV World Congress. 14-17 juillet, Vancouver, Canada. Poster.

H. Seth-Smith, D. Goldenberger, B. Versteeg, J. Kok, I. Carter, O. Peuchant, C. Bébéar, D. Lewis, D. Kесе, E. Balla, H. Zakoucka, F. Rob, S. Morré, B. Herrmann, J. Galàn, B. de Barbeyrac, H. de Vries, N. Thomson, A. Egli. 2019. Exploring the *ompA* diversity of circulating *Chlamydia trachomatis* strains causing lymphogranuloma venereum: ongoing evolution of L2b. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 13-16 avril, Amsterdam, Netherlands. Communication orale.

C. Bébéar, S. Pereyre, O. Peuchant, N. Schnepf, C. Laurier-Nadalié, A. Braille, A. Touati, T. Poncin, M. Gardette, M. Mérimèche, B. de Barbeyrac, B. Berçot. 2019. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* and antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in urogenital infections in France in 2017. 29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 13-16 April, Amsterdam, Netherlands. Mini-oral eposter session.

J. Guiraud, S. Godreuil, M. Lounnas, M. Didelot, D. Yann, S. Pereyre, C. Bébéar. 2019. Genetic diversity and population structure of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* among mono- and co-infected men, France. 29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 13-16 avril, Amsterdam, Netherlands. Poster.

C. Le Roy, C. Bébéar, S. Pereyre. Clinical evaluation of three commercial PCR assays for the detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance. European Mycoplasma Conference, Public Health England. 18-19 mars Colindale, London, UK. Poster.

B. Bercot, I. Charreau, C. Rousseau, C. Delaugerre, C. Chidiac, G. Pialoux, C. Capitant, N. Bourgeois-Nicolaos, F. Raffi, S. Pereyre, E. Senneville, L. Meyer, C. Bébéar, J.-M. Molina. 2019. High prevalence and antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* in MSM on PrEP. 2019 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Seattle, USA. Poster.

### Conférences sur invitation

B. de Barbeyrac, O. Peuchant. 2019. Dépistage des infections à *Chlamydia trachomatis* en obstétrique Infogyn le Congrès. 3-5 octobre, Pau. Conférence invitée.

C. Bébéar. 2019. *Mycoplasma hominis* an opportunistic human mycoplasma: now what? ASM Microbe, June 20-24, San Francisco, USA.

C. Bébéar. 2019. Interplay between PrEP and STI. 17<sup>th</sup> European meeting on HIV and hepatitis, 22-24 May, Roma, Italy.

C. Bébéar. 2019. IST: émergence des résistances aux antibiotiques. Journées Nationales d'Infectiologie. Lyon. 7-8 juin.

C. Bébéar. 2019. What I think should be the standard in diagnosing human mycoplasma infections. 29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 13-16 April, Amsterdam, Netherlands.

C. Bébéar. 2019. *Mycoplasma genitalium*, quand le rechercher ? Journées thématiques de la SPILF, PrEP, IST, Santé Sexuelle. 28-29 mars, Paris.

C. Bébéar. 2019. Actualités 2019 sur les tests de dépistage et la résistance des IST. Journées thématiques de la SPILF PrEP, IST, Santé Sexuelle. 28-29 mars, Paris.

S. Pereyre. 2019. *Mycoplasma genitalium*, un agent d'IST émergent. Congrès du syndicat des jeunes biologistes ou Journées BIOMED-J. 22-23 mars, Paris. Communication orale.

S. Pereyre, F. Tardy. 2019. Multidrug resistance in human and animal mycoplasmas. European Mycoplasma Conference, 18-19 mars, Londres, Royaume-Uni.

S. Pereyre. 2019. MDR in mycoplasma of human and animal origin. International Conference on One Health Antimicrobial Resistance (ICOHAR), 16-18 avril, Utrecht, Pays Bas.

S. Pereyre. 2019. Mycoplasmes : vérités et erreurs. Journée du Collège de Gynécologie de Bordeaux, 2 février Bordeaux. Communication orale.

C. Bébéar. 2019. Dépistage et diagnostic des IST. Journée régionale du COREVIH Nouvelle Aquitaine. 1er février, Angoulême. Communication orale.

## 6.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

### Publications nationales

T. Poncin, B. Bercot. Le gonocoque : le point en 2018. 2019. Revue de Biologie Médicale, mars n° 347 :1-13.

### Publications internationales

H. Jacquier, G. Miltgen, D. Hoarau, S. Kumanski, O. Rollot, S. Bruniquet, NN Ndeikoundam, G. Li Pat-Yuen, O. Belmonte, B. Bercot, B. Roquebert. Molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in Reunion and Mayotte. 2020 Sex Transm Infect. May 4.

M. Mehlen, V. Saunier, B. de Barbeyrac, T. Gaboriau, C. Bébéar, B. Bercot, C. Castor, D. Levesque, C. Cazanave, M. Puges. Keep an eye on *Neisseria gonorrhoeae*. 2020 Clin Microbiol Infect. Mar 7. pii: S1198-7432(20)30144-0.

S. Atallah, B. Bercot, V. Laurence, C. Hoffmann. Association of *Mycoplasma hominis* and head and neck cancer with unknown primary. 2020 Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 137(1):69-71.

N. Ngangro Ndeikoundam, D. Viriot, N. Fournet, C. Pioche, B. de Barbeyrac, A. Goubard, N. Dupin, B. Berçot, S. Fouéré, I. Alcaraz, M. Ohayon, N. Spenatto, C. Vernay-Vaisse, Referents For The Regional Offices Of The French National Public Health Agency, J. Pillonel, F. Lot. 2019. Bacterial sexually transmitted infections in France: recent trends and patients' characteristics in 2016. *Euro Surveill.* 24(5).

T. Poncin, M. Merimeche, A. Braille, M. Mainardis, C. Bébéar, H. Jacquier, B. Berçot. 2019. Two cases of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* related to travel in south-eastern Asia, France, June 2019. *Euro Surveill.* 24.

### Communications nationales

A. Braille, N. Schnepf, T. Poncin, P. Fernandes, C. Sevin, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. *Neisseria gonorrhoeae* : sensibilité aux fluoroquinolones sur échantillons cliniques. 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) Congrès français. 16-17 décembre, Paris, France. (Communication orale).

M. Mainardis, S. Trombert-Paolantoni, T. Poncin, A. Braille, S. Lastere, R. Theodose, J.F. Carod, C. Loreaux, P. Blanco, O. Belmonte, B. Rocquebert, N.N. Ndeikoundam, H. Jacquier, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. Prévalence et étude de la sensibilité de *Neisseria gonorrhoeae* dans les départements d'Outre-Mer français à partir d'échantillons cliniques (2017-2018). 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) Congrès français. 16-17 décembre, Paris, France. (Poster).

### Communications internationales

B. Berçot, I. Charreau, C. Rousseau, C. Delaugerre, C. Chidiac, G. Pialoux, C. Capitant, N. Bourgeois-Nicolaos, F. Raffi, S. Pereyre, E. Senneville, L. Meyer, C. Bébéar, J.-M. Molina. 2019. High prevalence and antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* in MSM on PrEP. 2019 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Seattle, USA. Poster.

H. M. Delagreverie, D. Rahib, I. Bichard, A. Gabassi, N. Guigue, M.-L. Chaix, B. Berçot, C. Delaugerre, N. Lydié. Expanding testing strategies in Paris: a free postal comprehensive STI test kit. Conference on retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Communication orale, 1-4 mars 2019, Seattle.

C. Bébéar, S. Pereyre, O. Peuchant, N. Schnepf, C. Laurier-Nadalié, A. Braille, A. Touati, T. Poncin, M. Gardette, M. MÉRIMÈCHE, B. de Barbeyrac, B. Berçot. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* and antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in urogenital infections in France (one week, 2017). Mini-oral eposter session., 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, 12-16 April 2019. (Mini-oral eposter session.)

A. Braille, N. Schnepf, T. Poncin, P. Fernandes, C. Sevin, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. Survey of *Neisseria gonorrhoeae* fluoroquinolone susceptibility by using the ResistancePlus@GC assay SpeeDX on clinical sample. International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. (Poster).

M. Mainardis, S. Trombert-Paolantoni, T. Poncin, A. Braille, S. Lastere, R. Theodose, J.F. Carod, C. Loreaux, P. Blanco, O. Belmonte, B. Rocquebert, N.N. Ndeikoundam, H. Jacquier, C. Bébéar, B. Berçot. 2019. Prevalence and survey of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility in French Overseas Departments on clinical samples (2017-2018). International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. (Poster).

D. Rahib, B. Berçot, H. Salord, M.N. Didelot, A. Touati, C. Bébéar, N. Lydié. 2019. Positivity for CT and GC in self-taken genital and extra-genital samples via free postal STI test kit in multipartner MSM. International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) Europe Congress. 5-7 septembre, Tallinn, Estonia. (Communication orale).

### Conférences sur invitations

B. Berçot. 2019. Epidémiologie et résistance des IST en 2018. Staff d'Immuno-infectiologie, Pr Salmon, Hôtel Dieu, 25 mai, Paris.

B. Berçot. 2019. Molecular epidemiology of  $\beta$ -lactamase resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in France. 3rd International Caparica Congress in Antibiotic Resistance. 12 Juin 2019.

B. Berçot. 2019. Quel risque de contagiosité pendant et au décours de traitement d'une IST? Journées d'échanges entre les CeGGID (JEEC2). COREVIH Ile de France Sud, 22 novembre. (Table ronde).

- J.-M. Molina. 2019. David Geffen School of Medicine - Pre-conference leadership meeting for CROI 2019. Post-exposure prophylaxis with doxycycline to prevent STIs in MSM. The ANRS Ipergay trial. Seattle, USA, March 3.
- J.-M. Molina. 2019. WHO STI and PrEP Think-Tank meeting. STI service delivery in PrEP users. March 14-15, Montreux Switzerland.
- J.-M. Molina. 2019. 29th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). Key-note lecture: Biomedical prophylaxis of HIV and other STIs: A change in paradigm? April 13-16, Amsterdam, Netherlands.
- J.-M. Molina. 2019. STIs in PrEP users: are we propelling the epidemic? 10<sup>th</sup> International AIDS Society Conference on HIV Science. July 21-24, Mexico City, Mexico.
- J.-M. Molina. IUSTI Europe Congress 2019. STIs in PrEP users: are we propelling the epidemic? September 5-7, Tallinn, Estonia.
- J.-M. Molina. 2019. II Reunion de Aspectos Clave en Infeccion por VIH/SIDA: STIs at historic highs. October 5, Barcelona Spain.
- J.-M. Molina. 2019. 17<sup>th</sup> European AIDS Conference. STIs in the era of PrEP and U=U. November 6-9, Basel, Switzerland

### 6.2.3 Laboratoire APHP Cochin

#### Publications internationales

Lampros A, Seta V, Gerhardt P, Isnard C, Husson C, Dupin N. J Am Acad Dermatol. 2020 Apr 24:S0190-9622(20)30705-2. doi: 10.1016/j.jaad.2020.04.089.

Dupin N. [HIV and other STI on the grill]. Ann Dermatol Venereol. 2019 Dec;146(12S):A3-A4. doi: 10.1016/j.annder.2019.09.593. Epub 2019 Oct 22

Sanchez A, Mayslish C, Malet I, Grange PA, Janier M, Saule J, Martinet P, Robert JL, Moulene D, Truchetet F, Pinault AL, Vermersch-Langlin A, Benhaddou N, Chanal J, Dupin N (2020). Surveillance of antibiotic resistance genes in *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* from patients with early syphilis in France. Acta Dermatol Venereol. In press

Garel B, Grange P, Benhaddou N, Schaub B, Desbois-Nogard N, Thouvenin M, Lepoutre X, Levy R, Navarro C, Charlier C, Ndeikoundam Ngangro N, Viriot D, Dupin N (2019). Congenital syphilis: A prospective study of 22 cases diagnosed by PCR. Ann Dermatol Venereol. 2019 Nov;146(11):696-703.

Grillová L, Oppelt J, Mikalová L, Nováková M, Giacani L, Niesnerová A, Noda AA, Mechaly AE, Pospíšilová P, Čejková D, Grange PA, Dupin N, Strnadel R, Chen M, Denham I, Arora N, Picardeau M, Weston C, Forsyth RA, Šmajš D (2019). Directly sequenced genomes of contemporary strains of syphilis reveal recombination-driven diversity in genes encoding predicted surface-exposed antigens. Front Microbiol. 2019 Jul 31;10:1691.

Ndeikoundam Ngangro N, Viriot D, Fournet N, Pioche C, de Barbeyrac B, Goubard A, Dupin N, Berçot B, Fouéré S, Alcaraz I, Ohayon M, Spenatto N, Vernay-Vaisse C, Pillonel J, Lot F; Referents for the regional offices of the French national public health agency (2019). Bacterial sexually transmitted infections in France: recent trends and patients' characteristics in 2016. Euro Surveill. Jan 24. doi: 10.2807/1560-7917.

Nageau A, Rodriguez-Régent C, Dion J, Dupin N, Mouthon L, Le Jeunne C, Régent A (2018). Treatment of syphilis associated cerebral vasculitis : Reappearance of an old question. Am J Med. Dec 131(12):1516-1519.

## Publications nationales

Sanchez A, Del Giudice P, Peneau A, Grange P, Dupin N, Hubiche T (2019). Une syphilis « précoce » Ann Dermatol Venereol <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.10.032>  
N. Benhaddou. « Syphilis Congénitale », Revue Francophone des laboratoires, février 2019.

## Communications nationales

Samaran R, Bernier C, Grange P, Denis-Musquer M, de Bataille S. Tréponématose non vénérienne de type bégel chez une migrante révélée par des nodules dermo-hypodermiques chroniques des membres inférieurs. JDP 2019, Paris.

Bourgeois G, Grange P, Saint-Pastou Terrier C, Koumar Y, Zemali N, Manaquin R, Poubeau P, Jaubert J, Dupin N, Bertolotti A. Résistance à l'azythromycine de *Treponema pallidum* à La Réunion. JDP 2019, Paris.

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

Le CNR IST bactériennes n'est pas concerné.

## **8 Programme d'activité pour les années suivantes**

### **8.1 Evaluation de trousse diagnostiques**

#### **8.1.1 Evaluation de plaques à façon pour la détermination de CMI pour les mycoplasmes urogénitaux**

En collaboration avec le CNR des Légionelles, Hospices Civils de Lyon, nous avons élaboré une plaque à façon destinée à la **détermination des CMI en milieu liquide par microdilution** pour les mycoplasmes et les légionelles. Ces plaques sont fabriquées par la société Biocentric (Bruker).

En ce qui concerne le CNR des IST, les antibiotiques et les concentrations ont été sélectionnés pour réaliser des CMI chez *M. hominis* et chez *Ureaplasma* spp., en tenant compte des concentrations critiques fournies pour ces bactéries par le CLSI et des molécules utilisées pour le traitement.

Les antibiotiques suivants sont intégrés :

#### Tétracyclines

- Tétracycline (0,031-16 µg/ml)
- Doxycycline (0,015-16 µg/ml)

#### Macrolides et apparentés

- Erythromycine (0,015-16 µg/ml)
- Azithromycine (0,07-16 µg/ml)
- Télithromycine (0,003-8 µg/ml)

#### Fluoroquinolones

- Lévofoxacine (0,0019-4 µg/ml)
- Moxifloxacine (0,003-8 µg/ml)

La rifampicine, naturellement inactive chez les mycoplasmes, a été intégrée pour les besoins du CNR des légionelles. Le milieu de culture Shepard est utilisé pour les uréaplasmes et le milieu Hayflick arginine pour *M. hominis*. L'inoculation des puits de la plaque est réalisée à l'aide de 100 µl de souche préalablement calibrée à 10<sup>4</sup> UCC/ml à l'exception du témoin négatif qui doit être inoculé avec 100 µl de milieu stérile.

Plan de plaque :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DOX 0.015	DOX 0.031	DOX 0.062	DOX 0.125	DOX 0.25	DOX 0.5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	T+
B	TET 0.031	TET 0.062	TET 0.125	TET 0.25	TET 0.5	TET 1	TET 2	TET 4	TET 8	TET 16	RAM 4	T-
C	CLI 0.015	CLI 0.031	CLI 0.062	CLI 0.125	CLI 0.25	CLI 0.5	CLI 1	CLI 2	CLI 4	RAM 0.0019	RAM 0.0039	RAM 0.25
D	TEL 0.003	TEL 0.007	TEL 0.015	TEL 0.031	TEL 0.062	TEL 0.125	TEL 0.25	TEL 0.5	TEL 1	TEL 2	TEL 4	TEL 8
E	MOX 0.003	MOX 0.007	MOX 0.015	MOX 0.031	MOX 0.062	MOX 0.125	MOX 0.25	MOX 0.5	MOX 1	MOX 2	MOX 4	MOX 8
F	LEV 0.0019	LEV 0.003	LEV 0.007	LEV 0.015	LEV 0.031	LEV 0.062	LEV 0.125	LEV 0.25	LEV 0.5	LEV 1	LEV 2	LEV 4
G	ERY 0.015	ERY 0.031	ERY 0.062	ERY 0.125	ERY 0.25	ERY 0.5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	ERY 8	ERY 16	LEV 8
H	AZM 0.007	AZM 0.015	AZM 0.031	AZM 0.062	AZM 0.125	AZM 0.25	AZM 0.5	AZM 1	AZM 2	AZM 4	AZM 8	AZM 16

Dox=Doxycycline ; TET=Tétracycline ; RAM= Rifampicine ; CLI=Clindamycine ; TEL=Télithromycine ; MOX=Moxifloxacine ; LEV=Lévofloxacine ; ERY=Erythromycine ; AZM=Azythromycine ; T+=Témoins positifs ; T-=Témoins négatifs / Concentration en mg/L.

Nous avons testé les souches de références *M. hominis* PG21, *U. parvum* S3 et *U. urealyticum* S8 et les résultats obtenus sont conformes à ceux attendus par le CLSI. Des tests plus complets vont être entrepris, avec notamment la comparaison entre la méthode de référence du CLSI et la méthode utilisant les plaques sur 10 souches de *U. parvum*, 10 souches de *U. urealyticum* et 10 souches de *M. hominis*. Les plaques seront ensuite utilisées pour déterminer les CMI des souches obtenues en subculture des échantillons positifs à *Ureaplasma* spp et/ou *M. hominis* de l'enquête MYCOMET 2019.

### 8.1.2 Evaluation de la trousse CT/NG/MG/TV de Abbott sur l'Allinity (Saint-Louis)

Le laboratoire de St Louis évaluera la trousse CT/NG/MG/TV sur l'Allinity m (Abbott) versus les trousse CT/NG et MG/TV sur le Cobas 6800 (Roche) à partir de collection d'échantillons négatifs et positifs pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*. Pour cette étude comparative rétrospective, nous envisageons d'inclure 600 échantillons dont 100 prélèvements rectaux détectés positifs à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, 100 prélèvements pharyngés détectés positifs à *N. gonorrhoeae* et 30 1<sup>ers</sup> jets d'urine détectés positifs à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* entre janvier et juillet 2020 au CNR des IST bactériennes. Des contrôles négatifs correspondant à chaque type d'échantillon seront testés en parallèle.

### 8.1.3 Evaluation de trois nouvelles trousse commerciales pour le diagnostic de *M. genitalium* et de la résistance aux macrolides

Pour cette étude comparative rétrospective, nous envisageons d'inclure 250 échantillons testés pour la présence de *M. genitalium* (100 négatifs et 150 positifs) entre avril et décembre 2019 au CNR des IST bactériennes. Les échantillons d'urine, urogénitaux et rectaux conservés à -80°C seront inclus s'il s'agit d'échantillons primaires, collectés en UTM ou dans le milieu Cobas PCR media et si le volume disponible est  $\geq 1,5$  ml.

L'ADN de ces échantillons sera extrait avec le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume sur l'instrument MagNa Pure 96 (Roche) après ajout du contrôle interne IC2 (Seegene) dans les urines. Dans un premier temps, les extraits d'ADN seront soumis à la PCR Taqman de détection de *M. genitalium* (Jensen *et al.* J. Clin. Microbiol. 2004) et les échantillons positifs seront soumis à l'amplification et au séquençage de l'ARNr 23S (Touati *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014) qui serviront de méthodes de référence.

Trois kits de détection de *M. genitalium* et des mutations associées à la résistance aux macrolides seront testés :

- le kit **Allplex™ MG&AziR assay (Seegene) réalisé sur le CFX96™ real-time PCR system (Bio-Rad)**. Ce kit détecte *M. genitalium* et six mutations associées à la résistance aux macrolides (A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C, A2059T, numérotation *E. coli*).

- le kit **Macrolide-R/MG ELITE MGB® kit réalisé sur l'ELITE InGenius® (ELITechGroup)**. Ce kit permet de détecter *M. genitalium* (gène de l'ARN 23S) et cinq mutations associées à la résistance aux macrolides (A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C, numérotation *E. coli*).

- le kit **ResistancePlus® MG FleXible (SpeeDx) réalisé avec le GeneXpert (Cepheid)**. Ce kit permet de détecter *M. genitalium* (gène de l'adhésine MgPa) and quatre mutations associées à la résistance aux macrolides (A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, numérotation *E. coli*).

Les deux derniers kits sont des systèmes entièrement automatisés « tout en un » qui réalisent l'extraction d'ADN et l'amplification à partir des prélèvements. Les performances cliniques de sensibilité et de spécificité de la détection de *M. genitalium* et des mutations associées à la résistance seront évaluées par rapport aux méthodes de référence.

## **8.2 Prévention combinée des IST chez les hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes utilisant le TDF/FTC par voie orale pour la prophylaxie pré-exposition for HIV (PrEP)-ANRS 174 Doxyvac**

L'**essai ANRS Prévenir** coordonné par J.-M. Molina a permis l'inclusion de 3000 HSH pour lesquels ont été observés les effets à long terme de la PrEP sur des populations très exposées et les conséquences de l'utilisation de la PrEP à 3 ans sur l'incidence du VIH en région parisienne. Elle a démarré en mai 2017.

