

Centre National de Référence des Infections Sexuellement Transmissibles bactériennes



Rapport annuel d'activités 2017

Pr Cécile Bébéar, CHU de Bordeaux

(Laboratoire coordonnateur, *Chlamydia trachomatis* et mycoplasmes urogénitaux)

Dr Béatrice Berçot, APHP Saint-Louis

(Laboratoire associé gonocoque)

Pr Nicolas Dupin, APHP Cochin

(Laboratoire associé syphilis)



Résumé analytique

Laboratoire CHU de Bordeaux

1. infections à *Chlamydia trachomatis*

Dans le cadre du **réseau de surveillance des anorectites**, le CNR a reçu et typé 2099 échantillons en 2017 (dont 2011 d'origine anorectale) dont la majorité provient d'hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH). Le nombre de cas de LGV en 2017 est de 469, soit une diminution de 24% par rapport à 2016 (582 cas). C'est la 1^{ère} fois qu'une telle diminution est observée en 5 ans. Si les cas de LGV se retrouvent toujours majoritairement à Paris, la proportion de cas parisiens est passée de 80% à 59% entre 2010 et 2017.

En 2017, le nombre de cas d'anorectites à souches non L a presque doublé (+ 45,5 %), passant de 790 cas en 2016 à 1150 cas en 2017. Quatre génotypes dominent dans l'ordre D/Da > G > E > J. Cette augmentation est due à la surveillance accrue des HSH sous PrEP (491 patients en 2017), situés principalement à Paris, qui font partie de la population VIH négative majoritairement asymptomatique. Ces patients étaient infectés par une souche non L dans 81,7% des cas et une souche L dans 18,3%. Ces patients présentant une LGV sous PrEP sont plus jeunes (37,6 ans vs 41,5 ans) et rapportent plus de partenaires que ceux ayant une LGV sans PrEP.

L'étude ancillaire de l'essai ANRS IPERGAY, coordonnée par J. M. Molina (APHP Saint-Louis), a évalué l'impact **d'une prophylaxie post exposition (PEP) par doxycycline** lors de rapports sexuels sur l'acquisition d'une IST bactérienne **dans une population de HSH PrEPeurs**. Dans ce cadre, le CNR IST a typé tous les échantillons pharyngés et anaux positifs à *C. trachomatis*, a isolé 5 souches à partir des échantillons pour lesquelles les CMI des tétracyclines et de l'azithromycine ont été réalisées. Aucune souche résistante n'a été isolée et 5 souches L ont pu être identifiées parmi les 14 échantillons typables dans cette population.

Nous avons mené une enquête de surveillance, sur une semaine en novembre 2017, pour évaluer la répartition des **génotypes de *C. trachomatis* dans les infections urogénitales**. Mille quatorze échantillons ont été collectés provenant de 64 laboratoires français métropolitains et des DROM. Des résultats préliminaires montrent une forte prévalence du génotype E (50%), suivi des génotypes F, G et D/Da, aussi bien chez les hommes que chez les femmes.

2. infections à mycoplasmes urogénitaux

Le CNR IST a évalué **la résistance de *Ureaplasma* spp. (544 souches) et *Mycoplasma hominis* (91 souches) aux tétracyclines et fluoroquinolones en France entre 2012 et 2015**. La prévalence de la résistance était d'environ 8% pour les tétracyclines dans les deux espèces et était inférieure à 3% pour les fluoroquinolones, lévofloxacine et moxifloxacine. La résistance aux tétracyclines était toujours liée à la présence du gène *tet(M)*. La résistance à la lévofloxacine était toujours associée à des mutations dans les QRDR du gène *parC* ou *parE*, tandis que la résistance à la moxifloxacine était associée à des mutations supplémentaires dans le gène *gyrA*.

Après un palier autour de 14-15% entre 2007 et 2012, **la résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides observée au CHU de Bordeaux** est en forte augmentation depuis 2015, dépassant en 2017 la valeur de 28%. Cette forte résistance est retrouvée au cours de l'enquête de prévalence nationale conduite en 2017.

Nous avons mené une enquête de surveillance, sur une semaine en novembre 2017, pour évaluer la **résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones**. Soixante-dix-neuf échantillons provenant de 73 patients différents ont été envoyés par 21 laboratoires français métropolitains et des DROM. Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **42,6% (26/61) étaient résistants aux macrolides** avec dans 59,1% des cas la mutation A2059G. **Pour les fluoroquinolones, 7,5% (5/67) des patients étaient résistants** à ces antibiotiques avec une mutation *parC*. Ce sont les 1^{ers} chiffres de prévalence nationaux, qui demanderont à être confirmés l'an prochain sur un effectif plus grand.

Laboratoire APHP Saint-Louis et Institut Alfred Fournier (IAF)

La surveillance de la résistance du gonocoque aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) est essentielle car les gonocoques résistants aux C3G et aux fluoroquinolones ont été incluses parmi les 12 bactéries prioritaires à surveiller d'après les recommandations de l'OMS en 2017.

Dans le cadre du réseau de surveillance communautaire Renago, le CNR IST bactérienne a évalué **la résistance de 686 souches de gonocoques à 6 antibiotiques**. On peut observer une stabilisation de la diminution de la résistance aux C3G en France ce qui correspond à la tendance observée en Europe. La proportion de souches résistantes au céfixime (CMI>0,125 mg/l) qui était à plus de 3% en 2012 est stabilisée depuis 2 ans à moins de 1% en France, soit 0,7% en 2017. Concernant la ceftriaxone, la proportion de souches ne présentant plus des CMI de souches sauvages (CMI>0,032 mg/l) est passée de 5,93% en 2010 à 1,31% en 2017. La proportion de souches résistantes à l'azithromycine a dépassé la barre de 5% (5,5% en 2017) et 22,48% des souches sont intermédiaires. La résistance aux fluoroquinolones a légèrement diminué sous la barre des 40% (37,2% en 2017). La résistance aux tétracyclines est stable depuis 2015 à 65% (65,4% en 2017) et la proportion de souches de haut niveau de résistance aux tétracyclines correspond à un quart d'entre elles (23,2% en 2017).

Parmi cette population, 102 souches ont été explorées par la technique NG-MAST : 3 clones sont prédominants **ST5441 (11,8%), ST2 (6,9%), ST13113 (4,9%)**. Ces clones n'ont pas été reliés à la multirésistance aux antibiotiques. Le clone européen ST1407 impliqué dans la résistance aux C3G y est faiblement représenté (1%).