L'**étude DOXYVAC ANRS174**, étude ancillaire de l'étude Prévenir, est un essai clinique qui rentre dans le cadre de la cohorte Prévenir portée par l'ANRS en collaboration avec le CNR des IST bactériennes, l'Inserm et l'Institut Pasteur. Il s'agit d'une étude multicentrique, randomisée, en ouvert qui vise à une prévention combinée des IST chez les HSH utilisant le TDF/FTC par voie orale pour la PrEP. Cette étude a deux objectifs principaux : (i) démontrer que la PEP avec la doxycycline réduit la survenue d'un premier épisode de syphilis ou d'infection par *C. trachomatis* et (ii) démontrer que la vaccination contre le méningocoque B réduit la survenue d'un premier épisode d'infection par *N. gonorrhoeae*.

La méthodologie repose sur une randomisation pour deux interventions biomédicales :

- **Intervention 1** : PEP avec doxycycline ou absence de PEP. Les participants seront randomisés, dans la proportion 2/1, pour recevoir de la PEP avec doxycycline ou pas de PEP.
- **Intervention 2** : vaccin contre le méningocoque B (Bexsero®) ou absence de vaccin.

Le démarrage initialement prévu au premier trimestre 2020 a été reportée à septembre en raison de l'épidémie COVID-19.

**La cohorte sera composée de 720 patients recevant (i) soit une prophylaxie par doxycycline (ii), soit un placebo (iii), soit une vaccination pour le méningocoque (Bexsero, GSK) (iv), soit une incitation à l'utilisation du préservatif.** Les patients seront suivis sur 2 ans.

Les tests de dépistage des 3 IST bactériennes seront centralisés à Saint-Louis sous la responsabilité de B. Berçot au CNR des IST bactériennes. Environ 25 000 échantillons seront réalisés pour le diagnostic de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* par PCR (écouvillons oral, anal et 1<sup>er</sup> jet d'urine) et 25 000 échantillons pour culture de gonocoque et méningocoque sur 9 points de visites (cf. ci-dessous pour le circuit clinique et la méthodologie). Des PCR syphilis seront réalisées au CNR AHPH Cochin à partir des ulcères génitaux ou oraux.

Un financement par l'ANRS a été obtenu fin 2018 et le CNR IST bactériennes a obtenu un soutien de 200 k€ de la compagnie Roche pour le screening CT/NG/MG pour la cohorte de 720 patients inclus suivis sur 2 ans. Les études réalisées au sein des laboratoires du CNR seront financées sur leurs budgets propres.

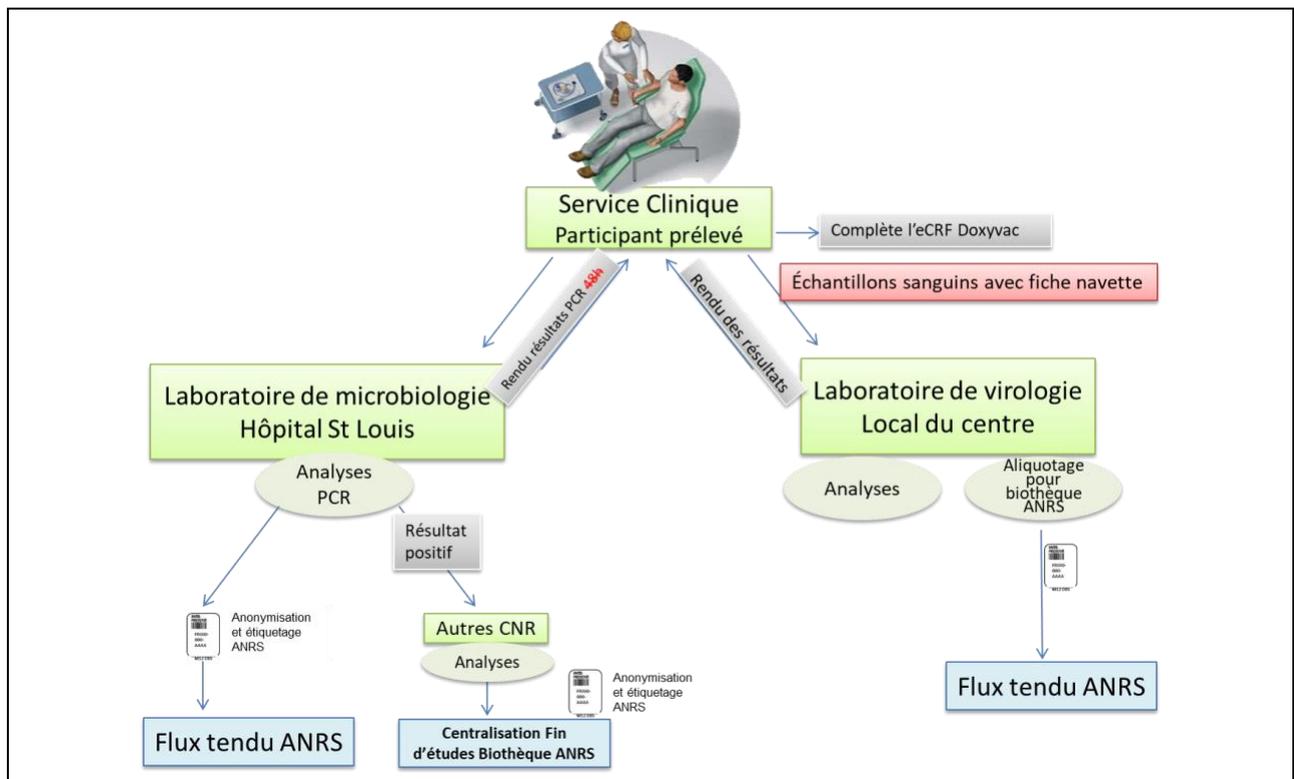


Figure. Circuit des visites, retour des résultats, envoi CNR et flux tendu ANRS dans l'étude ANRS174 Doxyvac

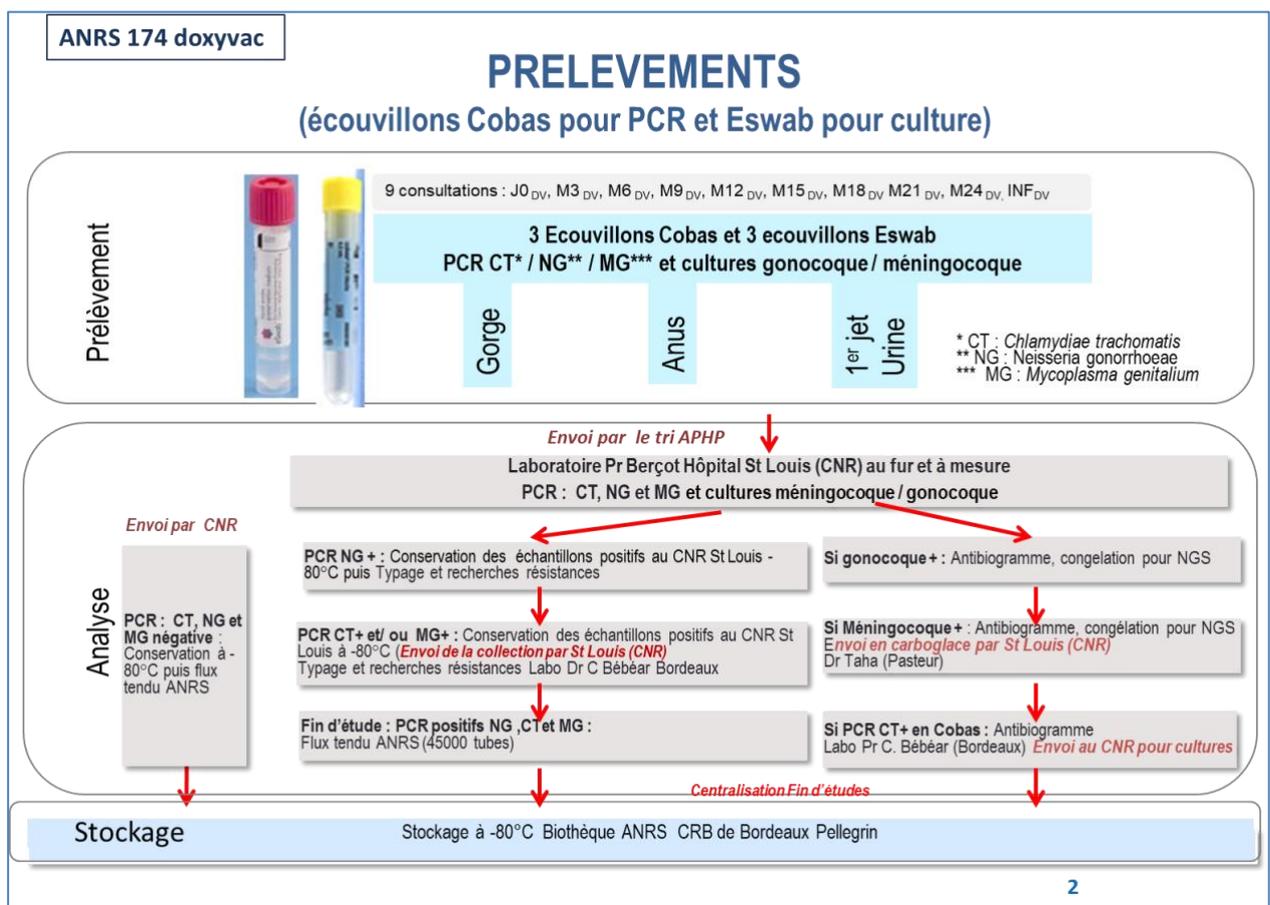


Figure. Circuit des prélèvements de l'étude ANRS174 Doxyvac CNR et flux tendu ANRS

Les 3 laboratoires du CNR IST bactériennes sont impliqués dans l'investigation de la résistance à la doxycycline des agents pathogènes dont nous avons l'expertise. Les CMI des tétracyclines et de l'azithromycine seront déterminées pour les souches de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* isolées en culture. Les mécanismes moléculaires de la résistance aux tétracyclines seront investigués pour *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae* et *T. pallidum*. La

résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones sera également déterminée pour les échantillons positifs à *M. genitalium* (CHU Bordeaux) dans cette population de PrEPeurs. Une recherche de résistance aux antibiotiques incluant notamment les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, les macrolides et les fluoroquinolones sera réalisée pour les échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* (APHP Saint Louis). Les souches de méningocoques seront expertisées au CNR des méningocoques de l'institut Pasteur.

Ce travail complémentaire du CNR des IST bactériennes permettra de répondre aux **objectifs secondaires** qui seront :

Pour la PEP :

- Démontrer que la PEP avec la doxycycline réduit la survenue d'un premier épisode d'IST bactérienne, les épisodes cumulés des IST bactériennes, d'un nouvel épisode de gonorrhée anale ou urinaire, d'un premier épisode de gonorrhée ou d'infection à *Chlamydia* symptomatique aux sites anaux et urinaires.
- Evaluer l'impact de la doxycycline en PEP sur le microbiote humain sur un échantillon de 30 patients dans le centre de l'Hôpital Saint-Louis (20 participants dans le bras doxycycline, 10 participants dans le bras ne présentant pas d'intervention).

Pour les résistances :

- Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. pallidum* dans les deux bras (doxycycline versus pas de doxycycline).
- Comparer le résistome et la clonalité des souches de *N. gonorrhoeae* par NGS avec ou sans doxycycline.

Pour le vaccin :

- Démontrer que le vaccin contre le méningocoque B (Bexsero®) diminue la survenue d'épisodes cumulés de gonorrhée, d'un premier épisode de gonorrhée aux sites anaux et urinaires ou symptomatique aux sites anaux et urinaires.
- Evaluer la prévalence et l'incidence du portage du méningocoque au niveau pharyngé, anal et urinaire.
- Evaluer l'impact de la vaccination et de la prophylaxie des IST par doxycycline sur le portage de méningocoque au niveau pharyngé, anal et urinaire.

Ce projet aura également pour objectif l'élaboration de recommandations sur la nécessité de rechercher CT/NG/MG dans les 3 sites (anus, gorge, urine) de patients HSH symptomatiques ou asymptomatiques.

### **8.3 Prévalence des infections à HPV et des IST bactériennes chez des femmes HIV-positives et HIV-négatives au Mali.**

Il s'agit d'une collaboration entre l'équipe de Vincent Calvez et Anne-Geneviève Marcellin, unité INSERM iPLESP, Sorbonne Université et APHP Pitié-Salpêtrière, au sein de **l'AC 43 de l'ANRS** et le CNR IST. Cette étude cross-sectionnelle vise à déterminer la prévalence des infections à HPV, à HSV et des IST bactériennes (*C. trachomatis*, *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae*) et de *T. vaginalis* dans une population de 44 femmes HIV-positives et de 96 femmes HIV-négatives à Sikasso, au Mali. Les 3 IST bactériennes seront diagnostiquées par le kit Allplex STI Essential Assay (Seegene®) à partir d'échantillons cervicaux. Les échantillons positifs à *M. genitalium* et à *N. gonorrhoeae* seront envoyés au CNR à Bordeaux et à Saint-Louis pour recherche de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones pour *M. genitalium* et aux bêta-lactamines et aux fluoroquinolones pour le gonocoque.

### **8.4 Prévalence et suivi longitudinal sur 2 ans des lésions anales dysplasiques, des infections HPV et des infections sexuellement transmissibles associées, chez les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes à Lomé, Togo.**

Ce projet a été accepté pour financement à l'ANRS fin 2018 ; il est coordonné par Charlotte Charpentier, Didier Ekvoueri et 8 équipes dont le CNR des IST bactériennes (Bdx, St Louis). **Les objectifs du projet** sont les suivants :

- Estimer la prévalence et l'incidence des IST associées : *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis* et HSV-2 en fonction du statut VIH
- Décrire les génovars de *C. trachomatis* circulant dans cette population
- Estimer la prévalence et décrire les profils de résistance aux antibiotiques du gonocoque et de *M. genitalium* en fonction du statut VIH
- Estimer la prévalence de la syphilis, des hépatites B et C

Deux cent HSH seront recrutés et auront des visites avec réalisation de prélèvements à l'inclusion (M0) puis à M12 et à M24. Le recrutement doit commencer au 1<sup>er</sup> trimestre 2020 mais sera probablement impacté par la crise sanitaire COVID-19.

## 8.5 Constitution d'un groupe de travail IST auprès de l'ANRS

En 2019, François Dabis, directeur de l'ANRS, a demandé à Nathalie Bajos, Cécile Bébéar, Vincent Calvez, Didier Ekvoueri et Jean-Michel Molina de constituer un groupe de préfiguration ANRS-IST pour répondre aux questions suivantes :

- Quel est le réseau actuel des chercheurs travaillant sur les IST en France et dans nos pays partenaires ?  
Comment peut-on envisager la structuration et l'évolution d'un tel réseau ?
- Comment est financée cette recherche en France et dans des pays comparables ?
- Quel est le positionnement actuel de la recherche française sur ce thème par rapport aux pays comparables ?  
Des interactions ou rapprochements seraient-ils envisageables et pertinents avec certains d'entre eux ?
- Si l'opportunité de travailler dans ce domaine était confirmée pour l'ANRS, quelles devraient être selon vous, les modalités d'organisation (animation scientifique, financement, priorités...)?

**Un rapport a été rendu à l'ANRS** en mai 2019, Cécile Bébéar et Didier Ekouevi ont présenté les conclusions de ce rapport à la réunion annuelle du Scientific Advisory Board de l'ANRS le 17 septembre 2019. **Un séminaire de recherche sur les IST** réunissant une centaine de personnes, biologistes, cliniciens, épidémiologistes, chercheurs en Santé publique et en Science sociales, a été organisé par le groupe de préfiguration et l'ANRS les 21-22 janvier 2020. Le but de ce séminaire est d'identifier les études en cours et les recherches à prioriser en terme de dépistage et diagnostic des IST, d'études épidémiologiques, d'études thérapeutiques et de prévention des IST en ciblant des populations à haut risque d'IST (personnes vivant avec le VIH, HSH, PrEPeurs, travailleuses du sexe, hétérosexuels, transsexuels, migrants) vivant au Nord et au Sud.

Dans ce cadre, C. Bébéar a coordonné le dépôt d'une **lettre d'intention à l'AMI ANR « Résistance aux antibiotiques »** le 15 mai 2020 sur un projet de recherche appelé « RESIST » sur la résistance aux antibiotiques des bactéries responsables d'IST bactériennes impliquant les 3 équipes du CNR IST, les équipes de J.-M Molina, S. Fouéré, D. Costagliola et B. Spire.

## 8.6 Enquête PreVISt

L'enquête PreVISt, placée sous la responsabilité conjointe de Santé publique France, de l'Inserm, du CNR des IST bactériennes et du CNR des papillomavirus, consiste en un **volet biologique concernant les IST**, qui sera couplé à la prochaine enquête **Sexualités et Santé sexuelle (E3S)** en cours d'élaboration par une équipe de chercheurs sous la responsabilité de Nathalie Bajos (socio-démographe à l'unité 1018 de l'INSERM/CESP). L'étude qui devait démarrer au second semestre 2020 sera probablement reportée en 2021 en raison de la crise sanitaire actuelle.

**E3S** prévoit d'inclure un échantillon aléatoire de 40 000 personnes de 15 à 89 ans (30 000 en métropole et 10 000 en Martinique, Guadeloupe, Guyane et La Réunion), et de les interroger par téléphone sur de nombreux déterminants de santé. L'objectif est d'analyser les évolutions temporelles dans le champ de la sexualité et de la santé sexuelle, en lien avec les changements sociétaux et les politiques publiques. Le coût de cette enquête (sans le volet IST) a été estimé à environ 3,1 millions d'euros. Une demande de financement a été déposée à l'ANRS et des co-financements ont été demandés à d'autres structures.

Le principe du **volet IST** est de proposer à un sous-échantillon des participants de l'enquête E3S un dépistage par auto-prélèvement à domicile de 3 IST bactériennes (infections à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*) chez les 15-59 ans et de l'HPV chez les 15-29 ans. Les objectifs de ce volet sont de disposer de données i) de **prévalence en lien avec les comportements sexuels et les pratiques de dépistage**, ii) de **résistance (*N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*)**, iii) **d'efficacité de la vaccination HPV chez les femmes** et iv) de **référence chez les hommes avant la mise en œuvre de la vaccination HPV des adolescents garçons**. En termes de prévention, ces données seront utiles pour mieux cibler les populations concernées par les IST bactériennes et non dépistées, et contribuer à promouvoir la vaccination contre les infections à HPV. Le diagnostic des 3 IST bactériennes sera réalisé par le CNR IST à Bordeaux pour environ neuf mille échantillons (autoécouvillons vaginaux pour les femmes et 1<sup>ers</sup> jets d'urine pour les hommes). Une recherche de résistance aux antibiotiques sera réalisée pour les échantillons positifs à *M. genitalium*

(CHU Bordeaux) et à *N. gonorrhoeae* (APHP Saint-Louis).

## 8.7 Laboratoire CHU de Bordeaux

### - Evolution du réseau des anorectites à *C. trachomatis*

Dans le cadre du réseau de surveillance de la LGV, en raison d'une charge de travail trop importante nous avons, depuis janvier 2019, limité la surveillance :

- à tous les patients séropositifs pour le VIH, symptomatiques ou non,
- et aux patients séronégatifs pour le VIH, uniquement symptomatiques.

Les biais de sélection induits par ces critères ne nous permettent plus de suivre les tendances épidémiologiques de cette infection. De plus, des trousse commercialisées marquées CE-IVD pour le diagnostic des souches de *C. trachomatis* de génovar L viennent d'être évaluées au CNR et mettent le diagnostic de la LGV à disposition des laboratoires privés et hospitaliers. De fait, le diagnostic de la LGV ne devrait plus rentrer dans les missions du CNR des IST bactériennes à partir de 2021. Les laboratoires et cliniciens du réseau ont été informés de cette évolution fin 2019 lors de l'envoi du poster annuel. Cependant, compte-tenu de la crise sanitaire actuelle, le timing de cette évolution sera probablement revu.

Une réunion a été organisée le 22 janvier 2020 entre le CNR IST et ses correspondants de Santé publique France, Florence Lot et Ndeindo Ndeikoundam, pour envisager l'évolution de ce réseau compte-tenu de ces données. Il a été ainsi décidé que **le CNR mette en place l'enquête Anachla qui consistera à collecter tous les échantillons positifs à *C. trachomatis*, sans critère d'exclusion.** Cette enquête, initialement prévue d'avril à juin 2020, sera reportée à septembre en raison de l'épidémie COVID-19. La fiche de renseignements cliniques pour cette enquête a été revue avec Santé publique France.

### - Enquêtes annuelles de surveillance de la résistance des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques

Les enquêtes de surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones et de la surveillance de la sensibilité de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* aux 3 classes d'antibiotiques actives seront menées en France comme les 2 années précédentes. Compte-tenu de la crise sanitaire COVID-19 et de la faible résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolone en outre-mer, nous ne renouvelerons pas pour l'année à venir l'enquête DROM 2020. Cette enquête sera probablement reprise en 2021.

Une coordination sera faite avec le laboratoire associé gonocoque de Saint-Louis pour un lancement concomitant des enquêtes mycoplasmes et gonocoque en 2020.

### - Transfert de résistance aux antibiotiques par conjugaison chez *M. hominis*

L'objectif de ce projet de Master 2 recherche est de découvrir si les **éléments génétiques mobiles intégratifs et conjugatifs (ICE)** récemment découverts chez *M. hominis* (Meygret et al. *Frontiers in Microbiology*, 2019) sont **fonctionnels**, c'est à dire s'ils sont capables de conjugaison entre deux cellules bactériennes.

Pour cela, deux souches de *M. hominis*, l'une portant un ICE et l'autre n'en portant pas, seront mises en présence et des conjuguants seront recherchés après plusieurs heures de contact. Différents gènes de résistance aux antibiotiques permettront de marquer et de tracer les souches en présence. Des expériences de conjugaisons entre *M. hominis* et *M. agalactiae*, mycoplasme infectant les animaux ruminants seront aussi tentées, en collaboration avec C. Citti, UMR 1225, ENVT Toulouse. En effet, *M. agalactiae* est une espèce phylogénétiquement proche de *M. hominis*, pour laquelle la capacité de conjugaison grâce aux ICEs a été démontrée.

La conjugaison pouvant être possible seulement chez certaines souches, plusieurs souches d'origine clinique issues de la collection du CNR ou obtenues *in vitro* par transformation seront utilisées dans les différentes tentatives. Les conjuguants obtenus seront caractérisés par PCR ciblant les gènes de résistance aux antibiotiques puis par séquençage complet du génome. Une comparaison de la séquence du génome des conjuguants et des souches parentales sera effectuée pour notamment déterminer la taille et la position des fragments transférés. La fréquence de conjugaison sera aussi calculée dans chaque cas de figure.

### - Etude moléculaire du gène *ompA* des échantillons positifs pour une souche *C. trachomatis* L de HSH

En juin 2019, une alerte a été publiée par le Portugal à propos de cas LGV causés par une souche de *C. trachomatis* L recombinante. En effet, depuis 2017, 25 cas de LGV affectant principalement des HSH VIH-positifs, ont été causés par une souche de génovar L recombinante présentant une séquence *ompA* hybride L2-L2b / D-Da et une séquence *pmpH* de génovar L. Bien qu'identifiées comme de génovar L par les techniques classiques, le génotypage du gène *ompA* de ces souches les a placées phylogénétiquement parmi les génovars D/Da. L'analyse du génome entier a révélé une structure du génome chimérique due au transfert par recombinaison du gène *ompA* et de quatre gènes voisins d'une souche de génovar D/Da à une souche de génovar L.

En raison du risque potentiel de propagation internationale de cette souche recombinante, le CNR souhaite comparer la séquence du gène *ompA* de toutes les souches de *C. trachomatis* isolées de HSH VIH-positifs en 2018 et identifiées de génovar L par la PCR en temps réel ciblant la *PmpH*, à la séquence *ompA* hybride L2-L2b / D-Da décrite et avec les séquences L2, L2b et L2b variants disponibles dans GenBank.

## 8.8 Laboratoire APHP Saint-Louis

### - Enquêtes annuelles de surveillance de la résistance du gonocoque aux antibiotiques

Les enquêtes de surveillance de la résistance aux antibiotiques ENGON proposées aux laboratoires participant déjà et tous les laboratoires réalisant des CMI seront menées en France comme les 2 années précédentes. Quarante-huit laboratoires répartis sur le territoire ont participé en 2019. En 2020, il pourra être proposé aux laboratoires réalisant les CMI de fournir des données de CMI de la ceftriaxone, céfixime, azithromycine et tétracycline afin de réaliser un contrôle qualité national pour la détermination de ce paramètre. Cette demande est couplée au recueil de données épidémiologiques afin de relier les formes cliniques aux CMI. Les souches sont séquencées en NGS et une analyse des 3 années de recueil sera effectuée pour publication. L'analyse statistique des données sera travaillée en collaboration avec Santé publique France (N. Ndeikoundam et D. Viriot).

Une coordination a été faite avec le laboratoire de Bordeaux pour un lancement concomitant des enquêtes ciblant les mycoplasmes et le gonocoque en 2020.

### - Développement d'une nouvelle technique de Séquençage Haut Débit (NGS, capture) à partir des prélèvements pour la détection du gonocoque

Les infections à gonocoques sont de plus en plus diagnostiquées par PCR au détriment de la culture dont la sensibilité est faible pour les prélèvements extragénitaux. De plus, les données obtenues dans les premières investigations menées sur les prélèvements (patients des DROM, étude Remind-Mémodépistages, étude Ipergay) permettent d'obtenir une partie du résistome de la souche et/ou le typage moléculaire par PCR et séquençage Sanger. L'exploration par ces techniques de typage sur échantillon primaire reste cependant limitée par la quantité d'ADN disponible pour l'amplification.

En cas d'échantillon clinique positif en PCR, avec une souche de gonocoque non cultivable (faible charge bactérienne, contamination par la flore commensale, prise récente d'antibiotique), nous souhaitons **développer une technique de capture d'ADN avec enrichissement de la quantité d'ADN qui sera couplée à du NGS (NGS basée sur la capture/hybridation)**. A partir de l'échantillon clinique primaire (1<sup>er</sup> jet d'urine, écouvillon pharyngé, anal, vaginal), le processus d'enrichissement en ADN passe par une étape d'hybridation de l'ADN du gonocoque (grâce à des sondes préalablement définies), un lavage et élution de l'ADN non hybridé (théoriquement non homologue au génome du gonocoque). L'ADN hybridé est ensuite amplifié et séquencé par NGS. Des résultats encourageants montrent que cette technique (commercialisée initialement pour de l'exome humain) est adaptable aux génomes bactériens (déjà évalué pour *Mycobacterium tuberculosis* dans des crachats, *C. trachomatis* dans des auto-prélèvements vaginaux, *Neisseria meningitidis* dans du liquide cébrospinal).

- La première phase consistera en une comparaison de méthodes entre la technique de NGS sur colonies cultivées (référence, soumise à un contrôle de qualité EQAS, de l'ECDC) versus la technique NGS par capture/hybridation directement sur l'échantillon clinique natif. La comparaison de méthode concernera des prélèvements cliniques positifs en culture. L'évaluation des performances (sensibilité, spécificité analytiques), de la limite de détection, l'évaluation du risque de contamination des données par de l'ADN d'espèces de *Neisseria* spp. proches de *N. gonorrhoeae* seront au cœur de cette première phase d'évaluation.

- La phase d'application de la technique aura pour objectif de faire du typage moléculaire en routine au CNR sur des prélèvements cliniques positifs à gonocoque en PCR lorsque la souche est non cultivable. La technique aura une

réelle valeur ajoutée afin d'assurer une activité de typage des souches (suivi de clones résistants, contact tracing) en s'affranchissant du défaut de sensibilité de la culture. Ces travaux seront également utiles pour développer cette approche au CNR IST pour les autres bactéries responsables d'IST peu ou difficilement cultivables que sont *C. trachomatis*, *M. genitalium* et *T. pallidum*.

Ces travaux feront l'objet d'une partie du **doctorat de Thibaut Poncin** (Ecole doctorale Bio-USCP, équipe d'accueil IAME, laboratoire de l'Hôpital St Louis).

#### **- Etude de la clairance du portage pharyngé asymptomatique de *N. gonorrhoeae* avec ou sans traitement par ceftriaxone : étude randomisée de non infériorité**

Projet en collaboration avec l'équipe d'infectiologie de l'hôpital Saint-Louis (Claire Pintado, J.-M. Molina), des centres investigateurs et le CNR des IST bactériennes (expertise gonocoque).

Dans l'objectif d'épargner les antibiotiques et de limiter l'émergence de résistances, plusieurs équipes se sont intéressées à la clairance spontanée (sans traitement) du gonocoque. Deux études basées sur les cultures ont montré une clairance spontanée du gonocoque pharyngé respectivement de 55% à 7 jours et de 100% à 3 mois. Deux études rétrospectives basées sur les tests d'amplification des acides nucléiques ont mis en évidence une clairance spontanée de *N. gonorrhoeae* respectivement de 27% sur un temps médian de 11 jours [4-31 jours] et de 31,5% à 15 jours. Cependant, ces études pour la plupart rétrospectives avec un suivi inférieur à 15 jours ou sur de faibles effectifs, ne permettent pas de proposer des recommandations pour épargner les antibiotiques dans le traitement des gonocoques pharyngés asymptomatiques et ne renseignent pas sur la transmission aux partenaires. De fait, en raison des données préoccupantes d'émergence de gonocoques multirésistants et pour réduire le risque théorique de transmission, les recommandations restent de traiter systématiquement ces infections par ceftriaxone, y compris les localisations pharyngées asymptomatiques.

Ce travail est proposé dans le cadre d'une **étude prospective, randomisée, de non-infériorité, évaluant à 3 mois la clairance spontanée comparée à la clairance après ceftriaxone chez des porteurs asymptomatiques d'un gonocoque pharyngé**. L'impact sur le microbiote, la recontamination et la transmission du gonocoque aux partenaires sera évaluée. Une lettre d'intention a été déposée au PHRC national 2020 et a été retenue. Le dossier complet est en cours de rédaction pour dépôt.

#### **- Enquête TRUST ANRS**

Cette étude ANRS est une enquête par échantillonnage déterminé selon les répondants (RDS) chez des jeunes (18-25 ans) HSH entrés dans les programmes de prévention combinée, dont la PrEP. L'objectif de cette étude est de **caractériser la population des jeunes HSH pour leur risque d'infection par le VIH, leurs pratiques, leurs réseaux sexuels et de socialisation et faciliter leur entrée dans les programmes de prévention combinée, dont la PrEP**. Il est attendu 500 participants inclus dans les centres parisiens de Tenon, Saint-Louis et le Check Point Paris pour pouvoir détecter une prévalence de l'infection par le VIH allant de 3 à 10%.

Dans les objectifs secondaires, il est prévu d'estimer la prévalence de l'infection à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* et de centraliser à l'hôpital St Louis les PCR positives à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Une culture à la recherche du gonocoque sera réalisée si la PCR est positive. Les échantillons positifs en PCR seront conservés au niveau du laboratoire de St Louis pour une expertise secondaire (recherche de résistance sur prélèvements pour les PCR positives à gonocoque).

#### **- Etude des présentations particulières d'anorectites abcédées à gonocoque**

Depuis 2017, des présentations très particulières d'anorectites d'emblée abcédées et très difficiles à traiter a été observée par l'équipe de l'Institut de proctologie de Léopold Bellan (GH Paris - St Joseph). Dans certains cas, le recours à la chirurgie s'avère nécessaire. Dans cette cohorte, il a été retrouvé en bactériologie classique et/ou PCR **uniquement la présence de gonocoque** et l'absence de *C. trachomatis*.

**Une cohorte prospective est en cours** depuis janvier 2019 et 10 patients symptomatiques ont été inclus. Les résultats de NGS ont été réalisés en juin 2020 et seront comparés à ceux réalisés pour des souches virulentes et des souches de portage circulantes en France en 2019 (cf. chapitre 3.2.2.2). Des données clinico-biologiques recueillies et les résultats des génomes seront travaillés avec Alban Lemonier et les médecins du centre de proctologie. Les facteurs pouvant être impliqués dans leur virulence seront également recherchés.

## 8.9 Laboratoire APHP Cochin

### - Etude CyBale (Congenital Syphilis in Babies: Long term Evaluation)

#### Contexte

Le contexte actuel est marqué par une recrudescence des cas de syphilis, qui implique principalement les patients masculins HSH mais aussi les femmes en Europe dont la France et aux Etats Unis. Parmi elles, des femmes enceintes échappent au dépistage. Le CNR associé syphilis a ainsi compilé en 2017 huit alertes syphilis congénitales chez des enfants de 1 à 39 jours, dont 3 en Ile-de-France et un dans les DROM. Les conséquences de l'infection chez le nouveau-né ont été étudiées dans des séries rétrospectives qui soulignent la gravité de l'infection pendant la grossesse, avec 80% d'issues défavorables (pertes fœtales, infections congénitales de révélation précoce ou retardée).

De nombreux points restent à élucider :

#### - Physiopathologiques :

Les mécanismes mis en jeu dans la traversée de la barrière placentaire par *T. pallidum* et dans la genèse de l'infection fœtale ne sont pas élucidés. Le caractère non cultivable de ce spirochète empêche la création de modèles *in vitro* ou animaux, l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'infection ne peut reposer en 2019 que sur l'analyse de données cliniques et histologiques. Des données histologiques anciennes ont mis en évidence la présence de lésions de funiculite nécrosante et de villite. Elles nécessitent d'être revisitées.

#### - Epidémiologiques :

On note également une surreprésentation des infections congénitales dans les DROM (B Garel et al., travail CNR soumis à publication) et déterminer les caractéristiques des patientes permettrait de mettre en place une politique de prévention ciblée sur ces populations à risque.

Le risque de transmission mère/enfant chez les patientes avec infection tardive (à test non tréponémique faiblement positif) n'est pas clairement déterminé. Cette situation est la plus fréquemment rencontrée par les cliniciens, mais c'est aussi celle pour lesquelles les données sont les moins étayées, avec un risque de transmission estimé entre 0 et 10%, qui nécessite une réévaluation précise urgente.

#### - Diagnostiques :

Le diagnostic de syphilis congénitale n'est pas toujours simple à porter, notamment chez les enfants ne présentant pas de signes cliniques à la naissance (2/3 des cas) ni de marqueurs sérologiques francs (IgM positives, titre de VDRL quatre fois supérieur à celui de sa mère prélevée au même moment) ; dans cette situation, qui pourrait être évitée dans certains cas, on préconise un traitement antibiotique par une dose unique d'Extencilline. La mise au point d'outils diagnostiques rapides chez les nouveaux-nés permettrait une prise en charge ciblée plus adaptée.

#### - Thérapeutiques :

L'algorithme de prise en charge des enfants repose sur des scénarios de probabilité dont certains (« infection possible ») nécessitent d'être revisités à la faveur d'outils permettant de confirmer ou d'exclure l'infection dès la période néonatale.

#### - Évolutives :

Le pronostic à long terme des enfants traités n'est pas connu en 2019, et nécessite une évaluation qui permettra de mieux suivre les enfants et de leur offrir une rééducation et une prise en charge précoce adaptée.

C'est dans ce contexte que nous souhaitons mettre en place au CNR Syphilis l'étude Cybale, pour répondre à ces questions. Cette étude est coordonnée par le CNR IST (N. Dupin) et le pôle de Périnatalité sur l'hôpital Cochin (Pr. Goffinet) en collaboration avec le Service d'Infectiologie de l'hôpital Necker (Pr. Charlier).

#### Objectifs

- Principaux : déterminer la présentation clinique des enfants en fonction du statut sérologique maternel et du traitement maternel/ néonatal.
- Secondaires
  - Suivi à long terme des enfants
  - Analyse des lésions placentaires
  - Identification de marqueurs diagnostiques précoces chez l'enfant

#### Méthode

- Etude nationale prospective de cohorte
- Recueil de données cliniques

- Constitution d'une biothèque
  - Mère : sang total/sérum au diagnostic et à l'accouchement
  - Enfant : placenta, sang total/ sérum sur sang de cordon et à J3 (couplé au prélèvement de Guthrie), salive à la naissance, fond de tube de LCR/sécrétions naso-pharyngées si réalisés.

#### Equipe

- Investigateur coordinateur : Yann Sellier
- Responsable scientifique : Nicolas Dupin
- Co-investigateurs: Nadjat Benhaddou, Philippe Granger, Caroline Charlier, Olivier Lortholary, Olivia Anselem.
- Population d'étude : ensemble des cas incidents de syphilis chez une femme enceinte ou un nouveau-né de moins d'un mois rapportés au CNR IST, laboratoire associé syphilis.

#### - Essai clinique randomisé de non-infériorité de doxycycline vs Benzathine benzylpénicilline (BPG) pour le traitement de la syphilis précoce SY-DOXY SY-BPG (PHRCN)

Les autorisations du CPP et de l'ANSM ont été obtenues, le démarrage de l'étude est prévu en septembre/octobre 2020.

<b>Coordination - Investigateur</b>	Pr Nicolas Dupin Dermatologie Centre clinique et biologique pour les maladies sexuellement transmissibles (unité MST) Centre national de référence des IST bactériennes, laboratoire associé syphilis Département de dermatologie Hôpital Cochin, Pavillon Tarnier 89 rue d'Assas 75006 Paris Courriel : nicolas.dupin@aphp.fr Tél. : 00 33 1 58 41 18 49 Télécopieur: 00 33 1 58 41 17 65
<b>Sponsor</b>	Assistance Publique-Hôpitaux de Paris
<b>Justification scientifique</b>	
<b>Objectif principal et critère d'évaluation principal</b>	L'objectif principal de notre étude est de valider que la doxycycline 100 mg prescrite pendant 14 jours n'est pas inférieure à une injection intramusculaire de BPG 2,4 millions d'UI pour le traitement de la syphilis précoce jugée sur une diminution de 4 fois du test non tréponémique (VDRL ou RPR) à 6 mois. La réponse sera définie comme une diminution de 4 fois (2 dilutions) de l'essai non tréponémique (VDRL ou RPR) au mois 6 par rapport à l'essai effectué avant le traitement. Les deux essais (celui avant le traitement et celui du mois 6) doivent être effectués dans le même laboratoire.
<b>Objectifs et critères d'évaluation secondaires</b>	Objectifs secondaires : 1. Évaluer la tolérance des deux traitements en termes d'événements indésirables graves (SAE) 2. Évaluer l'adhésion au traitement de doxycycline 3. Évaluer l'impact des deux traitements sur d'autres maladies sexuellement transmissibles au mois 6  Points d'arrivée secondaires : 1. occurrence des SAE entre les groupes 2. l'observance de la doxycycline sera évaluée sur le nombre de comprimés entre la semaine 1 et 2 lors des visites prévues 3. d'autres MST dans les deux groupes au mois 6
<b>Conception de l'essai</b>	
<b>Critères d'inclusion</b>	- Patients âgés de 18 ans - Les patients qui, après que la nature de l'étude leur a été expliquée, et avant toute procédure spécifique au protocole, ont

	<p>donné leur consentement écrit conformément aux exigences réglementaires locales;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les patients infectés par le VIH ou non atteints de syphilis précoce selon les critères des CDC (syphilis primaire, syphilis secondaire et syphilis latente précoce de moins d'un an et patients atteints d'une syphilis latente de durée inconnue),</li> <li>- Patients pouvant participer et suivre pendant les 6 mois de l'étude</li> <li>- Patients couverts par le système d'assurance maladie Français</li> </ul>
<b>Critères d'exclusion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- personnes allergiques à l'un des 2 médicaments</li> <li>- personnes ayant des contre-indications à l'un des deux médicaments de l'étude</li> <li>- Personnes atteintes de neurosyphilis précoce et tardive;</li> <li>- Personnes qui ont besoin d'être traitées par doxycycline</li> <li>- Les personnes atteintes de syphilis tardive, latentes ou non latentes (cutanées...);</li> <li>- Les personnes atteintes de thrombocytopénie ou de trouble de la coagulation, contre-indication injections intramusculaires ;</li> <li>- Les femmes qui sont enceintes ou allaitent, ou qui sont en âge de procréer et qui n'ont pas utilisé ou qui n'ont pas l'intention d'utiliser des mesures acceptables de contrôle des naissances;</li> <li>- Les personnes sous mesure de protection juridique ou incapables de signer un consentement;</li> <li>- Les personnes participant à tout essai clinique avec un autre produit d'investigation 28 jours avant la première visite de l'étude ou l'intention de participer à une autre étude clinique à tout moment au cours de la conduite de cette étude.</li> <li>- exposition récente aux 2 médicaments au cours des 3 derniers mois</li> </ul>
<b>Médicament</b>	Doxycycline 100 mg pendant 14 jours
<b>Traitement de comparaison</b>	Benzathine benzylpénicilline G 2,4 millions d'unités dans une injection intramusculaire
<b>Interventions ajoutées pour l'essai</b>	
<b>Risques ajoutés par l'essai</b>	Il n'y a aucun risque ajouté par l'essai
<b>Nombre de sujets inclus</b>	85 patients dans chaque groupe
<b>Sites</b>	L'essai est un essai national multicentrique impliquant 15 sites différents
<b>Durée de l'essai</b>	<p>Spécifier:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- période d'inclusion : 24 mois</li> <li>- période de participation (traitement-suivi):6 mois</li> <li>- durée totale: 30 mois</li> </ul>
<b>Nombre d'inscriptions prévues par site et par mois (par site/par mois)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. CeGIDD Hôtel Dieu, APHP, Pr Nicolas Dupin, 90/5</li> <li>2. Service de Dermatologie, Hôpital Henri Mondor, APHP, Pr Olivier Chosidow, 30/2</li> <li>1. CeGIDD Hôpital Saint-Louis, APHP, Dr Sébastien Fouéré 90/5</li> <li>2. Service des MIT, Hôpital saint-Louis, Pr Jean-Michel Molina, 20/1-2</li> <li>3. CeGIDD Hôpital de la Grave, Toulouse, Dr Nathalie Spenatto 180/10</li> <li>4. CeGIDD, Lyon Dr Fatima Yassir Oria, 100/10</li> <li>5. CeGIDD, Besançon, Dr Fabien Pelletier 20/1-2</li> <li>6. CeGIDD, Hôpital Bichat, APHP, Dr Fabrice Bouscarat 20/1-2</li> <li>7. Service de Dermatologie, Hôpital de Valenciennes, Dr Annie Vermersch 100/5</li> <li>8. CeGIDD, Marseille, Dr Pervenche Martinet 200/12</li> </ol>

	<p>9. Service de Dermatologie, Hôpital de la Réunion, Dr Antoine Bertolotti 50/3</p> <p>10. Service des MIT, Hôpital de Rennes, Pr Pierre Tattevin 40/2</p> <p>11. Service des MIT, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, APHP, Dr Gentiane Monsel 90/5</p> <p>12. CeGIDD, Montpellier, Dr Eric Picot 90/5</p> <p>13. Service des MIT, Hôpital de Tourcoing, Dr Isabelle Alcaraz 100/6</p>
<b>L'essai aura un comité de suivi des données</b>	Non

## **Annexe 1 : Missions & organisation du CNR**

### **1.1 Missions du CNR et de ses laboratoires associés**

Par arrêté du 7 mars 2017 (JO n°0058 du 9 mars 2017), le Centre National de Référence des Infections sexuellement transmissibles bactériennes (CNR IST bactériennes) a été nommé par la ministre chargée de la Santé pour la période du 1<sup>er</sup> avril 2017 au 30 mars 2022. Le CNR IST bactériennes oriente en priorité ses activités sur les infections à *Chlamydia trachomatis*, les infections à gonocoque, la syphilis et les infections urogénitales à mycoplasmes. Ce CNR est composé du laboratoire coordonnateur pour *C. trachomatis* et mycoplasmes urogénitaux avec pour responsable Cécile Bébéar et des laboratoires associés pour les gonocoques avec pour responsable Béatrice Berçot et pour la syphilis avec pour responsable Nicolas Dupin.