Concernant les alertes de santé publique, en novembre 2017, **une nouvelle souche de gonocoque F90 présentant un haut niveau de résistance à la ceftriaxone** (CMI ceftriaxone : 0,5 mg/l, CMI céfixime 1 mg/l), des corésistances aux fluoroquinolones et à la tétracycline et un niveau intermédiaire à l'azithromycine, a été isolée au CeGGID de l'hôpital St Louis chez une patiente hétérosexuelle. Le séquençage haut débit de cette souche retrouve la présence d'un nouveau gène mosaïque *penA60* et un génogroupe NG-MAST 3435, MLST 1903, NG-STAR 233 correspondant à un clone isolé au Japon, Danemark, Australie et Canada en 2017.

Dans le cadre de **l'étude ancillaire de l'essai ANRS IPERGAY évaluant la PEP** conduite par J. M. Molina, le CNR a investigué 70 échantillons cliniques PCR-positifs et 8 souches. Les 8 souches isolées étaient sensibles aux C3G, à l'azithromycine, et 87,5% d'entre elles étaient intermédiaires ou résistantes à la tétracycline. La recherche de résistance à partir du prélèvement évalué à **82,9% la résistance à la tétracycline**. La PCR nichée a permis de typer 28 des 70 échantillons, montrant ainsi la présence de clones principaux ST5441, ST5624, ST5793 et ST10529. Le génotype multi résistant G1407 n'était pas présent dans ces échantillons.

Nous avons mené une **enquête de surveillance, sur une semaine en décembre 2017**, pour typer des souches de *N. gonorrhoeae* et des échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* par amplification d'acides nucléiques responsables d'infection urogénitales et étudier les clones circulants dans un réseau hospitalier en Métropole et DROM. Soixante-douze hôpitaux ont participé avec un **taux de positivité des échantillons cliniques en PCR établi à 9,1%**. Le CNR a investigué 25 souches et 268 échantillons positifs par amplification. La sensibilité des souches était de 100% aux C3G, 84% à l'azithromycine, 58,3% à la ciprofloxacine et 20% aux cyclines. Les clones prédominants étaient de génotype ST5441, ST5624 et ST12302. L'étude est en cours pour l'exploration de la résistance aux quinolones sur les échantillons cliniques et le typage par PCR nichée.

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 laboratoire associé syphilis apporte une expertise moléculaire par la détection du génome de *Treponema pallidum* et sérologique dans le cadre d'une aide au diagnostic.

1. Expertise

- **Six cent quarante-trois demandes d'expertises correspondant à 1421 analyses** de prélèvements de patients consultant dans les CeGGID et Services MST de France métropolitaine et des DOM ont été répertoriés et analysés pour l'année 2017.

- **Cent dix prélèvements provenant de 104 patients** suspectés de syphilis dans le cadre de l'étude GENOSYPH ont été répertoriés et analysés.

- **Quatre-vingt-deux pourcents des souches de *T. pallidum* en France présentent la mutation A2058G** sur le gène de l'ARNr 23S pour la résistance aux macrolides.
- **Sur les 73 prélèvements périnataux analysés**, 8 étaient positifs en nPCR.
- Evaluation de 3 tests non tréponémiques (**RPR**)

2. Alerte

- **Trois cent six LCR ont été analysés**, 41 étaient positifs par nPCR et/ou VDRL
- **Huit alertes de syphilis congénitale** ont été déclenchées auprès de l'ANSP.

3. Information

2 chapitres rédigés

- ESKA n°92, Tréponèmes pathogènes pour l'homme
- REMIC 2018, chapitre syphilis

Summary

Laboratory from Bordeaux University Hospital

1. *Chlamydia trachomatis* infections

Among the **Lymphogranuloma venereum (LGV) surveillance network**, 2099 samples including 2011 rectal samples were received and typed by the CNR. Most of them were obtained from men who have sex with men (MSM). There were 469 LGV episodes in 2017 with a significant decrease of 24% in comparison to the number of LGV cases reported in 2016 (582). Such a decrease is observed for the first time in the last 5 years. Most of the LGV cases are described in Paris, France even though the number of Parisian cases has decreased from 80% to 59% between 2010 and 2017.

A total of 1150 non-LGV anorectal infections were reported in 2017, with a sharp increase of 45.5% between 2016 and 2017. Four genovars are predominant among non-LGV *C. trachomatis* strains, first D/Da > G > E > J. This increase is probably linked to the monitoring of HIV-negative patients using pre-exposure prophylaxis for HIV (PrEP). Four hundred ninety-one subjects on PrEP, mostly living in Paris, were included in the LGV surveillance network in 2017. Among them, 81.7% non-LGV and 18.3% LGV anorectal infections were described. Patients with LGV cases were younger and reported a higher number of sexual partners than LGV-infected patients without prophylaxis.

The CNR participated to the first large, open-label, randomized trial assessing the efficacy and safety of a novel antibiotic **post exposition prophylaxis (PEP) strategy for sexually transmitted infections involving doxycycline** in MSM taking PrEP for HIV prevention. All *C. trachomatis*-positive PCR samples obtained from throat and anal swabs during follow-up were centralized at the CNR to perform genotyping and cell cultures to assess antibiotic MICs. The 5 strains obtained were all susceptible to tetracyclines and azithromycin. Five LGV strains were identified among the 14 typable samples.

To evaluate the genovar repartition of ***C. trachomatis* among urogenital infections**, 1014 samples were collected during one week in November 2017, from 64 laboratories from continental France and overseas departments and territories. Preliminary data showed a high prevalence of genovar E (50%), followed by genovars F, G and D/Da, for both men and women.

2. Urogenital mycoplasmal infections

The CNR investigated the **susceptibility of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* to tetracyclines and fluoroquinolones in France between 2012 and 2015**. Among 544 *Ureaplasma* spp. and 91 *M. hominis* isolates tested, resistance rates were around 8% for tetracyclines and lower than 3% for levofloxacin and moxifloxacin. The *tet(M)* gene was found in all tetracycline-resistant isolates. All levofloxacin-resistant isolates harbored a mutation in *parC* or *parE* and isolates that were also resistant to moxifloxacin harbored an additional mutation in the *gyrA* gene.

Macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* at the Bordeaux University hospital significantly increased from 14-15% between 2007-2012 to 28% in 2017. **A national prevalence survey** was conducted during one week in November 2017, to evaluate **macrolide and fluoroquinolone resistance in *M. genitalium***. Seventy-nine *M. genitalium*-positive samples obtained from 73 patients were collected from 21 laboratories from continental France and overseas departments and territories. Among patients for which amplification was obtained, **42.6% (26/61) harbored a macrolide-resistant *M. genitalium*** (mutation A2059G in 59.1% cases). **For fluoroquinolones, 7.5% (5/67) patients** harbored a resistant *parC*-mutated *M. genitalium*. These are the 1st French prevalence data, which need to be confirmed next year on a larger number of specimens.