#### **1.1.1 Expertise**

- en contribuant au développement, à l'évaluation et au contrôle qualité des nouvelles techniques diagnostiques, notamment les techniques génétiques multiplexées et les tests de diagnostic rapide (TROD) combinant le diagnostic de plusieurs IST;
- en assurant une veille scientifique sur l'évolution des techniques de diagnostic et de dépistage des IST ;
- en maintenant une expertise sur les tests sérologiques et leur interprétation, notamment en expertisant les résultats de sérologie syphilitique ;
- en contribuant au développement, à l'évaluation et au contrôle qualité des nouvelles techniques d'évaluation de la sensibilité du gonocoque aux anti-infectieux ;
- en contribuant à l'évaluation de la sensibilité des souches de *Chlamydia trachomatis* aux antibiotiques par des études de la sensibilité au niveau national en s'appuyant sur les réseaux existants (LGV et Rénachla) ;
- en participant à l'actualisation des recommandations concernant les méthodes de diagnostic ;
- en réalisant les typages afin de déterminer le sérotype des souches de *Chlamydia trachomatis* circulant en France, notamment les sérotypes responsables de lymphogranulomatose vénérienne ;
- en développant et en utilisant des techniques discriminantes de typage des souches permettant notamment :
  - de comparer la distribution des types des souches isolées en France avec celle des souches isolées dans d'autres pays ;
  - d'identifier les cas groupés d'IST;
- en détectant de nouveaux phénotypes de résistance et en contribuant à l'identification des mécanismes de résistance.

#### **1.1.2 Conseil**

- Assurer une activité de conseil technique, diagnostique ou thérapeutique auprès des professionnels de santé concernant les infections à *Chlamydia trachomatis*, les infections à gonocoque, la syphilis et les infections urogénitales à mycoplasmes.

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

- en coordonnant avec l'agence nationale de santé publique le réseau de surveillance des anorectites à *Chlamydia trachomatis* et en veillant à la représentativité nationale de ce réseau de surveillance ;
- en assurant une surveillance de la sensibilité des gonocoques aux anti-infectieux au niveau national en s'appuyant sur les réseaux existants (Rénago) et en veillant à la représentativité nationale du réseau des laboratoires correspondants ;
- en collaborant le cas échéant à la surveillance de la syphilis congénitale ;
- en collaborant aux études épidémiologiques ;
- en participant aux systèmes de surveillance européens.

#### **1.1.4 Contribution à l'alerte**

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : émergence de cas dans une sous-population ; modifications des formes cliniques ; augmentation du nombre de cas ; émergence d'une souche échappant aux techniques diagnostiques habituelles ; etc.
- en participant à l'investigation de cas groupés d'IST.

## 1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés

### 1.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux, laboratoire coordonnateur

#### Laboratoire de Bactériologie

#### CHU de Bordeaux, Groupe Hospitalier Pellegrin

Pr Cécile Bébéar, chef de service

Place Amélie Raba Léon

33076 Bordeaux cedex

Tel 05.56.79.56.67

Fax 05.56.79.56.73

**Responsable scientifique** : Pr Cécile Bébéar

Tel 05.57.57.16.25- Fax 05.56.93.29.40

email : cecile.bebear@u-bordeaux.fr

#### Responsable administratif :

Mr David Karle, directeur médico-technique

Direction Générale CHU de Bordeaux

12 rue Dubernat

33404 Talence

Tel 05.56.79.49.82

email : david.karle@chu-bordeaux.fr

#### Organigramme du CNR IST bactériennes

#### Laboratoire de Bactériologie, CHU de Bordeaux

#### USC EA 3671 IHMC, INRA-Université de Bordeaux

- Cécile Bébéar (PU-PH) - directeur CNR et USC EA 3671.....ETP 0,15

#### 1. Secteur *C. trachomatis*, responsables B. de Barbeyrac et O. Peuchant

- Bertille de Barbeyrac (MCU-PH).....ETP 0,30

Etudes cliniques et réseau LGV

- Olivia Peuchant (MCU-PH) .....ETP 0,15

Diagnostic, typage moléculaire et résistance aux antibiotiques

- Charles Cazanave (PU-PH), référent infectiologue.....ETP 0,05

#### 2. Secteur Mycoplasmes urogénitaux, responsable S. Pereyre

- Sabine Pereyre (MCU-PH).....ETP 0,20

- Alexandra Meygret (AHU).....ETP 0,10

- Charles Cazanave (PU-PH), référent infectiologue.....ETP 0,05

#### 3. Ingénieurs, techniciens et personnels administratifs

- Arabella Touati, ingénieur.....ETP 1\*

- Cécile Laurier-Nadalié, ingénieur.....ETP 1\*

- Elodie Ladevèze, technicienne.....ETP 1\*

- Laura Albucher, technicienne.....ETP 1\*

- Mélanie Lecoœur, technicienne qualité.....ETP 0,5\*

- Marie Gardette, ingénieur CHU.....ETP 0,25

- Nadège Hénin, technicienne UBx.....ETP 0,5

- Angélique Alonso, puis Carla Balcon

technicienne projet i-PREDICT.....ETP 1

- Brigitte Couderc, secrétaire UBx.....ETP 0,1

- Christophe Poumirou, cadre de santé CHU.....ETP 0,1

\*Personnel rémunéré par la subvention SpF, L. Albucher recrutée suite au congé maternité et parental de E. Ladevèze ; M. Lecoeur recrutée en collaboration avec le CNRH (P. Lehours, service de Bactériologie CHU Bordeaux). UBx, Université de Bordeaux.

Charles Cazanave, infectiologue, est membre du réseau Coordination régionale de lutte contre l'infection à VIH Aquitaine (COREVIH) au sein duquel il est responsable du groupe de travail sur la PrEP.

## 1.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis, laboratoire associé

### Département des Agents Infectieux

#### GH Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (GH SLS-LRB-FW)

Site Hôpital St Louis

Pr Béatrice Berçot, responsable de l'UF de Bactériologie Site St Louis

1, avenue Claude Vellefaux

Tél : 01.42.49.42.40

Secrétariat : 01.42.49.94.93

Fax : 01.42.49.92.00

**Responsable scientifique** : Pr Béatrice Berçot

Tél : 33.1.42.38 50.96 - Fax : 01.42.49.92.00

email : [beatrice.bercot@aphp.fr](mailto:beatrice.bercot@aphp.fr)

**Responsable administratif** : Florent Bousquié/ Laure Tharel

Directeur de l'hôpital St Louis

Assisté de Madame Juliette de Corbière/ Christel Predinas

Direction des Finances et du Contrôle de Gestion

Tél : 01.42.38.51.20

Mail : [juliette.decorbiere@aphp.fr](mailto:juliette.decorbiere@aphp.fr)

### Organigramme du laboratoire associé « gonocoques »

#### Département des Agents Infectieux, GH SLS-LRB-FW

#### IAME équipe 2-UMR 1137 INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord

#### Sorbonne Paris Cité

Béatrice Berçot (PU-PH) – Directrice du laboratoire associé au CNR des IST bactériennes pour l'expertise gonocoque .....ETP 0,35

- Hervé Jacquier (MCU-PH)

Phylogénétique, traitement des données de bioinformatiques.....ETP 0,15

- Thibaut Poncin (Assistant spécialiste, doctorant).....ETP 0,50

- François Camelena, (assistant spécialiste puis AHU).....ETP 0,30

- Jean-Michel Molina (PU-PH), référent infectiologue.....ETP 0,05

#### Ingénieurs, techniciens et personnels administratifs

- Aymeric Braille, ingénieur junior.....ETP 1 \*

- Mary Mainardis, ingénieur junior .....ETP 1 \*

- Manel Merimèche, bioinformaticienne .....ETP 1 \*

- Nathalie Schnepf, ingénieur qualité.....ETP 0,30 \*

- Aurore Damiot, technicienne.....ETP 0,20

- Catherine Sevin, technicienne.....ETP 0,20

- Patricia Fernandes, technicienne.....ETP 0,20

- Cedric Moreau, technicienne.....ETP 0,20

- Caroline Cazaux, secrétaire.....ETP 0,10

- Géraldine Goudefroye, cadre de santé .....ETP 0,20

\*Personnel rémunéré par la subvention SpF.

Jean-Michel Molina, infectiologue, est le coordonnateur des essais cliniques ANRS Ipergay, Prévenir et Doxyvac.

**1.2.3 Laboratoire APHP Cochin, laboratoire associé  
U1016, Laboratoire de Dermatologie  
Groupe Hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca (APHP)**  
Bâtiment Faculté de Médecine  
Etage 2, porte 2003  
24, rue du Faubourg Saint-Jacques  
75014 Paris  
Tél. : +33 (0) 1 44 41 25 60 (laboratoire)

**Responsable scientifique :** Pr Nicolas Dupin  
Tél. : +33 (0) 1 58 41 18 49  
Fax : +33 (0) 1 58 41 16 75  
Email : nicolas.dupin@cch.aphp.fr

**Directeur adjoint**  
Dr Nadjet Benhaddou  
Tél. : +33 (0) 1 58 41 27 88  
Fax : +33 (0) 1 58 41 15 48  
Email : nadjet.benhaddou@cch.aphp.fr

**Responsable administratif :**  
Emmanuel Lavoué  
Adjoint du Directeur du Groupe Hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca  
Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP)  
27 rue du Faubourg Saint Jacques  
75014 Paris  
Tel : 01 58 41 10 01  
Courriel : emmanuel.lavoue@aphp.fr

**Organigramme du laboratoire associé syphilis  
U1016, Laboratoire de Dermatologie-Vénérologie  
Groupe Hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca (APHP)**

Nom - Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Organisme payeur
Nicolas DUPIN	Médecin Dermatologue, Vénérologue	0,30	Docteur en médecine, Docteur ès Sciences	PU-PH	AP-HP
Nadjet BENNHADOU	Pharmacien biologiste	0,30	Docteur en Biologie Médicale	Praticien Attaché	AP-HP et SpF
Philippe GRANGE	Ingénieur	0,30	Docteur ès Sciences	Ingénieur de recherche hospitalier	AP-HP
Johan CHANAL	Médecin Dermatologue, Vénérologue	0,30	Docteur en médecine	Praticien Attaché	AP-HP et SpF
Guillaume OLLAGNIER	Technicien	1,00	Master 2 Professionnel	Technicien hospitalier	SpF

## 1.3 Locaux et équipements

### 1.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Les activités du laboratoire concernant *C. trachomatis* et les mycoplasmes urogénitaux pour le CNR IST bactériennes sont effectuées à la fois dans les locaux du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux (plateaux techniques Microbiologie-Immunologie et Biologie Moléculaire, GH Pellegrin) et dans ceux de l'Unité Sous Contrat (USC INRA)-Equipe d'Accueil (EA Univ. Bordeaux) 3671, Infections Humaines à mycoplasmes et à chlamydiae (IHMC), INRA-Université de Bordeaux à laquelle est rattaché tout le personnel hospitalo-universitaire impliqué dans le projet du CNR IST.

Le laboratoire bénéficie du matériel bureautique (téléphones, fax, ordinateurs, photocopieurs, scanners, réseau internet) des infrastructures du CHU et de l'Université de Bordeaux qui l'hébergent.

#### Locaux hospitaliers et principaux équipements :

- Une pièce type L2 de 15,25 m<sup>2</sup> avec 1 poste de sécurité microbiologique (PSM) classe 2, 1 étuve à CO<sub>2</sub>, 1 réfrigérateur-congélateur, 1 centrifugeuse thermostatée pour la culture cellulaire de *C. trachomatis*, 1 microscope inversé et 1 pièce de 15,25 m<sup>2</sup> pour la culture des mycoplasmes avec 2 PSM classe 2, 2 étuves à CO<sub>2</sub>, 2 réfrigérateurs-congélateurs à -20°C
- Laverie-stérilisation du plateau Microbiologie-Immunologie du CHU de Bordeaux : 30,5 m<sup>2</sup>
- Pièces au sein du plateau technique de Biologie Moléculaire, secteur infectieux, hébergeant les automates d'extraction et de PCR en temps réel utilisés pour le diagnostic moléculaire de *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. et l'appareil d'électrophorèse capillaire ABI 3500xL genetic analyzer (Applied Biosystems) utilisé pour l'analyse Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Analysis (MLVA)
- Extracteur et automate de PCR en temps réel : cobas® 6800 (Roche diagnostics) pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*.
- Amplificateur Light Cycler 1.5, format capillaire, Roche
- 3 Amplificateurs Light Cycler 480, version 96, Roche
- Smart cycler (Cepheid)
- Extracteurs d'acides nucléiques MagNaPure 96 (Roche), Compac (Roche)
- Automate de sérologie pour Elisa XL Liaison (DiaSorin) pour la sérologie *C. trachomatis*
- Microscope à fluorescence pour la détection de *C. trachomatis* en culture cellulaire
- 2 congélateurs à -80°C dédié à l'activité du CNR sous contrôle de température et sous alarme
- 2 spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex LT Biotyper et Smart (Bruker Daltonics) (*M. hominis* et *Ureaplasma* spp.).

#### Locaux (560 m<sup>2</sup>) et équipements universitaires : en partage avec l'équipe de recherche USC EA 3671 IHMC

- 3 hottes à flux laminaire et 3 PSM classe 2
- 2 thermocycleurs (Eppendorf)
- 1 appareil de PCR en temps réel LC 480 (Roche)
- 1 électroporateur (Bio-Rad) et 1 concentrateur évaporateur (Jouan)
- 1 appareil d'électrophorèse en champ pulsé CHEF DR-III (Bio-Rad)
- Matériels d'électrophorèse conventionnelle
- 4 congélateurs à -80°C sous alarme, 6 congélateurs -20°C
- 1 autoclave (Gettinge), 1 appareil de purification d'eau (Véolia)
- 1 laveur de plaques (Thermo), 1 balance à haute précision (Sartorius)
- 1 spectrophotomètre à microplaques (Thermo), 1 spectrophotomètre (Thermo)
- 1 microcentrifugeuse (Eppendorf), 1 centrifugeuse à microplaques (Eppendorf), 2 centrifugeuses hautes performances (Beckman Coulter), 3 centrifugeuses à nacelle thermostatées (Jouan)
- 2 étuves (Jouan), 2 étuves à CO<sub>2</sub> (Heraeus), 1 incubateur agité (Minitron), 1 appareil à sonication (Sonics materials)
- 1 système complet d'imagerie E-Box pour gels d'électrophorèse (Fisher Bioblock)
- 1 microscope à fluorescence, 1 microscope inversé, 1 microscope
- 1 plateforme cobas® 4800 (1 extracteur X480 + 1 appareil de PCR en temps réel z480) mis à disposition par Roche
- 1 logiciel BioNumerics, version 7 (Applied Maths) et logiciels d'analyse de séquence
- Accès à la plateforme de séquençage à haut débit MiSeq (Illumina), Centre Génomique Fonctionnelle Bordeaux (CGFB), Univ. Bordeaux
- Accès aux plateformes de microscopie électronique et de cytométrie en flux de la Fédération de Recherche Biologie Fondamentale Appliquée à la Médecine (Trans-Bio-Med), Univ. Bordeaux, à laquelle l'unité de recherche appartient
- Accès payant à la plateforme de séquençage d'Euofins pour séquençage Sanger et analyse MLVA

### 1.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Fin 2017, le CNR a été transféré sur le site de l'APHP Saint-Louis. Cette modification favorise l'accès à une plateforme de séquençage haut débit plus importante. Les activités du laboratoire concernant *N. gonorrhoeae* sont effectuées à la fois dans les locaux du laboratoire de Bactériologie de Saint-Louis et sur le plateau technique de Microbiologie et Biologie Moléculaire mutualisé dans le département des agents infectieux, Paris X. Tout le personnel hospitalo-universitaire impliqué dans le projet du CNR IST est rattaché à l'équipe IAME équipe -UMR 1137 INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord Sorbonne Paris Cité.

Le laboratoire bénéficie du matériel bureautique (téléphones, fax, ordinateurs, photocopieurs, scanners, réseau internet) des infrastructures du GH SLS-LRB-FW, de l'Université de Paris qui l'hébergent.

Locaux hospitaliers sur un plateau mutualisé sur le site Saint-Louis et principaux équipements

Techniques culturales en Bactériologie (plateau de 500 m<sup>2</sup>) :

L'ensemble des locaux du laboratoire de Microbiologie du GH SLS-LRB-FW est situé au 1<sup>er</sup> étage du bâtiment principal de l'hôpital St Louis (surface d'environ 1000 m<sup>2</sup>).

Le laboratoire associé gonocoque est situé dans le laboratoire de Bactériologie de sécurité 2 consacrés à la Bactériologie pour les subcultures éventuelles. Il est équipé de :

- PSM, incubateurs (30 et 37°C) et CO<sub>2</sub>
- Équipement complet de Bactériologie : centrifugeuses, colorateurs, microscopes
- Identification par spectrométrie de masse Vitek MS (bioMérieux) et Bruker (Becton Dickinson)
- Equipement pour antibiogramme en milieu solide avec lecteur automatisé d'antibiogramme en diffusion de type ADAGGIO (Bio-Rad), en milieu liquide Vitek 2 (Biorad) et Sensititre (ThermoFisher), acquisition d'un ARISIQ (ThermoFisher)
- 1 mini-autoclave pour CMI en milieu solide
- Congélateurs à -80°C, (conservation en double des souches de gonocoques), surveillance centralisée des températures
- Matériel informatique : ScanBack, Glms, module de Bactériologie sans papier pour une traçabilité informatique des étapes de l'analyse microbiologique et le logiciel Kalilab pour la gestion des stocks, des habilitations...)

Techniques moléculaires mutualisés (site St Louis)

Locaux

- Une pièce de 10 m<sup>2</sup> est consacrée aux extractions manuelles pour le séquençage haut débit
- Une pièce de 12 m<sup>2</sup> contenant 2 réfrigérateurs-congélateurs est consacrée aux préparations des mix de PCR
- Une pièce de 12 m<sup>2</sup> contenant 2 réfrigérateurs-congélateurs est consacrée aux dépôts des acides nucléiques
- Une pièce de 20 m<sup>2</sup> accueille l'automate d'extraction et amplification intégré Cobas 6800 (Roche)
- Une pièce de 30 m<sup>2</sup> accueille la post-PCR

Matériel

Pour la détection automatisée de *C. trachomatis* / *N. gonorrhoeae* en PCR temps réel

3 plateformes : 3 m2000 (Abbott), 1 Xpert 16 places (Cepheid) 16 places, 1 Cobas 6800 (Roche)

Autres automates : un eplex 12 places, un torch 10 places (bioMérieux), 3 Filmarray (bioMérieux)

Extraction :

- Beat beaters
- Extracteurs automatiques d'acide nucléique ARN/ADN : 5 Qiasymphony RGQ (Qiagen), 1 easyMag (bioMérieux), 3 m2000sp (Abbott), 1 Magnapure (Roche Diagnostic), 1 Nordiag (Diasorin), Acquisition de 3 qiasymphony couplés au système rotogen (2019)
- 5 centrifugeuses à tubes, 5 centrifugeuses à barrettes
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosy Thermos)
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000
- 3 bains-marie à sec pour tubes Eppendorff
- 1 Cubit

Amplification / détection

- 4 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Bio-Rad MiniJ et Applied Biosystems)
- Amplificateurs pour PCR en temps réel : 1 SmartCycler (Cepheid), 2 Lightcycler 480 (Roche), 3 applied 9600,
- 1 thermoapplied 2400
- 1 électroporateur Gene Pulser X-cell (Bio-Rad)
- 2 amplificateur pour PCR en temps réel Rotor Gene (Qiagen) et Smart cycler (Cepheid)
- 1 tapestation,
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator
- 1 système Diversilab pour génotypage par rep-PCR (bioMérieux)
- Matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator)
- 1 imageur (GelDoc XR Bio-Rad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV

#### Séquençage Sanger et séquençage haut débit (NGS)

- 1 séquenceur applied 3130 XL Sanger
- 2 Miseq Illumina communs à plusieurs laboratoires
- 1 Oxford Nanopore MinION (Roche)
- 1 NextSeq 500/Illumina mutualisé situé sur le site de St Louis

#### Analyse de séquence :

- Accès plateforme Mage et Moabi (APHP)
- Les outils utilisés pour l'analyse après assemblage des séquences sont les logiciels installés sur la plateforme Galaxie / Moabi avec acces G-Route : Velvet, Spade, ParSNP, Mafft (alignement core SNPs avec MUSCLE + calcul arbre avec FASTTREE en maximum likelihood) visualisé avec iTOL, RAxML

### 1.3.3 Laboratoire Cochin

Le laboratoire du CNR IST bactériennes pour la syphilis fait partie de l'U1016 de l'Institut Cochin dans l'équipe du Pr. Aractingi «Biologie Cutanée » sur le site de l'hôpital Cochin au 2<sup>ème</sup> étage dans le bâtiment de la Faculté de Médecine. Ces locaux représentent environ 100 m<sup>2</sup> de surface de travail avec la mise en service d'un laboratoire de niveau 2 et pouvant être utilisé par le CNR syphilis.

#### Réception des prélèvements et extraction :

Les prélèvements pour le CNR sont réceptionnés par le centre de Tri de l'hôpital et acheminés jusqu'au laboratoire du CNR où ils sont répertoriés. Les échantillons sont ouverts dans un laboratoire L2 qui contient un extracteur automatique d'ADN (InnuPure C16, Analytikjena).

#### Analyse moléculaire :

Un module biochimie / biologie moléculaire qui fait partie de la zone de pré-amplification. Dans cette pièce nous avons individualisé une zone 1 dite « propre » de préparation des tubes (numérotation, disposition sur rack), et de préparation du mix avec pipettes dédiées sous une mini hotte PCR.

Une seconde zone est individualisée, appelée zone 2 avec une 2<sup>ème</sup> mini hotte PCR est dédiée au mélange du mix de PCR avec l'ADN à amplifier.

Ce module contient également des réfrigérateurs et congélateur (-20°C, -80°C) dont certains sont dédié pour le CNR et identifiés comme tel. Ce module contient aussi des centrifugeuses haute et faible vitesse, un bain marie, appareils d'électrophorèse et de transferts (Hoeffer system, Pharmacia); appareil de chromatographie pression atmosphérique (Bio-Rad); un lecteur pour plaques 96 puits (MR5000 Dynatech).

Un module d'analyse qui correspond à la zone de post-amplification. Ce module contient un appareil PCR (ProFlex PCR System, Applied Biosystem) et un appareil de PCR en temps réel (Light Cycler Nano, Roche) en zone 3, secteur 4. C'est dans ce module que les réactions de PCR sont réalisées. Ce module contient également un appareil d'électrophorèse uniquement dédié à l'analyse de la réaction PCR (ouverture des tubes après amplification, zone 3, secteur 5) avec blouses dédiées, et pipettes spécifiques restant à demeure. Il contient également l'appareillage nécessaire pour enregistrer les résultats obtenus après électrophorèse.

#### Equipements partagés au sein de l'équipe

L'activité de PCR et analyse est une activité partagée au sein de l'équipe afin de regrouper le lieu d'utilisation du bromure d'éthidium (mise en place de protocole d'utilisation).

### Equipements partagés au sein de l'Institut Cochin

En tant que membre de l'Institut Cochin, le laboratoire a accès à l'ensemble des plateformes présentes sur le site de l'Institut Cochin avec, en particulier, le cytomètre en flux (FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA), divers appareils de biologie moléculaire et cellulaire.

## 1.4 Collections de matériel biologique

### 1.4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Depuis la nomination du laboratoire comme CNR des IST bactériennes pour *C. trachomatis* et les mycoplasmes urogénitaux, les souches cliniques de *C. trachomatis*, les souches de *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. en situation pathogène et les échantillons positifs par PCR à *C. trachomatis* (réseau LGV et souches urogénitales obtenues sur le tout le territoire) et à *M. genitalium*, recueillis à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2017 sont conservés au centre de ressources biologiques (CRB) Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux certifié AFNOR (contact : crb.bbs@chu-bordeaux.fr).

Matériel biologique envoyé au centre de ressources biologiques (CRB) Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux certifié AFNOR entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 31 décembre 2019 :

- 2383 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV en 2019, 53 échantillons anorectaux et cervicaux positifs à *C. trachomatis* (extraits de prélèvements de personnes à risques d'IST au Togo, collaboration étude ANRS).
- 828 échantillons positifs à *C. trachomatis* reçus dans le cadre de l'enquête de prévalence des infections urogénitales à *C. trachomatis* dans les départements et régions d'outre-mer en 2018 (DROM 2018).
- 98 souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux.
- 483 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* envoyés au CNR en 2019 dans le cadre de la recherche de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones.
- 614 échantillons positifs à *M. genitalium* dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en 2018 dont 336 provenant de France métropolitaine (MYCOMET18) et 278 provenant des départements et régions d'outre-mer (DROM 2018), 62 extraits de échantillons positifs à *M. genitalium* de personnes à risques d'IST au Togo (collaboration étude ANRS).  
111 souches de *Ureaplasma* spp. et 20 souches de *M. hominis* isolées dans le cadre de l'enquête de détermination de la sensibilité aux antibiotiques de ces 2 espèces en France métropolitaine (MYCOMET18) ainsi que 90 souches d'uréaplasmes et 10 souches de *M. hominis* isolées et antibiogrammées au CHU de Bordeaux en 2019.

Les autres souches ou échantillons cliniques sont conservés au laboratoire du CHU de Bordeaux à -80°C, dans des congélateurs sous report d'alarme et contrôle de température. Les souches et échantillons précieux sont conservés en double exemplaire dans des congélateurs différents. Les souches de référence des 5 espèces bactériennes sont conservées en un exemplaire au BBS et en un exemplaire au laboratoire de Bactériologie. Notre laboratoire dispose de souches de référence des 18 sérovars ou génovars de *C. trachomatis* issues de l'American Type Culture Collection (ATCC) et environ 1500 souches cliniques de *C. trachomatis* collectées depuis 2000. Notre laboratoire détient les souches de référence des principales espèces de mycoplasmes urogénitaux issues de l'ATCC (*M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum*, *U. urealyticum*) soit une vingtaine de souches de référence. Par ailleurs, plus de 4000 souches cliniques de *Ureaplasmas* spp. et *M. hominis* sont conservées depuis 1990. De plus, plusieurs enseignants-chercheurs du laboratoire étant membres de l'International Organization for Mycoplasmology (IOM, <http://iom-online.org/>), nous avons accès à une collection de 12000 cultures lyophilisées de mollicutes, représentant 200 espèces et 1500 souches différentes.

La collection de souches et d'échantillons biologiques est déclarée auprès du CHU de Bordeaux et le Comité de protection des Personnes Sud-Ouest et outre-Mer III.

### 1.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Depuis la nomination du laboratoire comme laboratoire responsable de l'expertise gonocoque du CNR des IST bactériennes, les matériels biologiques étudiés sont stockés au CNR IST à l'hôpital St Louis. Cela comporte les collections suivantes :

#### *Collection de 1377 souches de gonocoques (depuis 2017)*

- 376 souches isolées en 2019 dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance du gonocoque en France métropolitaine (ENGON2019)
- 160 souches isolées en 2018 dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance du gonocoque en France métropolitaine (ENGON2018)
- 317 souches isolées dans le cadre du Réseau Renago 2018, visant à surveiller la résistance du gonocoque en France métropolitaine
- 392 souches isolées dans le réseau Renago en 2017, visant à surveiller la résistance du gonocoque en France métropolitaine
- 25 souches isolées en 2017 dans le cadre de l'enquête de surveillance de la résistance du gonocoque en France métropolitaine (ENGON2017)
- 25 souches isolées chez une cohorte de PrEPeurs à Bordeaux en 2019
- 14 souches isolées d'infections invasives en 2019
- 4 souches de sensibilité diminuée ou résistantes en 2019
- 10 souches provenant du contrôle de qualité de l'ECDC (UKNEQAS)
- 46 souches issues de demande d'expertise CNR
- 8 souches isolées de la cohorte de PrEPeurs ANRS Ipergay en 2016

#### *Collection de 1280 prélèvements cliniques positifs à gonocoques (depuis 2017)*

- 219 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* dans le cadre de l'étude Mémodépistages-REMIND (175 d'Ile de France, 31 de Lyon, 13 de Montpellier) en 2018 et 54 en 2019
- 24 prélèvements cliniques issus de cas CNR en 2019
- 438 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* issus de la comparaison de 4 kits pour CT/NG/MG/TV
- 207 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* reçus dans le cadre de l'enquête de la résistance du gonocoque dans les départements et régions d'Outre-Mer en DROM 2017 et 2018
- 268 échantillons biologiques positifs à *N. gonorrhoeae* issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance réalisée semaine 49 en 2017
- 70 prélèvements cliniques recueillis dans l'étude ancillaire ANRS IPERGAY menée par J.-M. Molina
- 2 extraits d'ADN de gonocoque + issus d'infections à gonocoque chez des femmes HIV-positives et HIV-négatives au Mali
- 52 extraits d'ADN de gonocoque + issus d'infections à gonocoque chez des femmes travailleuses du sexe et HSH à Lomé, Togo.

#### *Collection de gonocoque du réseau Renago (antérieure à 2017 soit environ 13 000 souches)*

- 15 boîtes de congélation en cryotubes correspondants aux souches de sensibilité diminuée isolées dans le cadre du réseau Renago soit 1500 souches depuis 2010
  - 116 boîtes de congélation en cryotubes correspondant au reste de la collection Renago depuis 2010
- Echantillons*

#### *Collection de séquence de génome complet*

- 396 souches séquencées en NGS en 2019
- 355 souches séquencées en NGS en 2018
- souches WHO A → Z

Les souches et échantillons précieux sont conservés en double exemplaire dans des congélateurs différents sous report d'alarme et contrôle de température. Notre laboratoire dispose de souches de référence de l'OMS. Le laboratoire de St Louis dispose de 10 souches de gonocoque de référence de l'OMS (WHO A → Z). Par ailleurs, de nombreuses souches cliniques isolées à l'hôpital St Louis et l'hôpital Lariboisière depuis 1987 ont été conservées en microbilles. Ces souches sont conservées dans le laboratoire de Bactériologie du GH St Louis à -80°C, dans des congélateurs sous report d'alarme et contrôle de température.

### **1.4.3 Laboratoire APHP Cochin**

Dans le cas de la syphilis, l'impossibilité de cultiver en milieu synthétique le spirochète *T. pallidum* nous conduit à parler de prélèvements contenant les souches de *T. pallidum*. Les échantillons sont acheminés sous 24 à 48 h au

CNR syphilis, soit directement au laboratoire, soit par l'intermédiaire du centre de tri de l'Hôpital Cochin. L'ensemble des échantillons (sérothèque et biothèque) sont stockés dans un congélateur -80°C dédié pour le CNR, lui-même entreposé dans la salle des -80°C du service de Bactériologie. Les échantillons sont stockés dans des boîtes résistantes aux basses températures et identifiées CNR syphilis. Chaque échantillon fait l'objet d'une création de position dans sa boîte de stockage, qui est répertoriée dans le fichier CNRSY-PREA-ER-002.

Le CNR IST bactériennes - syphilis a mis en place la collecte de deux types de prélèvements :

1) les prélèvements issus de protocoles d'études pour répondre aux objectifs du CNR à savoir l'Etude Microbiologique de la syphilis (2006-2010) et l'étude GENOSYPH (démarrée en 2011).

2) les prélèvements adressés au CNR IST bactériennes pour la syphilis pour expertise moléculaire et/ou sérologique.

Sur la période 2006-2019, le CNR IST LA syphilis a reçu 971 échantillons positifs pour l'ADN de *T. pallidum*.

#### Collection d'échantillons positifs pour l'ADN de *T. pallidum*, CNR IST LA Syphilis (2006-2019)

LCR	Placenta	Liq. Amn	Cordon/Sg Cord	Ecouv.	Biopsie	Sg total
112	14	7	9	758	49	22

Nous disposons également de 440 immun-sérums répertoriés.

## 1.5 Démarche qualité du laboratoire

### 1.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Le laboratoire suit actuellement la démarche de la cellule qualité du Pôle de Biologie et Pathologie du CHU de Bordeaux pour l'obtention de l'accréditation totale en 2020 selon la norme EN ISO 15189. Le laboratoire est, tout au long du processus en cours accrédité à travers le Pôle de Biologie et Pathologie, pôle déclaré au COFRAC comme un laboratoire unique.

Les analyses requérant l'accréditation dans le cadre du nouvel CNR IST bactériennes sont **le diagnostic moléculaire de la LGV à *C. trachomatis* et le diagnostic moléculaire de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium***. Le laboratoire a entamé les démarches pour ces 2 analyses au sein du service de Bactériologie du CHU de Bordeaux avec l'aide de la cellule qualité du pôle Biologie et Pathologie. Toutes les fiches techniques ont été rédigées et sont enregistrées dans le logiciel Sharepoint permettant de gérer les documents qualité au CHU de Bordeaux. Les non-conformités mises en évidence à la réception des échantillons sont tracées et chaque appel reçu au CNR fait l'objet d'une traçabilité. Le personnel technique du CNR a été habilité pour travailler sur le plateau de Biologie moléculaire du CHU de Bordeaux.

Une technicienne qualité a été recrutée à mi-temps en novembre 2018 pour le CNR IST et partagée avec le CNR Campylobacter-Helicobacter hébergé dans le même laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Un 1<sup>er</sup> audit interne des CNR par le CHU de Bordeaux a été réalisé le 17 octobre 2019.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation du diagnostic moléculaire de la LGV à *C. trachomatis* un document de type « SH FORM 43 » a été déposé pour la validation en portée B de la « Détection de *Chlamydia trachomatis* souche L par PCR en temps réel qualitative ». Le CNR s'est référé au guide technique de validation et d'accréditation des méthodes en biologie médicale (SH-GTA-04) pour l'identification des paramètres à tester et au QUAMIC 2017 en référentiel utilisé pour définir les critères d'acceptation des tests.

Pour cette analyse, deux sous-processus sont à valider : l'extraction des acides nucléiques et la PCR en temps réel. Pour chaque sous-processus, une grille d'analyse de risque a été élaborée qui permettra au laboratoire d'identifier les points critiques à maîtriser et améliorer, et plusieurs tests ont été réalisés pour la vérification/validation de la méthode.

**Sous-processus 1** : l'extraction des acides nucléiques totaux est réalisée avec un extracteur automatique le MagNA Pure 96 System Roche. Il s'agit d'une technique automatisée, la vérification a été faite en portée A.

Plusieurs paramètres avaient déjà été validés par le fournisseur :

- La limite de détection et l'étendue de mesure.
- La comparaison des méthodes : versus la méthode manuelle du QIAamp DNA Blood Mini Kit
- Les interférences : le fournisseur a évalué l'influence de certaines substances interférentes comme l'hémolyse, la présence de bilirubine/ictère et la présence de lipides. A Bordeaux, le diagnostic de la LGV est réalisé essentiellement sur les échantillons anorectaux. Les selles présentes sur les écouvillons anorectaux peuvent être considérées comme substance interférente/inhibante de la réaction PCR. Cette influence a été évaluée au laboratoire, sur un échantillon de selles étudié en solution avec des concentrations croissantes de la souche de référence L2/434/Bu (ATCC VR-902B).
- La contamination : le risque de contamination croisée a été évalué par le fournisseur à l'aide du test de virus Parvo B19. Au CNR, une extraction en alternance de 8 échantillons anorectaux contenant  $10^8$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu, ATCC VR-902B (positifs forts) et d'un témoin négatif puis l'extraction en alternance de 8 échantillons anorectaux contenant  $10^3$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu, ATCC VR-902B, (positifs faibles) et d'un témoin négatif ont été réalisées pour la recherche d'une possible contamination lors de l'extraction.
- Robustesse et stabilité des réactifs.

**Sous-processus 2** : Analyse qualitative par PCR en temps réel chimie TaqMan d'après Morré *et al.* Emerg Infect Dis 2005 ; 11 :1311-1312. Le but de cette PCR est d'identifier les souches responsables de LGV, à savoir l'ensemble des souches de génovar L. Ces souches possèdent toutes une délétion de 36 pb dans le gène de protéine de membrane *pmpH*. La sonde TaqMan utilisée est dessinée de telle sorte qu'elle ne pourra s'hybrider que sur les souches de génovar L ayant la délétion. La PCR est validée par la présence d'un contrôle interne d'extraction et/ou d'amplification selon le type d'échantillon reçu. Plusieurs tests ont été réalisés au laboratoire pour l'évaluation de la performance de la méthode et sa validation en portée B.

- La répétabilité : le test consiste à passer le même échantillon anorectal 12 fois dans une même série. Deux niveaux ont été testés, un niveau fort avec un extrait ADN d'un échantillon contenant  $10^9$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu, ATCC VR-902B et un niveau faible avec un extrait ADN d'un échantillon contenant  $10^3$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu, ATCC VR-902B. Les deux concentrations testées correspondent aux valeurs hautes et basses des concentrations en souches L qu'on peut trouver dans des échantillons cliniques.
- La variabilité inter-opérateurs : 8 échantillons anorectaux (2 LGV positifs, 5 négatifs et le contrôle positif) ont été analysés par deux opérateurs différents, le même jour, avec le même lot de réactifs et à partir des mêmes tubes d'extraits d'ADN des 8 échantillons pour vérifier la reproductibilité de la technique.
- L'exactitude : vérifiée grâce à un contrôle inter-laboratoire (détail ci-dessous).
- Les performances diagnostiques : une étude expérimentale a été réalisée afin de déterminer la sensibilité et spécificité analytique ainsi que les valeurs prédictives positive et négative. 172 échantillons anorectaux, 52 LGV et 120 non LGV, collectés de PrEPeurs en 2017, dont le génovar a été identifié par séquençage du gène *ompA* (Lan *et al.* J Clin Microbiol. 1994) ont été testés par notre technique de PCR en temps réel. La spécificité diagnostique de notre PCR a été déterminée sur 12 échantillons cliniques négatifs pour *C. trachomatis* mais positifs à d'autres pathogènes du tractus urogénital (*K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *Ureaplasma sp.*, *C. albicans*).
- La limite de détection : une recherche de la limite de détection a été faite bien qu'il s'agisse d'une technique qualitative. Une étude expérimentale réalisée sur une culture de la souche de référence L2/434/Bu (ATCC VR-902B), titrée à  $10^9$  UFI/ml. Les souches ont été diluées de 10 en 10 en milieu 2SP de  $10^9$  à  $0,1$  UFI/ml puis extraites sur le MagNA Pure 96 System et testées avec notre PCR en temps réel. L'analyse a été réalisée en triplicate.
- La comparaison de méthode a été réalisée dans le cadre de l'expertise faite par le CNR pour évaluer de trousse commercialisées de PCR en temps réel pour le diagnostic de la LGV (cf paragraphe 2.2.2 Évaluation de trousse diagnostiques pour la LGV).
- Interférences : les selles présentes sur les écouvillons anorectaux peuvent être considérées comme substance interférente de la réaction. Cette influence a été évaluée sur un échantillon de selles étudié en solution avec des concentrations croissantes ( $10^8$  à  $10$  UFI/ml) de la souche de référence L2/434/Bu (ATCC VR-902B). L'amplification a été réalisée en triplicate, avec un contrôle de qualité interne. Les résultats d'amplification ont été comparés aux résultats obtenus avec la même gamme mais en absence de la substance interférente.
- La contamination : l'étude a consisté en l'amplification en alternance de 8 échantillons anorectaux contenant  $10^8$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu (positifs forts) et d'un témoin négatif puis l'amplification en alternance de 8 échantillons anorectaux contenant  $10^3$  UFI/ml de la souche de référence L2/434/Bu (positifs faibles) et d'un témoin négatif.
- Robustesse et stabilité des réactifs de la réaction PCR : en plus des données du fournisseur, des tests supplémentaires ont été réalisés pour vérifier ces paramètres.
  - o Test de la trousse de PCR en temps réel (LightCycler Probe Master) en mélange réactionnel avec amorces et sonde sur plusieurs échantillons et à différents délais : un mélange juste après

- préparation et un mélange 24 h plus tard après attente à température ambiante à l'obscurité. Calcul du biais (%) et du  $\delta Ct$  entre les 2 conditions.
- Test de la stabilité de la trousse du contrôle d'extraction et d'amplification (DiaControlDNA™) dans les mêmes conditions précédemment décrites avec calcul du biais (%) et du  $\delta Ct$  entre les conditions.
- Test de la stabilité de la trousse du contrôle d'extraction et d'amplification (DiaControlDNA™) après changement du volume d'ADN du contrôle interne de qualité (CIQ) ajouté avant extraction. Réaction PCR réalisée en triplicate pour chaque condition.
- Test du mélange amorces et sondes du CIQ de la trousse DiaControlDNA™ avec 2 concentrations différentes sur des extraits d'ADN de culture de la souche de référence L2/434/Bu, (titrée à 10<sup>9</sup> UFI/ml) diluées de 10 en 10 en milieu 2SP de 10<sup>9</sup> à 0,1 UFI/ml. Chaque dilution est amplifiée en triplicate par la PCR en temps réel en présence de CIQ. Calcul du biais (%) et du  $\delta Ct$  entre les 2 conditions pour chaque dilution.

- Test de stabilité des échantillons avant extraction d'ADN et amplification PCR : étude réalisée sur échantillons cliniques positifs à *C. trachomatis* génovar L (2 fortement positifs et un échantillon faiblement positif) avec différents délais avant l'extraction (à réception, 72h plus tard avec conservation à +4°, 72h plus tard avec conservation à température ambiante). Calcul du biais (%) et du  $\delta Ct$  entre les conditions.

En ce qui concerne **les contrôles de qualité** concernant l'activité du CNR IST bactériennes, le laboratoire participe, comme tous les ans dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux, au contrôle de qualité externe proposé par Labquality concernant la détection moléculaire de ***C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae***. A propos du diagnostic de la **LGV**, un contrôle inter-laboratoire (CIL) annuel a été mis en place via une convention entre le laboratoire de I.S.A. Morré, Institute for Public Health Genomics Maastricht University, Maastricht, Pays Bas et le CNR IST bactériennes. Un premier échange a été réalisé le 13/11/2019 consistant en l'envoi de notre CNR vers Maastricht de 5 échantillons cliniques anorectaux (3 LGV, 1 non L et 1 CT négatif). Un deuxième échange dans le sens Maastricht vers notre CNR a été réalisé le 12/12/2019 consistant en la réception de 5 échantillons ano-rectaux (3 LGV, 1 non L et 1 CT négatif). Les résultats étaient conformes pour les 2 laboratoires et notre technique validée.

Le contrôle de qualité ***M. genitalium*** du Quality Control Molecular Diagnostics (QCMD) a été réalisé en 2019 et a inclus pour la 1<sup>ère</sup> fois un contrôle qualité pour la résistance aux macrolides. Nous participerons en 2020 à l'EEQ mycoplasmes urogénitaux (***M. hominis* et *Ureaplasma spp.***) que propose l'Association de Biologie Praticienne.

## 1.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

### Accréditation

Le laboratoire suit actuellement la démarche de la cellule qualité du Pôle de Biologie B2P du GH St Louis Lariboisière Fernand Widal pour l'obtention de l'accréditation totale en 2020 selon la norme EN ISO 15189. Le laboratoire est, tout au long du processus en cours accrédité à travers le Pôle de Biologie et Pathologie, pôle déclaré au COFRAC comme un laboratoire unique.