Laboratory from APHP Saint-Louis et Institut Alfred Fournier (IAF)

Gonococci resistant to 3rd-generation cephalosporins and quinolones have been included among the 12 priority bacteria to be monitored based on the recommendations of the WHO in 2017.

As part of the Renago Community Surveillance Network, **the susceptibility of 686 *N. gonorrhoeae* isolates to 6**

antibiotics was observed. A stabilization of the decrease in resistance to third-generation cephalosporins in France can be observed, which corresponds to the trend observed in Europe. The proportion of strains resistant to cefixime (CMI > 0.125 mg/l), which was more than 3% in 2012, has been stabilized for 2 years at less than 1% in France (0.7% in 2017). For ceftriaxone, the proportion of isolates with a CMI > 0.032 mg/l (Ecoff) to ceftriaxone decreased at 1.31% in 2017. The proportion of strains resistant to azithromycin was superior at 5% in 2017 and 22.48% of the strains were intermediate. Resistance to quinolone slightly decreased at 37.2% in 2017. Tetracycline resistance has been stable at 65% from 2015 to 2017. The proportion of high-level resistant strains to tetracycline is one-quarter of them (23.2% in 2017).

Among that collection, 102 *N. gonorrhoeae* isolates were explored by the NG-MAST technique: **3 clones were predominant ST5441 (11.8%), ST2 (6.9%), ST13113 (4.9%)**. These clones were not related to antibiotic multidrug resistance. The European clone ST1407 involved in resistance to C3G is poorly represented (1%).

On public health alerts, in November 2017, **a new strain of *N. gonorrhoeae* called F90 showing a high level of resistance to ceftriaxone** (CMI ceftriaxone: 0.5 mg/l; CMI cefixime 1 mg/l), resistances to quinolone and to tetracycline and an intermediate level to azithromycin was isolated at the CeGGID of the St. Louis Hospital in a heterosexual female. The whole genome sequencing of this isolate recovered the presence of a new *penA60* mosaic gene and a genotypes NG-MAST 3435, MLST 1903, NG-STAR 233 corresponding to a new clone discovered in Japan, Denmark, Australia and Canada in 2017.

Seventy clinical specimens NAAT-positive and 8 *N. gonorrhoeae* isolates from the **post exposition prophylaxis (PEP) strategy for sexually transmitted infections involving doxycycline** were investigated. The 8 isolates were susceptible to third-generation cephalosporins, azithromycin, and 87.5% were intermediate or tetracycline-resistant. The search for resistance on sampling evaluates the **resistance to tetracycline at 82.9%**. The nested PCR allowed to type 28/70 samples, thus showing the presence of major clones ST5441, ST5624, ST5793, and ST10529. The multi-resistant genotype G1407 was not present in these samples.

A surveillance survey was conducted one week in December 2017 to screen for *N. gonorrhoeae* isolates and *N. gonorrhoeae*-positive samples to *N. gonorrhoeae* by NAATs in a Hospital network in metropolitan and DROM. Seventy-two hospitals participated with **9.1% of NAAT-positive samples**. The CNR investigated 25 strains and 268 positive NAAT-positive samples. Susceptibility of isolates was 100% to 3rd generation cephalosporins, 84% to azithromycin, 58.3% to ciprofloxacin, and 20% to cyclines. The predominant genotypes were ST5441, the ST5624 and ST12302. The study is underway for the exploration of resistance to quinolones on clinical specimens and typing by a nested PCR.

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 escape screening programs throughout pregnancy. The associate laboratory for syphilis provides molecular expertise through the detection of the genome of *T. pallidum* and serology as part of a diagnostic aid.

1. Expertise

- **643 requests for expertises corresponding to 1421 analyzes** of samples of patients consulting in the CeGGID and MST Services of Metropolitan France and DOMs were listed and analyzed.
- **110 samples from 104 patients suspected of syphilis in the context of the GENOSYPH study** were identified and analyzed.
- **82% of *T. pallidum* strains in France have the A2058G mutation** on the 23S rRNA gene for macrolide resistance.
- **73 perinatal samples analyzed**, 8 were positive in nPCR.
- Evaluation of 3 non-treponemal tests (**RPR**).

2. Alert

- **306 LCR were analyzed**, 41 were positive by nPCR and / or VDRL.
- **8 congenital syphilis alerts** were triggered to ANSP.

3. Information

2 chapters

- ESKA No. 92, Treponemas pathogenic to humans
- REMIC 2018, syphilis chapter

1 Missions et organisation du CNR

Cf annexes.

2 Activités d'expertise

Laboratoire CHU de Bordeaux : éléments clefs 2017

- Evaluation de 2 trousse diagnostiques pour la détection de *M. genitalium* ayant donné lieu à 2 publications.
- 3113 échantillons biologiques positifs à *C. trachomatis*, 498 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium*, 125 souches de *Ureaplasma* spp et *M. hominis* et 66 souches de *C. trachomatis* envoyés au centre de ressources biologiques (CRB) Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux en 2017.
- *C. trachomatis* : 2099 échantillons typés.
- Mycoplasmes urogénitaux : 54 échantillons ou souches expertisées.

Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF : éléments clefs 2017

- 392 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2017 dont 119 souches pour typage dans le cadre des données transmises à l'ECDC via TESSy.
- 8 souches de gonocoques et 70 prélèvements cliniques expertisés (étude ancillaire ANRS IPERGAY).
- 25 souches et 268 échantillons biologiques positifs à *N. gonorrhoeae* issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance expertisés (semaine 49).

Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs 2017

- Evaluation de 3 tests non tréponémiques RPR.

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 et IAF

Techniques développées et implantées sur le site de l'hôpital Saint Louis en 2017 :

- Séquençage haut débit des souches de gonocoque sur séquenceurs MiSeq/Illumina.
- PCR nichée « maison » / séquence pour le génotypage de *N. gonorrhoeae* sur prélèvements cliniques positifs par amplification d'acides nucléiques ciblant les gènes *porB* et *tbpB*.
- Trois PCR spécifiques du génome de *N. gonorrhoeae* pour la détection des principaux déterminants de résistance aux tétracyclines, ciblant les gènes *tet(M)*, *rspJ*, *mtrR* et sa région promotrice, sur prélèvements cliniques positifs par amplification d'acides nucléiques.

2.1.3 Laboratoire APHP Cochin

Aucune nouvelle technique n'a été développée.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

2.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

- Evaluation de la trousse de détection de *M. genitalium* et de cinq mutations associées à la résistance aux macrolides par PCR en temps réel, ResistancePlus MG (SpeeDx, Australie) en comparaison à la technique maison par PCR en temps réel de type FRET (Touati *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014, 52, 1549-55). Cette étude a été publiée en 2017.

C. Le Roy, N. Hénin, C. Bébéar, S. Pereyre. Evaluation of a commercial multiplex qPCR assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance-associated mutations in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2017, 55, 3, 978-979.