Le diagnostic moléculaire CT/NG a été accrédité sur Cobas 6800 depuis 2018. Le diagnostic MG/TV est présenté en extension de portée pour 2020 car le process a été retardé avec la crise sanitaire COVID-19 entraînant la monopolisation de cet automate. Toutes les fiches techniques et préanalytiques ont été rédigées et sont enregistrées dans le logiciel Kalilab et Viskalis. Les analyses requérant l'accréditation dans le cadre du nouvel CNR IST bactériennes sont le diagnostic moléculaire de la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et aux fluoroquinolones. La qualicienne responsable de notre site a été recrutée à raison de 3 vacations/semaines et ces techniques d'implantation récente (fin 2018) doivent être incluses dans le processus d'accréditation.

En ce qui concerne les contrôles de qualité concernant l'activité du CNR IST bactériennes, le laboratoire participera comme tous les ans dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire de Bactériologie du GH St Louis-LRB-FW, au contrôle de qualité externe européen (*Quality Control in Molecular Diagnostics* ou QCMD) concernant la détection moléculaire de *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* et le panel syndromique IST.

### Contrôle du process de Bioinformatique

La plateforme Moabi suit le process d'accréditation. Les données brutes issues du séquençage haut débit de *N. gonorrhoeae* sont stockées sur deux serveurs :

- Sur un serveur français agréé à l'hébergement de données de santé et de recherche mise en place par la plate-forme bioinformatique de l'AP-HP « MOABI » <http://idfseqit.fr/>
- Sur le serveur de la plate-forme MAGE Microscope (Genoscope, Évry) qui héberge et annote nos génomes de référence ainsi que d'autres génomes d'intérêt.

Les runs sont analysés avec le pipeline d'analyse des données de séquençage du génome de *N. gonorrhoeae* (NG-AR2T) situé sur le portail web G-route de la plateforme Moabi. Le déploiement du pipeline sur cette interface permet la génération d'un rapport épidémiologique complet automatisé. Ce rapport comprend:

- (I) le contrôle qualité et l'assemblage *de novo* des données de séquençage
- (II) le typage moléculaire *in silico* pour déterminer le NG-MAST, le MLST & le NG-STAR,
- (III) la caractérisation des déterminants de la résistance aux antibiotiques ainsi que la détection des mutations chromosomiques connues et présentes sur ces gènes
- (IV) la construction d'un arbre phylogénétique et le calcul des distances génomiques pour tracer les liens épidémiologiques entre les isolats, comme l'indique le processus bioinformatique schématisé ci-dessous.

(Cf description du pipeline paragraphe 2.6.2)

### Contrôle de qualité intra-laboratoire

Pour la Microbiologie, le laboratoire participe au contrôle national de qualité biennuel de l'ANSM. Les techniques de séquençage sont encadrées par le séquençage de site de référence WHO.

### Contrôles de qualité externes supranationaux

Le laboratoire associé gonocoque participe à un contrôle de qualité externe (CQE) quadriennuel, sur la sensibilité de souches de gonocoque à différents antibiotiques et sur la recherche de *N. gonorrhoeae* dans des échantillons cliniques. Ces contrôles sont proposés par l'ECDC aux centres experts des IST de la plupart des pays européens.

#### 1- Quality Control for molecular Diagnosis QCMD CT/NG (2/an) et STI syndromic panel (2/an)

Dix échantillons biologiques sont testés pour la recherche de *N. gonorrhoeae*. Les résultats des contrôles sont basés sur la détection et l'identification de *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* dans un échantillon. La restitution des résultats est effectuée en ligne avec comparaison aux autres laboratoires avec une visualisation des performances analytiques des automates utilisés.

#### 2- EU STI Microbiology Network: *N. gonorrhoeae* antimicrobial resistance quality assurance programme : (4/an)

Huit souches OMS de *N. gonorrhoeae* sont testées pour la détermination des CMI sur un panel de 8 antibiotiques (ciprofloxacine, ceftriaxone, céfixime, azithromycine, gentamicine, spectinomycine) et la recherche de bêta-lactamase.

#### EU STI Microbiology Network: Sentinel Surveillance of Gonococcal Antimicrobial Susceptibility : (2/an)

Dans le cadre du projet européen de surveillance des IST (The European Surveillance System, TESSy) mis en place par l'ECDC depuis 2009, le CNR participe à la surveillance de la résistance aux antibiotiques de *N. gonorrhoeae* (AMR surveillance programme).

De façon biennale, les CMI des 8 antibiotiques de référence cités ci-dessus d'une série de 55 à 110 souches testées consécutivement par le CNR ainsi que les données épidémiologiques de chaque cas sont transmises à l'ECDC via TESSy. Pour assurer la qualité des résultats rendus, les CMI pour 5 souches de référence OMS sont testées en début et en fin de série et envoyées en parallèle. Tous les résultats sont analysés à leur retour par les biologistes. Ils sont restitués à l'équipe du CNR avec mise en place d'actions correctives et préventives en cas d'inadéquation (ex : lecture CMI).

### 1.5.3 Laboratoire APHP Cochin

Une démarche pour l'accréditation du CNR syphilis a débuté en 2012 avec une visite du COFRAC en juin 2014 (famille Sérologie Infectieuse) et se poursuit depuis afin d'améliorer le fonctionnement interne, de fidéliser les demandes d'expertise et de collaboration des correspondants nationaux, et de favoriser la reconnaissance de la qualité de son expertise par les autres partenaires d'organismes de santé publique, de recherche ou de l'industrie.

Le programme de mise en place de la démarche d'accréditation comprend à la fois la validation des techniques d'analyse déjà éprouvées (sérologie) et celles en cours de développement (détection moléculaire), la formalisation des processus d'analyse et de rendu des résultats, l'identification d'indices d'appréciation de la qualité et l'habilitation des personnes participant aux missions du CNR.

En ce qui concerne la sérologie, la participation à des contrôles de qualité externe est organisée depuis 2013, de même que des audits de pratique par des collègues externes au CNR.

Plusieurs services supports du CNR syphilis, tels que le système de gestion informatique des laboratoires et la maintenance des équipements, sont partagés avec les Services du Pôle de Biologie du Groupe Hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu.

La démarche d'accréditation est effective pour le Pôle depuis Juin 2014 pour l'obtention de l'accréditation totale en 2020. Elle devra suivre la norme EN ISO 15189 qui décrit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence requise pour la réalisation d'analyses biologiques médicales.

#### Liste des techniques :

- Dépistage par CLIA (automate Architect)	20%
- RPR pour sérum (Bio-Rad)	20%
- VDRL pour LCR (All Diag)	20%
- Immunoblot (IgG/IgM Ingen)	20%

Total 80% des techniques utilisées par le CNR syphilis sont accréditées depuis juin 2016.

## **Annexe 2 : Capacités techniques du CNR**

### **2.1 Liste des techniques de référence**

#### **2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux**

##### **Chlamydia trachomatis**

##### **- Liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux**

- Recherche directe par culture cellulaire (sur cellules McCoy, tubes unitaires à lamelle, révélation à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MOMP fluorescents, lecture au microscope à fluorescence)

- Recherche directe par amplification d'acides nucléiques

- Kit commercialisé cobas ® CT/NG détectant *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sur le cobas ® 6800 (Roche Diagnostics).

- Détection de tous les géovars : par 2 tests « maison », l'un ciblant le plasmide cryptique (Dutilh B, et al. 1989. Res Microbiol 140:7-16) et l'autre ciblant le gène *omp1* par PCR en temps réel en chimie SYBR Green sur Light Cycler 480 (Roche).

- 1 test de PCR en temps réel détectant le variant suédois de *C. trachomatis* (Raheison et al. 2009. J Microbiol Methods 78:101-103).

- 1 test de PCR en temps réel « maison » détectant les souches de géovar L (Morré et al. 2005. Emerg Infect Dis 11:1311-1312). Ce test met à profit la particularité des souches L d'être délétées de 34 pb sur le gène *pmpH*, en utilisant une sonde TaqMan dessinée de part et d'autre de la délétion. Un signal de PCR n'est présent que si la sonde s'hybride signifiant que la délétion est présente et que la souche est de type L. Ce test permet d'identifier en une seule étape la présence d'une souche de type L dans les échantillons rectaux et urogénitaux positifs pour *C. trachomatis*.

- 1 test de PCR en temps réel « maison » détectant spécifiquement les souches de géotype L2b ( Verweij et al. 2011. Clin Microbiol Infect 17:1727-1730). Ce test met à profit une particularité du variant L2b qui est le seul à posséder un fragment d'insertion de 9 pb sur le gène *pmpH*. Une sonde dessinée au niveau de cette insertion permet d'identifier une souche L2b dans un prélèvement en une seule PCR.

- Recherche indirecte par sérologie: recherche des IgG par méthode ELISA (kit Medac, DiaSorin) sur automate XL-Liaison (DiaSorin) et recherche des IgM par immunofluorescence (lame Focus-Eurobio).

- Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *C. trachomatis* ne se fait pas en routine étant donné la lourdeur de la technique. Le principe repose sur l'utilisation de tapis cellulaire infecté par un inoculum quantifié en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la concentration d'antibiotique où l'on n'observe plus d'inclusions normales au microscope (Suchland et al. 2003 Antimicrob Agents Chemother 47:636-642). La CMI et la concentration minimale bactéricide (CMB) peuvent être appréciées d'une manière plus précise par une technique moléculaire de RT-PCR développée au laboratoire (Peuchant et al. 2011. J Med Microbiol 60:508-514).

##### **- Liste des techniques disponibles pour le typage**

- Typage moléculaire de *C. trachomatis* pour déterminer le géovar par PCR-RFLP du gène *omp1* ou par séquençage du gène *omp1*, après culture cellulaire ou directement à partir de l'échantillon biologique (Rodriguez et al. 1991. J Clin Microbiol 29:1132-1136).

- Typage moléculaire intra-géovar de *C. trachomatis* par MLVA (Peuchant et al. 2012. PLoS One 7:e31538), Multiple Locus Sequence Typing (MLST) (Klint et al. 2007. J Clin Microbiol 45:1410-1414), analyse des Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) du gène *omp1* ( Rodriguez et al. 1991. J Clin Microbiol 29:1132-1136).

- Séquençage du gène *omp1* des souches identifiées L2b afin de vérifier la présence de la mutation A→G (AAT Ser 162→ AGT Asp) spécifique de la souche épidémique L2b ( Spaargaren et al. Emerg Infect Dis 11:1090-1092).

## - Bases de données de séquences

Notre laboratoire utilise, entre autre, la technique de MLST développée par Bjorn Herrmann (Uppsala Univ, Sweden) pour le typage moléculaire des souches de *C. trachomatis* (Klint et al. 2007. J Clin Microbiol 45:1410-1414). Celle-ci cible cinq régions géniques ainsi que le gène *ompA*. Chaque nouvel allèle est répertorié dans la base de données publique dédiée à cette technique (<http://mlstdb.bmc.uu.se/>). Les nouveaux variants alléliques que nous avons identifiés ont été déposés dans cette banque de données.

## Mycoplasmes urogénitaux

### ***Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis***

## - Liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

Cette liste ne concerne que des techniques de détection directe car il n'existe pas de sérologie recommandée et utilisable pour le diagnostic des infections à mycoplasmes urogénitaux.

### • Techniques phénotypiques

- Culture en milieu liquide et solide des quatre espèces de mycoplasmes urogénitaux (Waites et al. 2001. Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. American Society for Microbiology, Washington D. C).

Les souches cliniques de *M. genitalium* n'étant que très exceptionnellement cultivées en raison du caractère extrêmement fastidieux de cette espèce, les tests phénotypiques suivants ne concernent que les mycoplasmes urogénitaux *Ureaplasma spp.* et *M. hominis*.

- Galerie de détection, d'identification, de numération et de sensibilité aux antibiotiques : MYCOFAST Revolution (laboratoire ELITech).

- Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF de *Ureaplasma spp.* et *M. hominis* (Pereyre et al. 2013. J Clin Microbiol 51:3314-3323).

- Détermination des concentrations minimales inhibitrices par dilution en milieu liquide de tous les antibiotiques potentiellement actifs sur les mycoplasmes selon le CLSI (Waites et al. 2011. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA)).

### • Techniques moléculaires « maison » et kits commercialisés

- Le diagnostic moléculaire de *M. genitalium* par PCR en temps réel est réalisé avec le kit cobas ® MG/TV détectant *M. genitalium* et *Trichomonas vaginalis* sur la plateforme cobas ® 6800 (Roche diagnostics).

- PCR en temps réel de détection spécifique de *M. hominis* (Férandon et al. 2011. Clin Microbiol Infect 17:155-159.), de *U. parvum* et *U. urealyticum* (Yi et al. 2005. 19:255-260).

- PCR spécifique du genre *Mycoplasma* ciblant l'ARN ribosomique (van Kuppefeld et al. 1992. Appl Environ Microbiol 58:2606-2615.) pour la détection d'espèces peu courantes de mycoplasme dans les échantillons humains. L'identification d'espèce est ensuite réalisée par séquençage du produit d'amplification et comparaison des séquences obtenues avec les banques de données.

- Pour l'évaluation moléculaire de la sensibilité aux anti-infectieux : PCR ciblant le gène *tet(M)* et recherche de mutations de l'ARNr 16S pour l'étude de la résistance aux tétracyclines (Dégrange et al. 2008. Antimicrob Agents Chemother 52:742-744; Dégrange et al. 2008. Antimicrob Chemother 61:1390-1392), amplification et le séquençage des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* pour l'étude de la résistance aux fluoroquinolones au niveau des QRDR-Quinolone Resistance Determining Regions- (Bébéar et al. 2003. Antimicrob Agents Chemother 47:3323-3325; Bébéar et al. 1999. Antimicrob Agents Chemother 43:954-956; Le Roy et al. 2016. Emerg Infect Dis 22:1677-1679), recherche de mutations de l'ARNr 23S associées à la résistance aux macrolides par amplification et séquençage (Pereyre et al. 2002, Antimicrob Agents Chemother 46:3142-3150; Chrisment et al. J Antimicrob Chemother 67:2598-2601) ou par méthode de PCR en temps réel de type FRET (Touati et al. 2014. J Clin Microbiol 52:1549-1555).

- Kit de PCR en temps réel commercialisé : PCR en temps réel de détection de *M. genitalium* et des mutations associées à la résistance aux macrolides ResistancePlus™ MG (Speedx, Australie).

## - Liste des techniques disponibles pour le typage

- Typage moléculaire de *M. hominis* par MLVA (Férandon et al. 2013. BMC Microbiol 13:120).
- Typage moléculaire de *M. genitalium* par analyse des SNPs du gène *mgpB* (MG191) combinée à l'analyse d'un marqueur VNTR dans le gène *mg309* (Cazanave et al. 2012. J Med Microbiol 61:500-506).

#### - Bases de données de séquences

Notre laboratoire a publié le génome de la souche type de *M. hominis* (*M. hominis* PG21) disponible dans GenBank (FP36530). Par ailleurs, la souche type de *M. genitalium* (*M. genitalium* G37) et les 14 sérovars de *Ureaplasma* spp. sont aussi disponibles dans GenBank.

Notre laboratoire consigne les séquences du gène *mgpB* (MG191) de *M. genitalium* utilisées pour le typage de *M. genitalium*. Tout nouvel allèle est répertorié et déposé dans GenBank. Un total de plus de 100 allèles est répertorié à ce jour.

### 2.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Le laboratoire est équipé des matériels nécessaires pour les cultures de gonocoques, l'identification, le stockage et l'étude de la sensibilité des gonocoques.

#### - Liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

- Recherche directe par culture
  - Microscopie & coloration de Gram
  - Culture en milieux solides qui reste la méthode de référence (nomenclature) pour le diagnostic
- Technique d'identification phénotypique classique (caractères cultureux, morphologiques, biochimiques et profil protéique) et identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF
- Techniques directes par amplification d'acides nucléiques (TAAN)
  - Kit commercialisé marqué CE-IVD détectant *C. trachomatis* / *N. gonorrhoeae* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* sur la plateforme extracteur-amplificateur automatisé et Cobas 6800 (Roche) depuis mai 2018
  - Kit CT/NG Xpert (Cepheid) détectant *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et sa résistance aux macrolides depuis fin 2019
- Techniques d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

Le CNR pratique sur chaque souche reçue un antibiogramme par diffusion et une étude de 8 concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode E-test. Les concentrations critiques de *N. gonorrhoeae* sont précisées dans le communiqué annuel du CA-SFM version janvier 2019 : <http://www.sfm.asso.fr/>.

#### - Techniques disponibles pour le typage

- Typage moléculaire par méthode NG-MAST (amplification séquençage des gènes *porB* et *tbpB*) qui est la technique de typage de référence effectuée suivant les recommandations internationales (Belkacem A, et al, Antimicrob Chemother 71:2471-2478; Unemo et al, Clin Microbiol Rev 24:447-458)
- Typage moléculaire par MLST qui est basée sur l'amplification nucléotidique et le séquençage de fragments de 7 gènes de ménages (*abcZ*, *adh*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdh* et *pgm*) qui permet de comparer des souches plus éloignées dans le temps (Belkacem A, et al, Antimicrob Chemother 71:2471-2478; Unemo et al, Clin Microbiol Rev 24:447-458))
- PCR nichée « maison » / séquence pour le génotypage de *N. gonorrhoeae* sur prélèvements cliniques TAAN positifs ciblant les gènes *porB* et *tbpB*.
- NGS sur colonies et extraction *in silico* du core genome sur colonies

#### - Techniques disponibles pour l'étude de la résistance aux antibiotiques

- Extraction de l'ADN bactérien de *N. gonorrhoeae* : kit InstaGene Matrix (Bio-Rad)
- Extraction du contenu plasmidique de *N. gonorrhoeae* (gros et petits plasmides)
  - Technique de (Kieser, Plasmid 12:19-36.)
  - Kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep
- Séquençage des plasmides par PCR par chevauchement

- Séquençage du gène *penA* par PCR par chevauchement
- Détection des gènes *bla*<sub>TEM</sub>
- Détection des mutations dans les QRDR *gyrA* et *parC*
- Détection des mutations dans les QRDR *gyrB* et *parE*
- Détection du gène *aac(6')-Ib-cr* (Fihman V, J Infect 2008 ;56:454-459).
- Détection des mutations dans les 4 allèles de l'ARNr 16S et 23S
- Détection des mutations des gènes de la pompe d'efflux *mtrCDE* et du répresseur *mtrR*
- Détection des mutations des protéines S10, L4, L22
- Détection du transposon portant le gène *tet(M)*
- Détection des mutations dans les gènes *ftsX*, *pilQ*, *ponA*, *penB*
- Détection des gènes de résistance acquis impliqués dans la résistance aux macrolides (*mefA*, *erm*, *ere* et *mphA*)
- PCR nichée de typage de *porB* et *tbpB*
- Pyrosequencing sur prélèvement pour la détection des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*
- 3 PCR spécifiques du génome de *N. gonorrhoeae* pour la détection des principaux déterminants de résistance aux cyclines sur prélèvements cliniques TAAAN positifs ciblant les gènes *tet(M)*, *rspJ*, *mtrR* et sa région promotrice.

#### **-Technique de séquençage haut débit à partir des cultures**

Extraction, séquençage haut débit sur Miseq (Illumina) et extraction des séquences cibles (Poncin et al, Eurosurveil 2017 et 2019)

#### **- Bases de données de séquences**

Cf chapitre collections de génomes.

### **2.1.3 Laboratoire APHP Cochin**

- Tous les tests sérologiques commerciaux utilisés dans le cadre du diagnostic de la syphilis sont accrédités et indiqués ci-dessous

Test non tréponémiques : VDRL, RPR (BioRad)

Test tréponémiques : TPHA (BioRad)

ELISA Ig totaux (Architect)

Immunoblot (IgG/IgM Ingen)

- Détection du génome de *T. pallidum* par nested PCR -nPCR- (Grange *et al.*, 2012. J Clin Microbiol. 50 :546-552).
- Détection de la résistance aux macrolides (mutation A2058G) par PCR-RFLP (Lukehart SA *et al.* 2004. N Engl J Med. 351:154-8 et Matejková P *et al.* 2009. J Med Microbiol. 58:832-6)

## **2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR**

Les 3 laboratoires du CNR IST recommandent les techniques qu'ils utilisent (cf 2.1).

## Annexes

### Réseau de surveillance des ano-rectites à *Chlamydia trachomatis* (CT) Résultats en France : Bilan 2010- 2018



CNR des IST bactériennes. CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin  
Laboratoire de bactériologie, Place Amélie Raba Léon 33076 BORDEAUX CEDEX  
Tél : 05 57 57 16 33 / 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40  
Site Web: <https://www.cnr-ist.fr/>

## 1. Réseau de surveillance

Fig 1 : Coordination du réseau de surveillance des ano-rectites à *Chlamydia trachomatis*

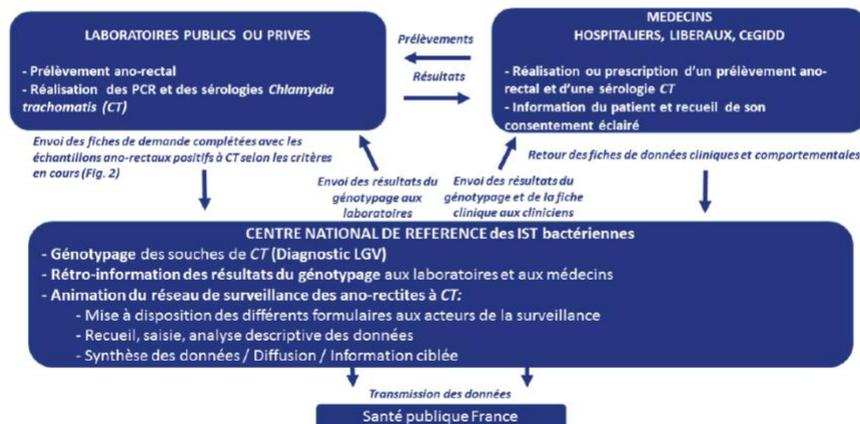
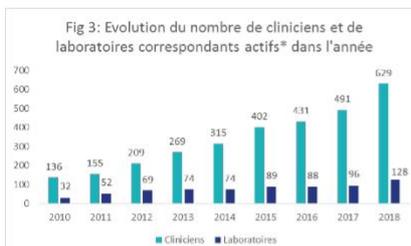
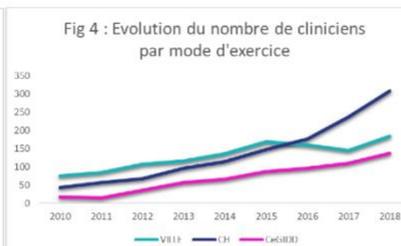


Fig 2 : Évolution des critères de typage



\* Cliniciens ou laboratoires ayant envoyé au moins un prélèvement pour diagnostic de LGV



La surveillance des ano-rectites à CT (Fig.1), basée sur le recueil des données microbiologiques et cliniques, a été mis en place dans le but de décrire les tendances et les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de ces ano-rectites.. L'analyse descriptive de ces données permet d'identifier les facteurs de risque, d'adapter la prévention et de faire une information ciblée aux personnes concernées.