- Evaluation de la trousse de détection de *M. genitalium* par technique de transcription-mediated amplification (TMA), Aptima *Mycoplasma genitalium* CE-IVD (Hologic, USA), en comparaison avec la technique de PCR en temps réel utilisée au laboratoire (Jensen *et al.* *J. Clin. Microbiol.* 2004, 2, 683-92). Cette étude a été publiée en 2017.

C. Le Roy, S. Pereyre, N. Hénin, C. Bébéar. French prospective clinical evaluation of the Aptima® *Mycoplasma genitalium* assay (CE-IVD) and macrolide resistance detection using three distinct assays *J. Clin. Microbiol.* 2017, 55, 11, 3194-3200.

2.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

- Evaluation de la PCR nichée « maison » / séquence pour le génotypage de *N. gonorrhoeae* sur 70 prélèvements positifs par PCR dans le cadre de l'étude ancillaire ANRS Ipergay.

- Evaluation de trois PCR spécifiques / séquence du génome de *N. gonorrhoeae* pour la détection de la résistance aux cyclines sur 50 prélèvements / souches et 70 prélèvements positifs par PCR dans le cadre de l'étude ancillaire ANRS Ipergay.

Ces 2 études sont en cours de publication.

2.2.3 Laboratoire APHP Cochin

L'évaluation des performances en termes de faisabilité, sensibilité et spécificité des tests non tréponémiques, Launch RPR Card Test ASI (Arlington Scientific.Inc), Roche Sekisui RPR test et le RPR-Charbon (MAST-BioSystems), a été réalisée au laboratoire du CNR syphilis de l'hôpital Cochin. Le test est un test RPR (Rapide Plasmatic Reagine) qui permet la détection et le dosage des anticorps anti-cardiolipidiques, lecithin et cholestérol par réaction d'agglutination de particules de charbon sensibilisées.

MATERIEL ET METHODES

Réactifs

Les trousse ont été fournies par les différentes sociétés Launch, Roche et Biosystem

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 inclue 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 cutané-muqueuses 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 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

Six séries de 10 sérums ont été réalisées. Les sérums et le matériel nécessaire à la réaction sont amenés à température ambiante 15 minutes avant de réaliser les tests. Une goutte (50 microlitres) de chaque sérum pur est diluée jusqu'au 1/32^e pour les 44 sérums de syphilis primaire et diluée de 1/2 jusqu'au 1/256^e pour les 7 sérums de syphilis secondaire ou latente précoce. Une goutte de réactif A (15 microlitres), distribuée à l'aide du compte-goutte métallique fourni par l'industriel, est mise en contact avec le sérum. Le mélange est réalisé par agitation douce de la plaque sur un agitateur dédié à 100 rpm pendant 8 minutes. La lecture est immédiate, réalisée par la biologiste ayant fait le test. Une deuxième lecture en aveugle est réalisée l'aide d'un lecteur d'agglutination automatisé (Arlington Scientific, Inc. (ASI)). Le titre est déterminé par la dernière dilution pour laquelle une réaction est observée. Si une discordance est constatée dans les résultats, une troisième technicienne réalise une troisième lecture en aveugle.

RESULTATS

Praticabilité technique

Les tests sont extrêmement simples à réaliser, aucune erreur de manipulation n'a été faite. Aucun problème de discordance entre les deux lecteurs, n'a été constaté. 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 lecture 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 ont été répertoriés 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 sérums ont réagi avec le spot « témoin réaction » de chaque test, validant les résultats. Ceux-ci sont présentés et comparés au test RPR utilisé en routine (tableau ci-dessous).

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

TEST RPR	Panel	Diagnostic syphilis		
		Syphilis primaire	Syphilis secondaire	Syphilis latente précoce
Référence CNR^a	Sensibilité (%)	66	100	75
Launch	Sensibilité (%)	68	100	80
Roche Sekisui	Sensibilité (%)	57,5	100	77,3
MAST	Sensibilité (%)	57,5	57,5	72,7

^a Les sérums ont été testés en parallèle avec le test RPR Kit Test (Bio-Rad).

Conclusions

Dans les syphilis primaires la sensibilité varie de 57,5 à 68%, dans la syphilis secondaire la sensibilité est de 100%, dans les syphilis latentes précoces la sensibilité varie de 72,7 à 80%. La syphilis primaire correspond à une période de séroconversion de la syphilis reflétée par une sensibilité plus faible des tests RPR.

Les tests RPR chez Roche et MAST sont peu performants en syphilis primaire. Le test MAST est peu sensible quel que soit le stade de la syphilis.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

2.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Aucune technique n'a été transférée.

2.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Nous avons transféré les techniques de détermination des CMI et la technique de typage NG-MAST au CHU de La Réunion dans le laboratoire d'Olivier Belmonte et Bénédicte Roquebert. Ce transfert a permis la caractérisation et le génotypage de 88 souches provenant de la Réunion et Mayotte et la mise en évidence d'un pourcentage élevé de résistance aux quinolones (57%) dans les DOMTOM. Un manuscrit est en cours de préparation.

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 certifié AFNOR, entre le 1^{er} avril 2017 et le 31 décembre 2017 :

- 498 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* dont 79 issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance réalisée semaine 46 en 2017.
- 113 souches d'*Ureaplasma* spp. et 14 souches de *M. hominis*.
- 2099 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV.
- 1014 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre de l'enquête nationale de prévalence des infections urogénitales, réalisée semaine 46 en 2017.
- 66 souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux.

2.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Matériel biologique stocké au sein du GH St Louis-Lariboisière-Fernand Widal entre le 1^{er} avril et le 31 décembre 2017 :

- 392 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2017 dont 119 souches pour typage dans le cadre des données transmises à l'ECDC via TESSy.
- 8 souches de gonocoques et 70 prélèvements cliniques recueillis dans l'étude ancillaire ANRS menée par Jean-Michel Molina (étude Ipergay).
- 25 souches et 268 échantillons biologiques positifs à *N. gonorrhoeae* issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance réalisée semaine 49 en 2017.

2.4.3 Laboratoire APHP Cochin

Cf annexe 1.