Le réseau de surveillance des ano-rectites est animé par le CNR des IST bactériennes et repose sur la participation volontaire des cliniciens et des laboratoires qui envoient leurs échantillons ano-rectaux CT positifs au CNR pour diagnostic de LGV. Il présente une très bonne dynamique. En effet, 368 laboratoires ont participé au réseau depuis 2010 et, en 2018, nous en accueillons 69 nouveaux (Fig. 3). Dix laboratoires participent depuis le lancement du réseau et envoient 50 % des échantillons.

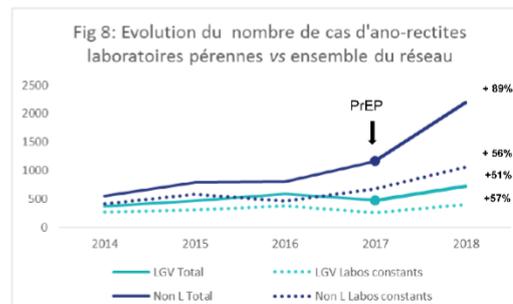
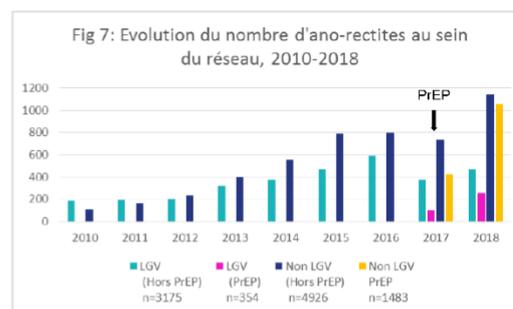
En 2018, 327 nouveaux médecins ont été sollicités et le réseau compte désormais 1508 correspondants. Un total de 630 cliniciens a participé au réseau de surveillance en 2018 dont 46,6 % sont situés en Ile-de-France. L'augmentation du nombre de cliniciens est importante par rapport à 2017, et ce, quel que soit le mode d'exercice, + 30 % pour les hospitaliers, + 28 % pour les libéraux et + 25 % pour les médecins exerçant en CeGIDD (Fig. 4).

Les spécialités médicales représentées en 2018 sont les Maladies infectieuses (34 %), la Médecine générale (22 %), les CeGIDD (19 %), la Gastro-entérologie / Proctologie (12 %), la Dermatologie / Vénérologie (3 %), autres (11 %) (Fig. 5).

Le taux de retour des fiches de recueil des données cliniques et comportementales atteint 61 % en 2018 et est en baisse par rapport aux années antérieures (71% en 2017).

## 2. Épidémiologie des ano-rectites à *Chlamydia trachomatis*

Fig 6 : Répartition géographique des cas de LGV au sein du réseau en 2018 (n=722)



Toutes les régions de France métropolitaine et La Réunion en Outre-mer sont représentées (Fig. 6).

Depuis 2010, 9938 échantillons (93 %) sur les 10686 reçus ont pu être génotypés, soit 3529 (35,5 %) souches L et 6409 (64,5 %) souches non L. En 2018, 3155 échantillons ont été reçus, dont 722 (22,9 %) souches L, 2198 (69,6 %) souches non L et 235 (7,4 %) non amplifiés. La limitation de nos indications de typage aux patients VIH+ et/ou symptomatiques, s'était traduite par une stabilisation des cas non LGV entre 2015 et 2016. Mais l'inclusion des patients sous Prophylaxie Pré-Exposition (PrEP) a entraîné une augmentation des cas non LGV de 45,3 % en 2017, qui s'amplifie en 2018 (+89 %). La décroissance du nombre de cas de LGV observée en 2017 ne s'est pas confirmée en 2018 où nous observons à nouveau une hausse de 51,4 % (Fig. 7).

L'analyse des tendances en prenant uniquement en compte les 10 laboratoires qui participent régulièrement, valide les observations pour les cas de LGV, avec une augmentation de 57 % pour ces laboratoires pérennes versus 51 % pour l'ensemble du réseau. Pour les souches non L, l'augmentation sur l'ensemble du réseau est de 89% alors qu'elle n'est que de 56 % sur les laboratoires constants (Fig. 8).

En 2018, les patients atteints de LGV sont des hommes (99,9 %) ou des transsexuels (0,1%) habitant en Ile de France dans 62,6 % des cas. L'âge moyen est de 39,6 ans [20-80]. Sur les 1067 patients VIH+, 31,9% ont une LGV et sur les 908 patients présentant des symptômes, 44,16 % ont une LGV. Le taux de LGV est stable chez les PrEPeurs, 18,9 % en 2017 vs 19,4 % en 2018 (p>0,05). Parmi les PrEPeurs, sur les 27,72 % symptomatiques, 45,1 % ont une LGV vs 8,7 % chez les asymptomatiques. **Le caractère symptomatique doit faire évoquer une LGV quel que soit le statut VIH.** Parmi les patients atteints de LGV acceptant de déclarer leur orientation sexuelle (408/722), 92,3 % sont HSH exclusifs, 6,6 % sont HSH non exclusifs et 1,1 % sont hétérosexuels. Un partenaire occasionnel est à l'origine de la contamination dans 90 % des cas et 48,9 % (125/257) des patients acceptant de répondre (257/722), admettent avoir eu plus de 5 partenaires dans le mois précédant la contamination. Une co-infection avec une syphilis active ou la présence d'une syphilis cicatricielle est retrouvée dans 58,8 % des cas renseignés et 29,9 % des patients porteurs de souche L présentent une co-infection à gonocoque.

## 3. Perspectives

L'analyse des données montre une hausse exponentielle des souches non L liée à l'inclusion des PrEPeurs. Compte tenu du trop grand nombre de prélèvements reçus, le CNR limite les typages dans un but diagnostique pour l'année 2019 :

- aux patients séropositifs pour le VIH, symptomatiques ou non,
- et aux patients séronégatifs pour le VIH, uniquement symptomatiques.

Des trousse commercialisées marquées CE-IVD pour le diagnostic des souches de *C. trachomatis* de génotype L sont en cours d'évaluation au CNR et permettront de mettre le diagnostic de la LGV à disposition des laboratoires.

**Les biais de sélection inhérents à la limitation des typages ne permettent plus l'analyse épidémiologique des cas de LGV.**

Pour le suivi des tendances, le CNR des IST proposera, dans le cadre de ses missions de surveillance épidémiologique, des enquêtes ponctuelles annuelles, dont les critères d'inclusion seront déterminés en fonction des objectifs.

### Remerciements

Nous remercions pour leur participation active au réseau de surveillance des ano-rectites à *Chlamydia trachomatis*

✦ Tous les biologistes des laboratoires hospitaliers et privés, ainsi que leurs équipes

✦ Tous les médecins spécialistes, les médecins généralistes et les médecins exerçant dans un Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST (CeGIDD)

### L'équipe du CNR

Cécile LAURIER NADALIE, Arabella TOUATI, Olivia PEUCHANT, Cécile BEBEAR, Bertille de BARBEYRAC

### Santé publique France

Ndeindo NDEIKOUNDAM, Florence LOT

# Épidémiologie des infections urogénitales à *C. trachomatis* et résistance de *Mycoplasma genitalium* aux antibiotiques en Outre-mer en 2018

1 août-31 octobre 2018



**CNR**  
des IST bactériennes



CNR des IST bactériennes. CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin  
Laboratoire de Bactériologie, Place Amélie Raba Léon 33076 BORDEAUX CEDEX  
Tél : 05 57 57 16 33 / 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40  
Site Web: <http://www.cnr-ist.fr/>

## Épidémiologie des infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis*

### Objectifs :

Typage des souches de *Chlamydia trachomatis* (Ct) responsables d'infections urogénitales pour étudier les génotypes (sérovarys) des souches circulantes en Outre-mer.

### Matériels et méthodes :

Du 15 septembre au 15 octobre 2018, tous les échantillons urogénitaux (urine, vagin, col) positifs à *C. trachomatis* ont été adressés au CNR par transporteur. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier excel. Le typage moléculaire de *C. trachomatis* a été fait par une PCR nichée amplifiant le gène *omp1* directement à partir de l'échantillon biologique (1) suivie par un séquençage des produits d'amplification (Eurofins Genomics). La détermination du génotype a été faite par alignement Blast des séquences analysées.

### Résultats:

Au total, 847 échantillons urogénitaux de 847 patients (71,1 % femmes et 28,9 % homme) d'âge médian 24 ans ont été analysés (Fig 1). L'âge des hommes et des femmes n'était pas statistiquement différent ( $p > 0,05$ ; test de Student).

Le typage par séquençage du gène *omp1* a été fructueux sur 581 échantillons (70,1 %). Globalement les génotypes se distribuaient de la manière suivante : E > D/Da > F > G > J/Ja > H/I/Ia/K > A/B sans différence significative entre les hommes et les femmes.

Les territoires d'Outre-mer ont été regroupés par zones, océan Atlantique (Fig 2), océan Indien (Fig 3), océan Pacifique (Fig 4) et les résultats comparés à ceux de la France métropolitaine obtenus en 2017 (n=772), (2).

Quelques différences de distribution étaient à noter :

- En Outre-mer (excepté en Guadeloupe) les souches D/Da étaient plus prévalentes qu'en France métropolitaine respectivement 20,1 % (117/581) vs 9,2 % (701/772) ( $p < 0,001$ ).
- La distribution la plus proche de la France était celle de la Réunion.
- Dans l'océan Indien, les souches de génotype A, décrites dans le trachome, représentaient respectivement 18 % (16/89) et 1,8 % (5/275) des génotypes présents à Mayotte et à la Réunion. Ce génotype n'a pas été retrouvé dans les autres territoires.
- Les souches de la zone océan Pacifique, se différenciaient par la présence de 29,4 % (15/51) de souches G en Polynésie vs 9,6 % (51/530) dans les autres zones et 9,9 % en Métropole (77/772) ( $p < 0,05$ ). De même, en Nouvelle Calédonie les souches J/Ja représentaient 27,3 % (21/77) des prélèvements vs moins de 5% dans les autres territoires d'Outre-mer et en Métropole ( $p < 0,001$ ).

### Conclusion:

Même si globalement la répartition des souches reste identique en France métropolitaine et dans les territoires d'Outre-mer, quelques différences sont à souligner, plus particulièrement avec les souches de l'océan Pacifique, zone la plus éloignée de la France métropolitaine.

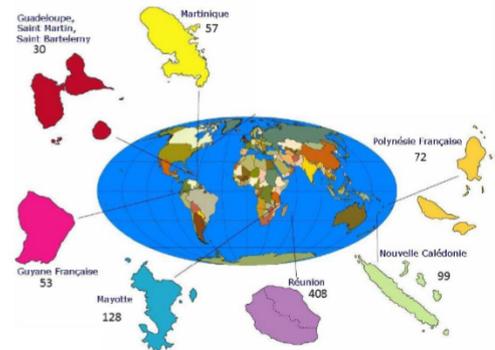


Figure 1: Répartition des échantillons

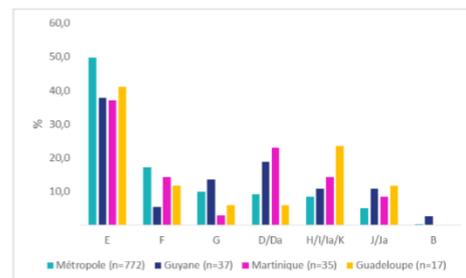


Figure 2: Océan Atlantique

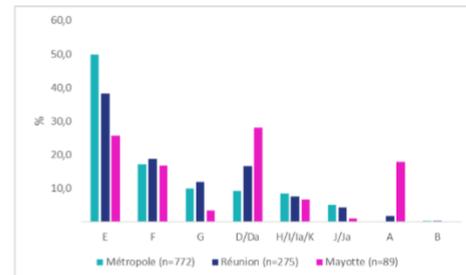


Figure 3: Océan Indien

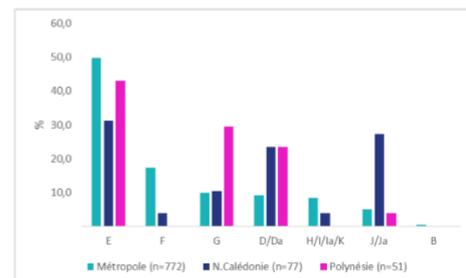


Figure 4: Océan Pacifique

## Résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones

### Objectif:

Évaluation de la prévalence de la résistance de *Mycoplasma genitalium* (Mg) aux macrolides et aux fluoroquinolones en Outre-mer.

### Matériels et méthodes:

Du 1<sup>er</sup> aout au 31 octobre 2018, tous les échantillons positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et pharyngés) ont été adressés au CNR par transporteur. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme. La résistance aux macrolides a été recherchée par PCR en temps réel de type FRET (3) ou par PCR multiplex commercialisée (4) en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET. Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à une amplification et un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature de la mutation (5). Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *parC* (6).

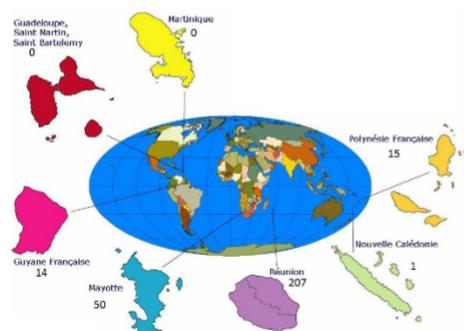


Fig 1: Répartition des échantillons

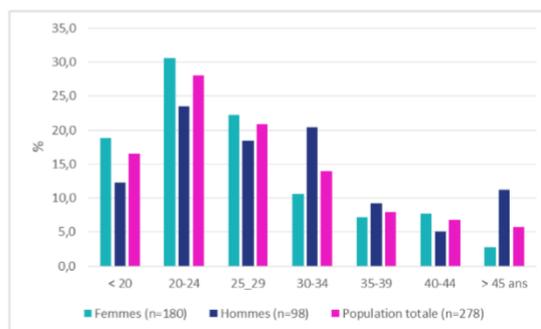


Fig 2: Distribution par classe d'âge des échantillons positifs à Mg

### Résultats:

Un total de 287 échantillons positifs à *M. genitalium* a été reçu de 6 centres sur 5 territoires (Fig 1).

Les 287 échantillons provenaient de 287 patients (65,5 % femmes et 34,5 % d'hommes). L'âge médian des 278 patients testés était de 26 ans. Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 29,9 ans vs 26,7 ans ( $p < 0,05$ ; test de Student). La classe d'âge la plus représentée était la classe 20-24 ans (Fig 2).

Parmi les 235 échantillons pour lesquels une amplification a été obtenue, 94 % (221/235) étaient sensibles aux macrolides tandis que 5,9 % (14/235) d'entre eux étaient résistants. Treize des 14 échantillons résistants étaient issus de la Réunion (8 femmes et 5 hommes) et un de la Guyane française (1 femme).

Parmi les 239 échantillons analysés par séquençage du gène *parC*, 96,2 % (230/239) ne présentaient pas de mutation dans la QRDR du gène *parC* tandis que 3,8 % (9/239) étaient mutés. Dans cette étude, il n'y avait pas de patients présentant une double résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones.

### Conclusion:

Ces données concernent essentiellement La Réunion et Mayotte et y montrent une **prévalence faible (5,9 %) de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides en 2018**. Cette valeur contraste avec la prévalence de 43 % observée en métropole à la même période ( $p < 0,001$ ) (7).

La prévalence des mutations dans le gène *parC*, cible des fluoroquinolones, est aussi plus faible en Outre-mer (3,8 %) qu'en France métropolitaine (17,9 %) ( $p < 0,001$ ) (7).

Un usage différent des antibiotiques dans les populations étudiées pourrait être à l'origine de ces différences de résistance. De plus, certains échantillons provenant de métropole étaient issus de population à haut risque d'IST, une disparité de sélection peut donc également expliquer cet écart.

### Références

1. Lan J, Ossewaarde JM, Welbooms JM, Meijer CJ, Van den Brule AJ. 1994. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. *J Clin Microbiol* 32 :528-530.
2. Rapport annuel d'activités 2017. CNR des IST bactériennes. [https://www.cnr-ist.fr/ressources/editeur/rapport\\_CNR\\_IST\\_2017.pdf](https://www.cnr-ist.fr/ressources/editeur/rapport_CNR_IST_2017.pdf)
3. Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar C, Pereyre S. 2014. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 52:1549-1555.
4. Le Roy C, Hénin N, Bébéar C, Pereyre S. 2017. Evaluation of a commercial multiplex quantitative PCR (qPCR) assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance-associated mutations in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 55:978-979.
5. Chritsmet D, Charron A, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar C. 2012. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France. *J Antimicrob Chemother* 67:2598-2601.
6. Le Roy C, Hénin N, Pereyre S, Bébéar C. 2016. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in France. *Emerg Infect Dis* 22:1677-1679.
7. Rapport annuel d'activités 2018. CNR des IST bactériennes. [https://www.cnr-ist.fr/ressources/editeur/rapport\\_CNR\\_IST\\_2018.pdf](https://www.cnr-ist.fr/ressources/editeur/rapport_CNR_IST_2018.pdf)

### Remerciements

Nous remercions pour leur participation tous les biologistes des laboratoires hospitaliers et privés, ainsi que leurs équipes.

### L'équipe du CNR IST bactériennes - Bordeaux

Cécile Bébéar, Bertille de Barbeyrac, Sabine Pereyre, Olivia Peuchant, Cécile Laurier-Nadalié, Arabella Touati, Marie Gardette, Chloé Le Roy, Angélique Alonso-Marrau, Nadège Hénin, Elodie Ladeveze, Laura Albuher.

# Résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones et sensibilité aux antibiotiques des souches de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*

-15 septembre au 15 octobre 2018 -



**CNR**  
des IST bactériennes



CNR des IST bactériennes. CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin  
Laboratoire de Bactériologie, Place Amélie Raba Léon 33076 BORDEAUX CEDEX  
Tél : 05 57 57 16 33 / 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40  
Site Web: <http://www.cnr-ist.fr/>

## Résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones



Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par ville.

### Population étudiée

Un total de 339 échantillons provenant de **335 patients** ont été reçus de **20 centres** (194 hommes, 141 femmes).

L'âge moyen des patients était de **31,3 ans**, les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 35,2 ans vs 26,1 ans ( $p < 0,001$ ; test de Student). La classe d'âge la plus représentée était la classe 21-25 ans chez les femmes (37,6 %) et 26-30 ans chez les hommes (23,8 %).

Les principaux services prescripteurs étaient :

- Les services de maladies infectieuses (21,3 %)
- Les cabinets et services de gynécologie (20,6 %)
- Les cabinets de médecine générale (18,4 %).

Les dépistages systématiques représentaient le principal motif de consultation (46,6%), suivi des plaintes pour symptômes génitaux (29,3 %).

Parmi les patients ayant accepté de renseigner leur orientation sexuelle, **71,4 %** (50/70) déclaraient avoir des **pratiques hétérosexuelles**. Sur les 31 hommes ayant déclaré leurs pratiques, 58,1% (18/31) étaient des hommes ayant des relations sexuelles avec les hommes.

Parmi les patients pour lesquels nous avons le statut VIH, une séronégativité était notée pour 65,6 % (101/154) des patients, tandis que **34,4 % (53/154) d'entre eux étaient séropositifs au VIH**. Le statut sérologique au VIH était inconnu pour 54 % (181/335) des patients. Une différence statistiquement significative était à noter entre les hommes et les femmes ; 43,7 % des hommes (52/119) pour lesquels nous avons le statut VIH étaient VIH positifs contre 2,9 % des femmes (1/35) ( $p < 0,001$ ; test de Chi<sup>2</sup>).

### Objectifs:

Détermination de la prévalence en France métropolitaine de la résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones.

### Matériels et méthodes:

Dans les centres participants, pendant un mois du 15 septembre au 15 octobre 2018, tous les échantillons positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge) ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier comportant le sexe, la date de naissance, la nature de l'échantillon, le service demandeur, la notion de dépistage et de symptômes, le traitement antérieur par macrolides.

La résistance aux macrolides a été recherchée par PCR en temps réel de type FRET (1) ou par une PCR multiplex commercialisée (2) en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET. Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à une amplification et un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature précise de la mutation (3). Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *parC* (4).

10,9 % de double résistance

### Prévalence de la résistance aux macrolides

Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **43%** (116/270) étaient résistants aux macrolides.

La prévalence de la résistance aux macrolides était de **58,8 % chez les hommes** (94/160) versus **18,5 % chez les femmes** (20/108) ( $p < 0,001$ ; test du Chi<sup>2</sup>).

Les mutations A2058G et A2059G (numérotation *Escherichia coli*) étaient les plus fréquentes (71,5 % des cas).

### Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **17,9 % (47/162) étaient résistants aux fluoroquinolones sans différence entre les hommes et les femmes**. Sept mutations différentes étaient retrouvées dans la QRDR du gène *parC*.

### Conclusion

La prévalence de la résistance aux **macrolides** chez *M. genitalium* a atteint **43 %**, valeur **très élevée, inquiétante mais stable**. Ces chiffres confirment les résultats de notre enquête réalisée en 2017 sur un plus petit échantillon (prévalence de 42,6 %).