2.5 Activités d'expertise

2.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Tableau. Activité d'expertises, mycoplasmes urogénitaux, 1^{er} avril 2017-31 décembre 2017

	Nombre d'échantillons
Culture, antibiogrammes et CMI de <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i>	
CHU Angers	1
CHU Dijon	1
CHU Strasbourg	1
CH Agen	1
CH Bayonne	1
CH Chalon en Champagne	1
CH Libourne	1
CH Louis Giorgi Orange	1
CH Montpellier	2
CH Robert Ballanger (93)	1
Total	11
PCR <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i>	
CHU Angers	1
CHU Dijon	1
CHU Necker	1
CHU Nice	1
CHU Strasbourg	1
CH Agen	1
CH Libourne	1
CH Louis Giorgi Orange	1
CH Robert Ballanger (93)	1
Total	9
Mutations associées à la résistance aux macrolides de <i>M. genitalium</i>	
CHU Pitié Salpêtrière	7
CHT Gaston Bourret (Nouvelle Calédonie)	5
CHU Saint Antoine	5
CHU Dijon	2
CHU Felix Guyon (La Réunion)	1
CH Tourcoing	2
CHU de Nice, Hôpital Archet	1
CHU Nantes	1
CHU Montpellier	1
CH Annecy Genevois	2
CH Dax	1
CH Niort	1
CH Libourne	1
CH Lourdes	1
CH Sud Francilien	1
Institut Alfred Fournier (Paris 14)	1
LABM Biopath Coquelles (62)	1
Total	34

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 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 dans un délai d'une semaine.

Activité de typage dans le cadre de la surveillance de l'anorectite à *C. trachomatis*.

En 2017, le CNR a reçu et typé 2099 échantillons (dont 2011 d'origine anorectale). Cette activité est en légère baisse par rapport à 2016 comme le montre la figure ci-dessous.

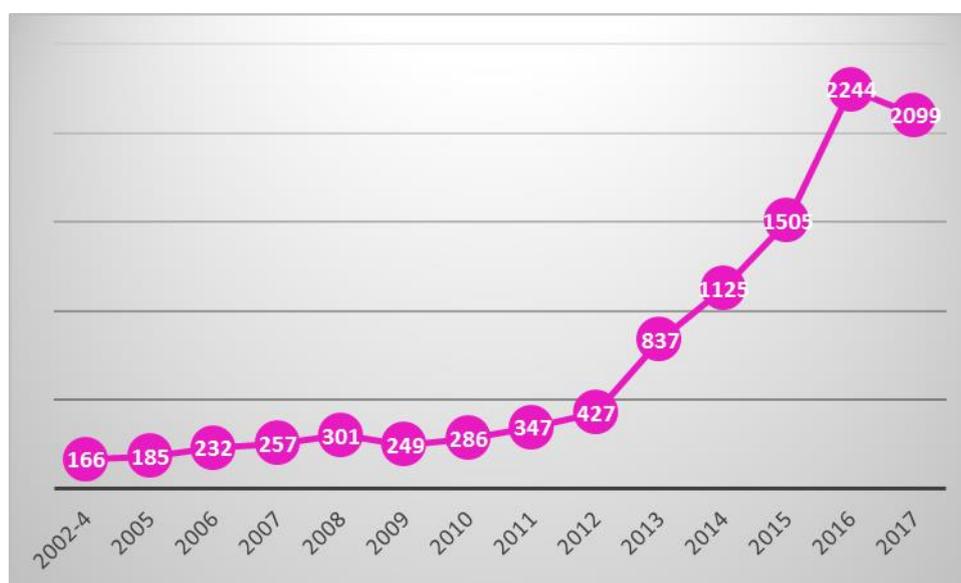


Figure. Évolution du nombre d'échantillons reçus au CNR depuis 2002

Les 87 échantillons non rectaux se répartissent en 44 échantillons pharyngés, 19 adénopathies, 11 urines, 2 conjonctives et 11 d'origine inconnue. Les résultats du typage sont donnés dans le tableau suivant :

Nature de l'échantillon	Souche L	Souche non L	Souche non amplifiée
Pharyngé	4	30	10
Adénopathie	15	1	3
Urine	1	8	2
Conjonctive	0	2	0
Inconnue	5	6	0

Les résultats concernant le typage de *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV sont transmis dans les 24-48h.

2.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Activité de surveillance des résistances dans le cadre du réseau Renago

En 2017, l'Institut Alfred Fournier (IAF) a reçu, identifié et déterminé la sensibilité à 6 antibiotiques de 392 souches de gonocoque. Les souches reçues et les analyses pratiquées sur ces souches sont listées dans le tableau ci-après. Le délai moyen de rendu de résultat est de 48 à 72h.

Type d'analyse	Nombre	Remarques
Souches reçues	443	
Repiquages	443	47 souches n'ont pas été obtenues en subculture
Repiquages et identifications	396	4 souches sont ré-identifiées <i>N. meningitidis</i> ou <i>Neisseria</i> spp
Repiquages, identifications et CMI		
Antibiogrammes	392	

Caractérisation moléculaire de la surveillance et génotypage

En 2017, le laboratoire de St Louis a reçu 143 souches pour antibiogramme, génotypage par NG-MAST et/ou séquençage haut débit et 358 prélèvements PCR-positifs pour génotypage par PCR nichée et/ou prédiction de résistance.

2.5.3 Laboratoire APHP Cochin

Année 2017

Dans le cadre de l'expertise :

- Nombre des centres participants :	100	90% laboratoires hospitaliers
- Nombre total d'expertises :	1421	35% PCR et 65% sérologies
- Nombre total d'échantillons :	749	
LCR	289	6,6% positifs par nPCR et/ou sérologie
Placenta, liq. amniotique, cordon	73	2,7 % positifs par nPCR
Ecouvillon	94	13,8% positifs par nPCR
Biopsie	17	23,5% positifs par nPCR
Sérum	230	52,5% positifs par nPCR et/ou sérologie
Sang total	28	3,6% positifs par nPCR
Autre	18	5,5% positifs par nPCR

Le délai moyen de restitution des résultats est de 4,8 jours pour la PCR et de 6,4 jours pour la sérologie.

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 2017. 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 et IAF

Entre 1^{er} avril 2017 et 31 décembre 2017, le laboratoire associé gonocoque a transféré la technique de NGS sur la plateforme de séquençage situé à l'hôpital St Louis qui est en accès interne au CNR. Cette plateforme est mutualisée au sein du pôle de Biologie et comporte 2 MiSeq Illumina avec un accès au NextSeq 500/Illumina situé sur le site et un Oxford Nanopore MinION (choix en fonction du nombre de séquences).

L'expertise bio-informatique repose sur :

- Un accès interne avec une expertise locale des collègues virologistes (notre laboratoire est à proximité de celui du CNR VIH).
- Trois accès externes avec (i) l'expertise de l'analyse bio-informatique des génomes bactériens dans le cadre de l'équipe de recherche IAME, (ii) le recrutement récent d'une bioinformaticienne ayant accès à la plateforme Galaxie de l'APHP, (iii) la plateforme d'annotation de génomes assemblés Mage Microscope (Genoscope, Evry)

Les outils utilisés pour l'analyse après assemblage des séquences sont les logiciels installés sur la plateforme Galaxie : Velvet, Spade, ParSNP, Mafft (alignement core SNPs avec MUSCLE + calcul arbre avec FASTTREE en maximum likelihood) visualisé avec iTOL, RAxML.

Le CNR a fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique afin de surveiller les souches et investiguer celles résistantes. Le laboratoire associé est prêt pour le séquençage de souches en cas d'épidémies.

Les analyses bio-informatiques sont l'extraction des données de :

- MLST, NG-STAR, NG-MAST
- Résistome
- Prédiction moléculaire de la résistance

En 2017, ces techniques ont été faites en complément du NG-MAST, MLST mais seront effectuées en première ligne en 2018 avec un pipeline en cours de construction.

Utilisation du Séquençage haut débit :

- Epidémie : pas d'épidémie en 2017
- Surveillance : 30 séquences réalisées en fin d'année 2017

La sélection des souches pour séquençage repose sur l'investigation de collection de souches résistantes, l'investigation de souches isolées dans la population d'hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH) sous PrEP, souches des DOMTOM, ...

Les séquences brutes (fastaq files) sont entreposées dans des bases de données fermées nationales au Génomscope ou sur la plateforme Galaxie et après publication, les files pourront être partagés sur les bases de données publiques ENA.

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.

3 Activités de surveillance

Laboratoire CHU de Bordeaux : éléments clefs 2017

La surveillance des infections à *C. trachomatis* en 2017 a concerné les infections anorectales dans le cadre du réseau LGV et les infections urogénitales.

Les points marquants dans **les infections anorectales** sont :

- Une bonne dynamique du réseau avec un nombre toujours croissant de nos correspondants biologistes et cliniciens couvrant la France métropolitaine
- Un nombre de cas de LGV qui diminue en 2017 de 24% par rapport à 2016 mais qui est stable par rapport à 2015.
- Un nombre de cas non LGV toujours en augmentation (+45,5%) par rapport à 2016, probablement lié à l'introduction dans le réseau d'une population d'HSH VIH négatif sous PrEP (prophylaxie pré-exposition des patients VIH négatif).
- Un nombre de cas de LGV de 18,3% parmi ces patients sous PrEP.

Les points marquants dans la surveillance des gènes circulants dans **les infections urogénitales** sont :

- La bonne adhésion de nos collègues biologistes à ce projet avec une bonne couverture nationale.
- Une répartition attendue des gènes de la manière suivante : E (50%) puis F, G, D/Da aussi bien chez la femme que chez l'homme.

Laboratoire GH Saint-Louis et IAF : éléments clefs

La surveillance de la résistance du gonocoque aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) est essentielle car cette bactérie fait partie des 12 bactéries prioritaires à surveiller d'après les recommandations de l'OMS en 2017.

Les points marquants de la **résistance aux antibiotiques** sont :

- La stabilisation d'un taux bas de souches de gonocoques résistants au céfixime en 2017 à 0,7%
- L'observation d'une nouvelle souche de gonocoque multirésistante aux antibiotiques avec un haut niveau de résistance à la ceftriaxone (CMI à 0.5 mg/l), aux fluoroquinolones, tétracyclines, qui correspond à un clone isolé en 2017 au Japon, Danemark, Australie et Canada.
- Une augmentation constante de gonocoques résistants à l'azithromycine : 22,48% sont intermédiaires et 5,5% sont résistantes à ce macrolide.

Les points marquants pour la **clonalité** sont

- Le clone européen ST1407 impliqué dans la résistance aux C3G est faiblement représenté dans la population observée.
- Le succès de 3 clones prédominants ST2, ST645 et ST5441 en France, ces clones n'étant pas reliés à la multirésistance aux antibiotiques.

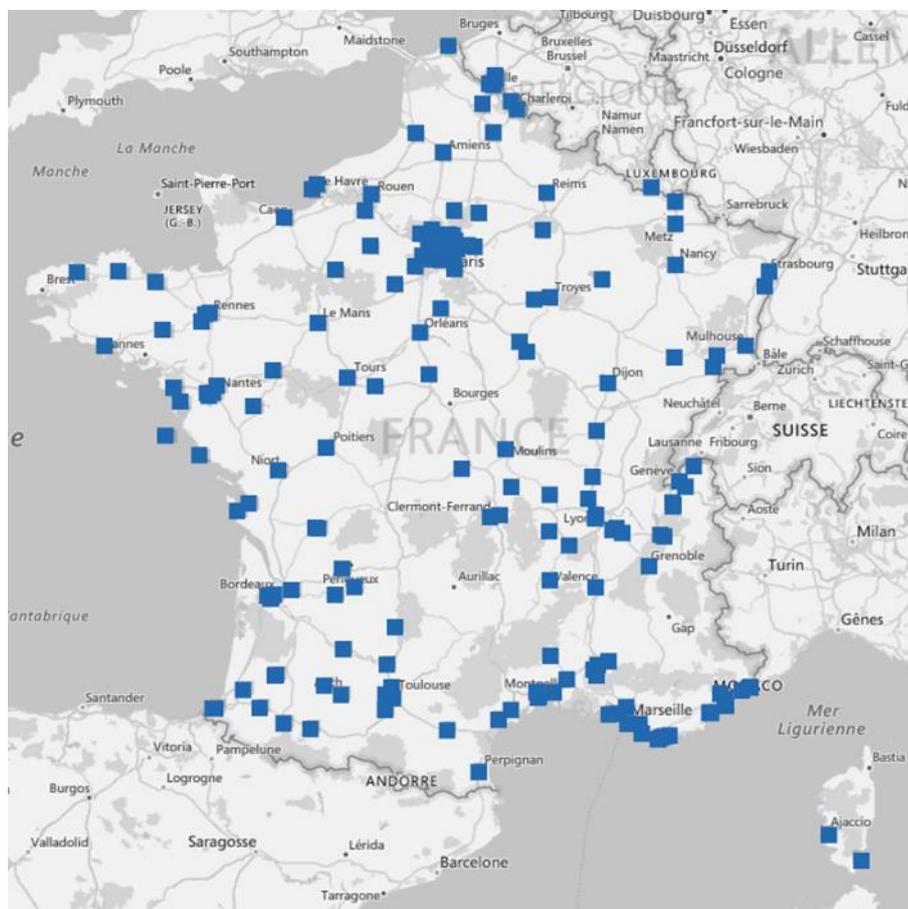
Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs

- 82 % des souches de *T. pallidum pallidum* en France sont **résistantes à l'azithromycine**.
- 2 groupes génétiques distincts sont identifiés (SS14-like et Nichols).
- 41 alertes de **neurosyphilis**.
- 8 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*

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



Le nombre de correspondants augmente tous les ans comme le montre la figure ci-dessous. Le réseau comporte 1181 médecins correspondants ayant participé au moins une fois. En 2017, 484 médecins ont participé au réseau dont 193 nouveaux. Depuis 2010, 268 laboratoires ont participé au réseau et en 2017, ce sont 96 laboratoires qui ont envoyé des échantillons dont 42 nouveaux. Il faut noter que 10 laboratoires participent de manière pérenne et envoient 57,4% des échantillons. Le groupe hospitalier Diaconesses Croix Saint Simon a cessé d'envoyer ses prélèvements.