La résistance aux **fluoroquinolones**, de **17,9 %**, est en **nette augmentation** puisque nous décrivions une prévalence de 7,5 % en 2017. Près de **11 % des patients présentaient une double résistance**, à noter que 83,3 % (20/24) d'entre eux étaient des hommes.

## Détermination des CMI des antibiotiques vis-à-vis de *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma* spp.

### Objectifs:

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*.

### Matériels et méthodes:

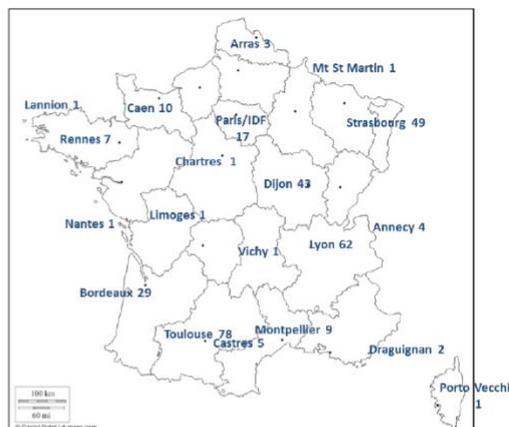
Pour les laboratoires cultivant *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, les échantillons positifs en culture ont été collectés entre le 15 septembre et le 15 octobre 2018, conservés à -20°C puis envoyés au CNR via un transporteur (BioLogistic).

La mise en culture des échantillons cliniques a été réalisée dans du milieu Hayflick arginine pour isoler *M. hominis* et dans du milieu Shepard pour isoler *Ureaplasma* spp. Les CMI des souches ayant pu être isolées par culture ont été déterminées selon la méthode du CLSI (5).

### Population étudiée

Un total de 325 échantillons cliniques positifs à *Ureaplasma* spp. et/ou *M. hominis* ont été collectés en France métropolitaine. Parmi eux, 131 ont permis d'obtenir une souche soit 40,3% (111 souches de *Ureaplasma* spp. et 20 souches de *M. hominis*).

L'âge moyen était de 32 ans et l'âge médian de 31 ans (avec une amplitude de 1 mois à 84 ans). Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 35 ans vs 29,6 ans ( $p < 0.001$ ; test de Student).



Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par ville

Type de prélèvement	<i>M. hominis</i>	<i>U. parvum</i>	<i>U. urealyticum</i>	<i>U. parvum</i> et <i>U. urealyticum</i>	Total
Sperme	7	40	22	3	72
Vaginal	7	13	4	1	25
Endocol	3	12	2	3	20
Débris placentaires	2	5	-	-	7
Urines	1	2	2	-	5
ORL	-	2	-	-	2
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>74</b>	<b>30</b>	<b>7</b>	<b>131</b>

Centres	Nombre de souches isolées par centre	
	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.
BIO 67 Strasbourg	0	1
CERBA	4	15
CH Caen	1	5
CHU Bordeaux	5	26
CHU Dijon	0	19
CHU Limoges	0	0
CHU Louis Mourier	0	0
CHU Lyon	5	19
CHU Montpellier	0	0
CHU Nantes	1	1
CHU Rennes	1	2
CHU Toulouse	1	17
Clinique Pasteur	2	6
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>111</b>

Antibiotique	<i>M. hominis</i>			<i>Ureaplasma</i> spp.		
	CMI 50	CMI 90	% résistance* [IC 95 %]	CMI 50	CMI 90	% résistance* [IC 95 %]
Tétracycline	0,25	0,5	5 [0,9-23,6]	0,25	1	2,7 [0,9-7,6]
Doxycycline	0,06	0,125	NA	0,125	0,25	NA
Lévofloxacine	0,25	0,5	0	0,5	1	5,4 [2,5-11,3]
Moxifloxacine	0,06	0,06	0	0,25	0,5	0
Erythromycine	ND	ND	ND	0,5	1	0
Azithromycine	ND	ND	ND	0,5	0,5	0
Clindamycine	0,06	0,125	0	ND	ND	ND

ND, non déterminé, NA, non applicable (pas de concentrations critiques).

\* Pas de différence de résistance entre hommes et femmes.

### Mécanismes de résistance:

Concernant la résistance à la tétracycline, les quatre souches résistantes (1 *M. hominis* et 3 *Ureaplasma* spp.) possédaient le gène *tet(M)*.

Concernant la résistance aux fluoroquinolones, les six souches d'*Ureaplasma* spp. résistantes à la lévofloxacine ont été analysées par PCR/séquençage des QRDRs des gènes *gyrA/gyrB/parC/parE*. Elles possédaient une mutation Ser83(80)Leu dans la protéine ParC (numérotation *Ureaplasma* spp. avec numérotation *E. coli* entre parenthèses).

### Conclusion

Pour *M. hominis*, la prévalence de la résistance à la tétracycline était de 5%. Il n'y avait pas de résistance ni aux fluoroquinolones ni à la clindamycine.

Pour *Ureaplasma* spp., la prévalence de la résistance à la tétracycline était de 2,7%. La résistance à la lévofloxacine était de 5,4%. Aucune résistance à la moxifloxacine et à l'érythromycine n'ont été retrouvées.

**Les CMI retrouvées sont celles attendues pour des souches sauvages et les taux de résistance sont faibles.**

### Références

- Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar C, Pereyre S. 2014. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol 52:1549-1555.
- Le Roy C, Hénin N, Bébéar C, Pereyre S. 2017. Evaluation of a commercial multiplex quantitative PCR (qPCR) assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance-associated mutations in clinical specimens. J Clin Microbiol 55:978-979.
- Chrismet D, Charron A, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar C. 2012. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France. J Antimicrob Chemother 67:2598-2601.
- Le Roy C, Hénin N, Pereyre S, Bébéar C. 2016. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in France. Emerg Infect Dis 22:1677-1679.
- Waites KB, Bade DJ, Bébéar C, S.D. B. Davidson M, Duffy LB, Kenny GE, Matlow A, Shortridge D, Talkington DF, Totten PA, Watts JL, Zheng X. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas - Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (PA).

### Remerciements

Nous remercions pour leur participation tous les biologistes des laboratoires hospitaliers et privés, ainsi que leurs équipes.

### L'équipe du CNR IST bactériennes - Bordeaux

Cécile Bébéar, Sabine Pereyre, Cécile Laurier-Nadalié, Chloé Le Roy, Marie Gardette, Nadège Hénin, Laura Olazabal.

Les 2 annexes suivantes ont été élaborées afin de donner une définition des cas MDR ou XDR en France et les mesures à prendre si le cas se présente (d'après l'ECDC MDR/XDR *N.gonorrhoeae* response plan, Gianfranco Spiteri).

## Annexe : Etapes pour signaler un isolat de *N. gonorrhoeae* MDR, XDR ou résistant à la ceftriaxone

### 1/ Définition des souches MDR et XDR

Les antibiotiques utilisés pour le traitement des gonorrhées sont regroupés en 3 catégories.

- Catégorie I : antibiotiques actuellement recommandés en général pour le traitement de la gonorrhée
- Catégorie II : antibiotiques désormais moins utilisés ou proposés pour un usage plus étendu
- Catégorie III : autres antibiotiques désormais dépassés ou considérés comme inappropriés

Les souches de gonocoques sont considérées comme MDR s'ils sont résistants à une des molécules classées en classe I ou au moins 2 antibiotiques et plus dans la catégorie II

Les souches de gonocoques sont considérées comme XDR s'ils sont résistants à au moins 2 antibiotiques de la catégorie I et au moins 3 dans la catégorie II.

### Tableau. Classification des antibiotiques en traitement courant, proposé pour l'utilisation ou peu utilisé pour le traitement de la gonorrhée.

Classe I :	- Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération Injectables : ceftriaxone, ou autres moins fréquemment utilisés comme cefotaxime Orales : céfixime, ou autres moins fréquemment utilisés comme cefpodoxime -Azithromycine
Classe II	Pénicillines Fluoroquinolones (la ciprofloxacine étant le plus fréquemment utilisée) Aminosides (la gentamicine étant proposée comme traitement) Spectinomycine (pas disponible dans tous les pays) Carbapénèmes
Classe III	Tétracyclines Rifampicine Chloramphénicol et thiamphénicol Cotrimoxazole Erythromycine

### 2. Signalement des souches MDR et XDR

Une fois qu'un échec de traitement dû à un isolat de NG MDR/XDR est confirmé ou qu'un isolat XDR ou résistant à la ceftriaxone a été détecté par d'autres moyens tels que la surveillance ou les diagnostics primaires, il est important que les détails soient communiqués en temps réel par les canaux appropriés.

Chaque pays peut avoir une structure de notification différente, mais la réponse peut être basée sur les suggestions suivantes :

- S'assurer que des données épidémiologiques détaillées, y compris les antécédents de voyage du patient et de son partenaire sexuel récent, sont collectées pour chaque cas confirmé.
- S'il y a plusieurs cas ou si l'isolat a un profil de résistance aux antibiotiques exceptionnel, envisager de réunir une équipe locale d'intervention pour enquêter sur la gestion clinique, l'épidémiologie et la microbiologie.
- Envisager de procéder à une évaluation rapide des risques afin de s'assurer que le risque de propagation est évalué et atténué.
- Alerter les réseaux locaux et nationaux de laboratoires et de cliniciens et leur rappeler de suivre les directives correctes pour le dépistage, le diagnostic et la gestion de la gonorrhée.
- Informer/notifier le ministère de la santé et tout autre organisme approprié au niveau national.
- S'assurer que le service des médias est informé en cas d'intérêt des médias et préparer des réponses approuvées par les médias (lignes réactives) et le contexte, y compris les questions-réponses.
- En cas d'infection contractée à l'étranger, informer le pays concerné par le biais du système d'alerte précoce et de réaction s'il se trouve dans l'UE/EEE ou du mécanisme du règlement sanitaire international de l'OMS s'il se trouve en dehors de l'UE/EEE.
- Signaler les cas au niveau de l'UE/EEE par l'intermédiaire de l'EPIS si les critères de notification sont remplis

et de l'OMS le cas échéant.

- Envisager la publication rapide des détails du cas (par exemple, la soumission d'une communication rapide à Eurosurveillance) pour une diffusion ultérieure à la communauté internationale.
- Veiller à ce que toutes les informations permettant d'identifier le patient soient retirées des documents accessibles au public et obtenir le consentement du ou des patients pour leur publication, si possible
- Le cas échéant, fournir des conseils supplémentaires aux voyageurs et envisager d'autres interventions de santé publique, telles qu'une campagne de sensibilisation dans les médias sociaux

#### Options d'action

- S'assurer de l'accord national et de l'adoption des définitions de cas sur l'échec du traitement de la gonorrhée.
- Recueillir des données sur les échecs thérapeutiques vérifiés en matière de gonorrhée afin d'alimenter la ligne directrice européenne sur le diagnostic et le traitement de la gonorrhée et d'atténuer la propagation de la souche.
- Élaboration d'un modèle de rapport en ligne sur les échecs thérapeutiques.

#### Indicateurs

- Représentation de l'ECDC au sein du comité de rédaction de la ligne directrice européenne sur les IST.
- Accès européen à un modèle de notification en ligne des échecs thérapeutiques soutenu par l'ECDC.
- Nombre d'échecs thérapeutiques vérifiés de la gonorrhée signalée à l'ECDC

### Annexe : Fiche de recueil clinico-biologique pour signaler un échec de traitement

Informations générales	
<b>Détail du cas</b>	
Nom	
Pays qui rapporte le cas	
Nom du centre déclarant	
Téléphone	
Email	
<b>Classification de l'échec de traitement</b>	
<input type="checkbox"/> Cas confirmé sur la base de l'antibiogramme	
<input type="checkbox"/> Cas probable	
Définition de l'échec de traitement Un patient atteint de gonorrhée qui revient pour un test de guérison ou qui présente des symptômes persistants après avoir reçu un traitement pour un cas confirmé en laboratoire avec le régime recommandé (ceftriaxone 500 mg plus azithromycine 1-2g) ou un autre régime (ceftriaxone 500 mg-1000 mg en monothérapie ; céfixime 400 mg plus azithromycine 1-2g) ou spectinomycine 2g plus azithromycine 1-2g) ET Reste positif pour l'un des tests suivants de dépistage de <i>N. gonorrhoeae</i> - l'isolement de la <i>N. gonorrhoeae</i> par une culture effectuée au moins 72 heures après la fin des traitements OU -test d'amplification de l'acide nucléique (TAAN) positif, effectué 2 ou 3 semaines après la fin du traitement ET Réinfection a été exclu dans la mesure du possible ET * Résistance aux antimicrobiens utilisés pour le traitement Ceftriaxone CMI>0,125 mg/L Céfixime CMI>0,125 mg/L Type non sauvage pour l'azithromycine CMI>1 mg/L (ECOFF) * En cas d'échec confirmé du traitement, les isolats cultivés avant et après le traitement doivent présenter une résistance aux antimicrobiens administrés et être examinés par le WGS pour confirmer une séquence de génome non distinguable et la présence de déterminants de résistance pour les antimicrobiens utilisés pour le traitement.	
<b>Détail du cas</b>	
Date de la première notification d'échec de traitement du centre déclarant	

Age		
Genre		
Orientation sexuelle		
Le cas est-il susceptible d'avoir contracté l'infection dans le pays de diagnostic ?		
Si non, quel pays ?		
<b>Diagnostic et traitement – première visite</b>		
Est-ce que cas était symptomatique ?		
Site de l'infection		
Date de la première visite		
Quel test et à quel site anatomique a été réalisé pour le diagnostic	Gorge Anal Urine Vagin/col Autres	
Quels sont les résultats ?	TAAN  Cultures	
Si la culture est positive quelles sont les CMI de		<i>CMI en mg/L</i>
	<i>Ceftriaxone</i>	
	<i>Céfixime</i>	
	<i>Azithromycine</i>	
	<i>Spectinomycine</i>	
	<i>Ciprofloxacine</i>	
	<i>Gentamicine</i>	
	<i>Autres</i>	
Quel traitement a été prescrit ?	Dose Molécule Durée Mode d'administration	
<b>Diagnostic et traitement – seconde visite</b>		
Date de la seconde visite		
Quel test et à quel site anatomique a été réalisé pour le diagnostic	Gorge Anal Urine Vagin/col Autres	
Quels sont les résultats ?	TAAN  Cultures	
Si la culture est positive quelles sont les CMI de		<i>CMI en mg/L</i>
	<i>Ceftriaxone</i>	
	<i>Céfixime</i>	
	<i>Azithromycine</i>	
	<i>Spectinomycine</i>	
	<i>Ciprofloxacine</i>	
	<i>Gentamicine</i>	
	<i>Autres</i>	
Quel traitement a été prescrit ?	Dose Molécule Durée	

	Mode d'administration
Est-ce le test of cure a été réalisé avant de traiter à nouveau	
Si oui quel test a été utilisé et quel est le résultat ?	TAAN Cultures
Le réseau IST doit-il apporter son soutien à des études de laboratoire plus poussées ?	
Veillez fournir une brève description des circonstances de l'événement et des mesures de santé publique prises, notamment en ce qui concerne la gestion des partenaires	



# Enquête sur la susceptibilité à la fluoroquinolone de *Neisseria gonorrhoeae* à l'aide du test ResistancePlus® GC SpeeDX sur des échantillons cliniques

Aymeric Braille<sup>1-3</sup>, Nathalie Schnepf<sup>1,2</sup>, Thibault Poncin<sup>1-3</sup>, Patricia Fernandes<sup>1,2</sup>, Catherine Sevin<sup>1,2</sup>, Cécile Bébear<sup>4</sup>, Béatrice Bercot<sup>1-3</sup>; au nom du groupe d'étude NGON

1. APHP, hôpital Saint-Louis, département des maladies infectieuses, Paris, France; 2. Laboratoire associé du Centre national des infections transmises sexuellement par des bactéries, Paris, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; 3. IAME, UMR 1137, INSERM, Université de Paris, Paris, France; 4. Département de bactériologie, Centre national français de recherche sur les infections transmises sexuellement par des bactéries, CHU de Bordeaux et USC EA 3671, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

## Objectifs

La résistance aux antibiotiques de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) augmente considérablement dans le monde entier et une GN multirésistante a été proposée pour une surveillance mondiale conformément aux recommandations de l'OMS (1). En effet, depuis l'avènement des Techniques d'amplification des acides nucléiques (NAAT), peu de souches sont disponibles pour les tests de sensibilité aux antibiotiques et la culture de sites extragénitaux reste moins sensible que les NAAT (2).

Le but de cette étude était d'évaluer les performances du kit ResistancePlus® GC (SpeeDX) pour la détection de la sensibilité à la fluoroquinolone (FQ) sur une collection de spécimens NG-positifs par des tests d'amplification d'acide nucléique (NAAT).

## Matériels et méthodes

Principe du kit GC ResistancePlus® (SpeeDX, Australie):

**ResistancePlusGC®** est un test multiplex qPCR de détection de *Neisseria gonorrhoeae* et de séquences liées à la sensibilité à la ciprofloxacine. Le principe de la méthode est schématisé à la figure 1.

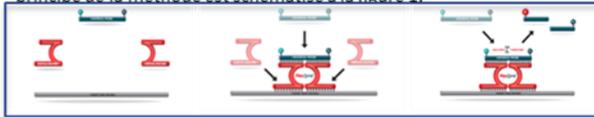


Figure 1: Principe de la réaction  
Au cours de ResistancePlus® qPCR, les amorces amplifient les séquences d'acides nucléiques cibles et produisent des amplicons qui servent de matrice pour la formation de ResistancePlus®.  
Un ResistancePlus® adhésif est constitué de deux composants oligonucléotidiques de l'ADN appelés enzymes partielles ou partzymes. Chaque fraction partielles ne comprend qu'une partie d'un noyau catalytique flanqué d'un bras de capture qui se lie à une séquence cible et d'un bras de substrat qui se lie à une sonde universelle. Les partzymes sont intrinsèquement inactives; cependant, lorsqu'ils sont liés de manière adjacente à une cible, la ResistancePlus® catalyse le clivage des sondes universelles, produisant un signal de fluorescence pouvant être surveillé en temps réel.

Le kit de dosage ResistancePlus GC (SpeeDX, Australie) détecte simultanément:

- 2 cibles spécifiques du génome GC (gènes opa et porA)
- Résistance aux fluoroquinolones ciblant le gène gyrA (séquence de type sauvage ou la mutation S91F)
- 1 contrôle interne

### Echantillons cliniques

Au cours d'une semaine d'automne 2017, 248 spécimens NG-positifs ont été collectés au Centre national de référence pour les IST bactériennes par un test d'amplification d'acide nucléique (NAAT) auprès d'un réseau de laboratoires de diagnostic français ou publics français.

Quatre systèmes analytiques majeurs (Hologic, Cepheid, Roche et Abbott) ont été utilisés pour le dépistage.

Parmi les échantillons, 75 provenaient d'urines, 65 du rectum, 53 de la gorge, 33 échantillons vaginaux et 22 échantillons urétraux.

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide de l'appareil m2000sp (Abbott) et 10 ml de chaque extrait ont été utilisés pour le kit de dosage RT-PCR ResistancePlus GC (SpeeDX, Australie).

## Résultats

Performance du kit ResistancePlus® GC

Parmi les 248 échantillons NG positifs de NAAT

- 220 (88,7%) étaient interprétables (2 cibles d'identification et de susceptibilité GC-FQ ont été détectées).
- 28 (11,3%) n'étaient pas complètement interprétables:
  - 2 n'avaient pas de contrôle interne amplifié
  - 14 n'avaient pas ou qu'une seule des deux cibles d'identification de CPG détectée
  - 12 n'avaient pas de génotype de résistance ou de sensibilité à la FQ détectée.

La prévalence de la résistance à la FQ trouvée par le kit était de 38,6% (85/220 échantillons), ce qui est proche de celles observées en France en 2017 à partir de souches NG du Centre national de référence (3).

### Exploration des tests invalides

#### Par rapport à l'échantillon

Les spécimens provenant de la gorge avaient le plus d'invalides: les résultats étaient interprétables pour 94,7% (71/75), 96,9% (31/32) et 78,8% (4/52) d'urines, de prélèvements vaginaux et écouvillons oraux, respectivement.

#### Par rapport à la quantité d'ADN

Lorsque le seuil de cycle (CT) était disponible [46,8% (116/248) des échantillons], les invalides avaient une moyenne CT de 37,7 ( $\pm$  1,6) contre 27 ( $\pm$  5,7) pour les valeurs interprétables. résultats (Figure 2).

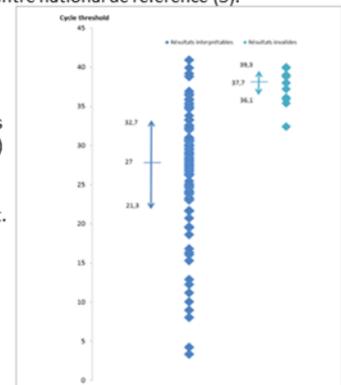


Figure 2: Résultats interprétables ou invalides obtenus par le GC Resistance Plus en fonction du seuil de cycle

## Conclusion

- Le kit ResistancePlus® GC (SpeeDX) est une méthode rapide et fiable pour détecter la sensibilité à la fluoroquinolone (FQ).
- Le test peut être effectué après un premier criblage à l'aide des 4 principaux systèmes analytiques commercialisés.
- La quantité de GC-ADN dans l'échantillon est majeure pour une performance optimale du kit SpeeDX du test ResistancePlus®GC.
- Cette approche est particulièrement intéressante pour analyser des échantillons sans nécessiter de cultures (dépistage de patients asymptomatiques et de sites extragénitaux).

Références: 1. WHO. Emergence de *Neisseria gonorrhoeae* multirésistante - Menace d'augmentation mondiale des infections sexuellement transmissibles non traitables incurables 2011.

2. Centres de contrôle et de prévention des maladies. Recommandations pour la détection en laboratoire de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*. MMWR Recomm Rep 2014; 63: 1-19.

3. Bébear C, Bercot B, Dupin N. Référence des données du Centre National de Référence des IST bactériennes disponible sur le site internet <https://www.cnr-ist.fr>