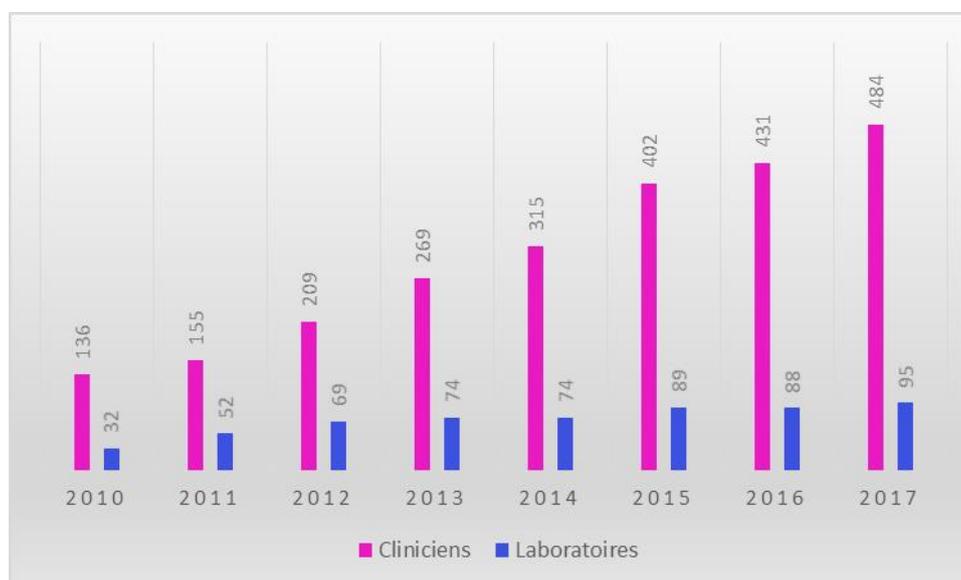


Figure. Évolution du nombre de correspondants actifs du réseau.

Les trois modes d'exercice, ville, hôpital et CeGIDD sont représentés dans la figure ci-dessous. On peut voir que la participation des médecins de CeGIDD et des centres hospitaliers est toujours en hausse (respectivement +14% et +32% entre 2016 et 2017). À contrario, la participation des médecins de ville connaît une baisse de 18% entre 2015 et 2017.



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

L'activité de ces 3 modes d'exercice n'évolue pas de la même manière (cf figure ci-dessous). Le fait d'avoir exclu en 2016 de notre base de données les patients VIH- ou de statut VIH inconnu, asymptomatiques, explique la diminution observée chez les médecins de CeGIDD et de ville par rapport à 2015.

En 2017, l'activité est stable en ville par rapport à 2016, elle augmente plus en CeGIDD qu'à l'hôpital. Cette augmentation d'activité à l'hôpital et dans les CeGIDD, par rapport à la ville, est probablement liée à la prise en charge des patients sous PrEP.

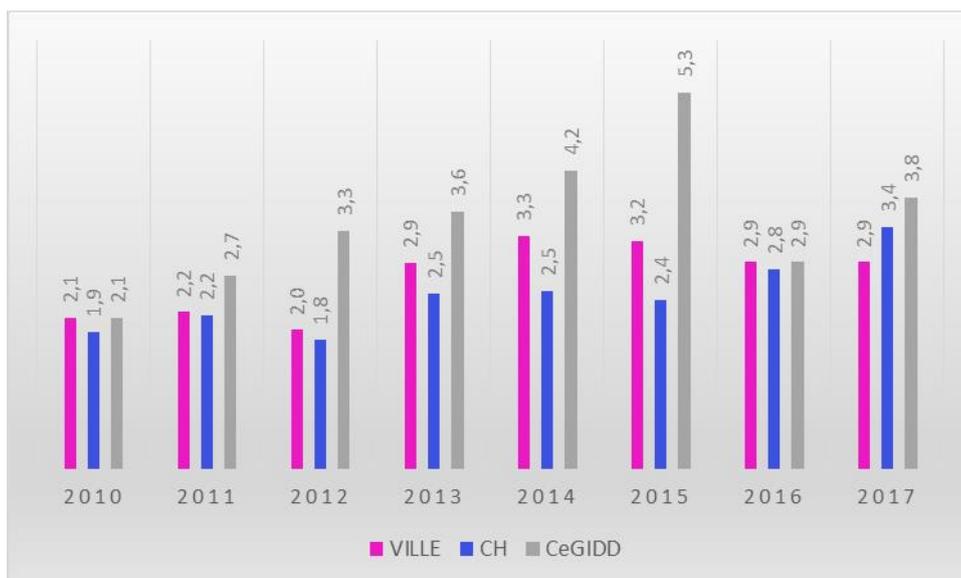


Figure. Évolution du nombre moyen d'échantillons/médecin/an en fonction du mode d'exercice. Les différentes spécialités médicales sont décrites dans la figure ci-dessous :

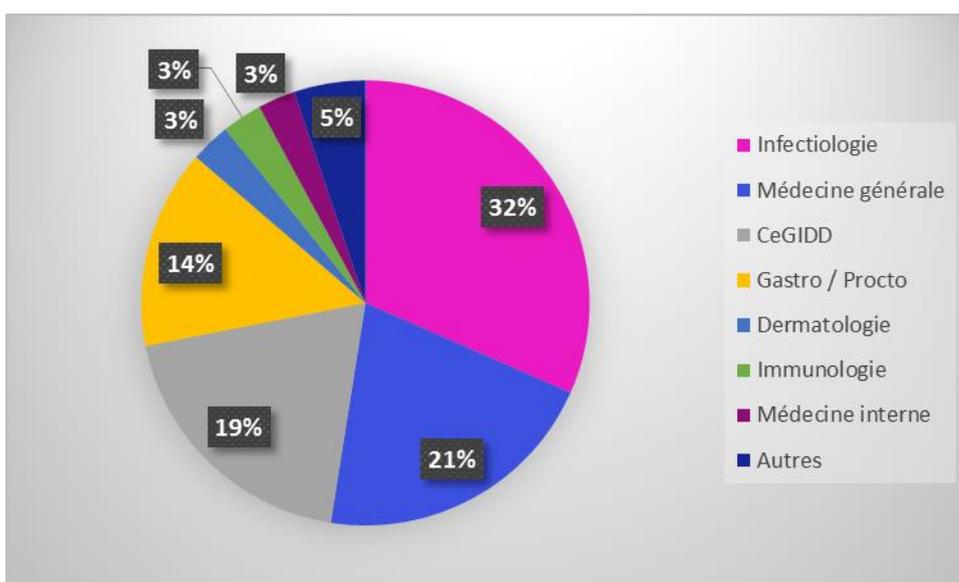


Figure. Répartition des médecins du réseau par spécialité.

3.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Créé en 1986, ce réseau est géré conjointement avec le laboratoire associé et Santé Publique France et regroupe des laboratoires volontaires répartis sur le territoire français métropolitain. Ce réseau regroupe $\frac{3}{4}$ de laboratoires privés et $\frac{1}{4}$ de laboratoires publics. La représentativité est nationale avec une répartition homogène en fonction de la densité de la population, ce qui limite les biais de sélection et doit permettre de suivre correctement l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques et l'éventuelle émergence de résistances.

Depuis 2012 et la séparation entre surveillance microbiologique et épidémiologique, le réseau a subi de nombreuses évolutions, principalement liées au regroupement des laboratoires dans le cadre de l'accréditation et à la mutualisation des moyens. Actuellement, la majorité des laboratoires du réseau est multi-sites et, en 2012, la proportion des laboratoires appartenant au réseau a été estimée à environ 14,9% des laboratoires recensés par l'ANSM sur le territoire français. (La Ruhe G *et al.*, Eurosurveillance. 2015;13;20(32):21205). Quarante-cinq laboratoires de

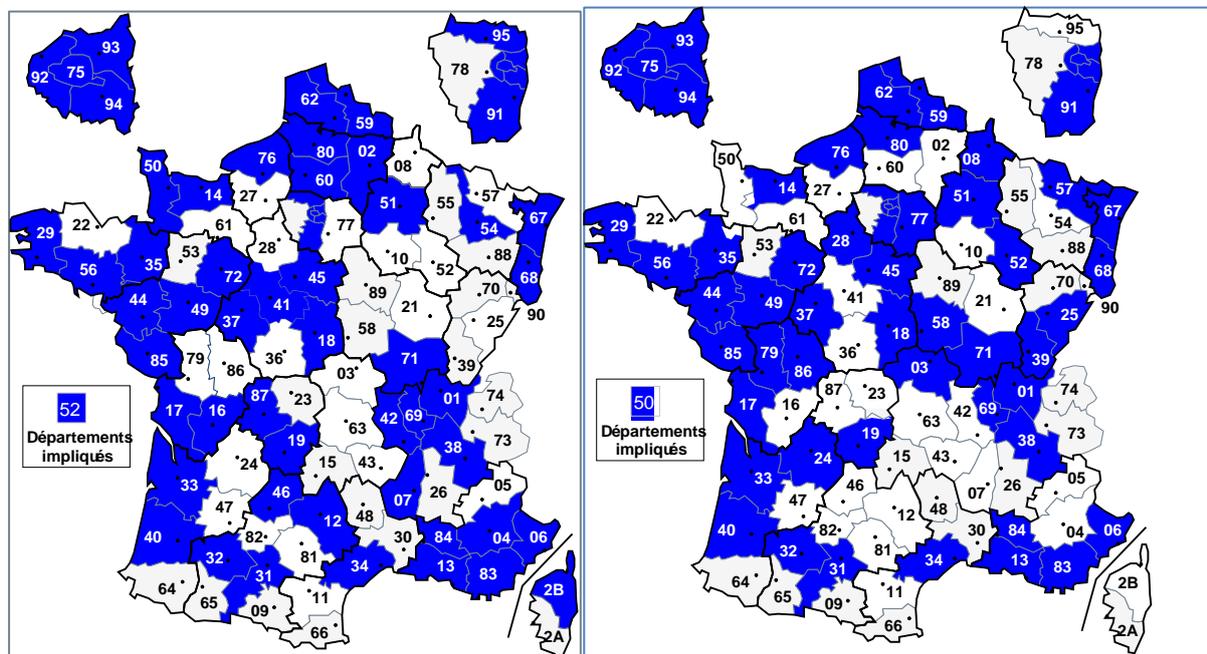
biologie médicale volontaires participant à la surveillance épidémiologique en envoyant les fiches épidémiologiques à Santé Publique France, tandis que 60 d'entre eux envoient les souches pour surveillance microbiologique.

Surveillance épidémiologique

Répartition des 95 laboratoires participants
(Source : InVS 2014 – révision A. Goubard 2017)

Surveillance microbiologique

Répartition des 60 laboratoires participants,
50 départements (Source : InVS 2014 -
révision A. Goubard et AF. Aséré 2017)



En 2017, environ 37 de ces laboratoires ont adressés leurs souches de gonocoques à l'institut Fournier.

En 2017, le nombre de souches a été réduit à 400 et le recrutement correspond à un réseau de ville. En parallèle, la création d'un réseau plus hospitalier a été effectuée (solicitation pour une enquête nationale sur une semaine). Cette enquête sera renouvelée en 2018 sur une période plus longue.

Certaines formes de gonococcies (formes généralisées, infantiles, ano-rectales, pharyngées,) ou une évolution épidémique de l'infection dans une population ou une région particulière peuvent être déclarées dans le réseau de même que toute forme inhabituelle d'infection gonococcique. De même, en cas de résistance inhabituelle ou tout autre cas particulier, des investigations complémentaires (génotypage, étude du résistome, séquençage...) peuvent être entreprises.

3.1.3 Laboratoire APHP Cochin Réseau partenaire

Depuis sa création en 2006, le CNR syphilis reçoit des prélèvements (écouvillons cutanéomuqueux et sang) dans le cadre de protocoles mis en place conjointement avec l'ANSP (Etude Microbiologique de la Syphilis 2006-2010 et GENOSYPH 2011-en cours). La participation des centres préleveurs étant basée sur le volontariat. Le CNR syphilis reçoit également des prélèvements pour expertise par les médecins et/ou biologistes qui en font la demande dans le cadre de leur prise de décision pour un diagnostic.

Sur la totalité des échantillons reçus, le laboratoire associé syphilis a réalisé la détection génomique systématique du génome de *T. pallidum* et une expertise sérologique comprenant un test RPR (test non tréponémique, TNT), un test ELISA de 1^e criblage et un test Western blot IgG de 2^e criblage (test tréponémique, TT) si le TNT est négatif. Un test TNT VDRL charbon est réalisé systématiquement sur les LCR. Les praticiens participant aux protocoles du CNR et/ou envoyant des échantillons pour expertise appartiennent majoritairement au réseau MST-SIDA de la Société Française de Dermatologie et au réseau RéSIST.

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 l'année 2017, le laboratoire associé syphilis a reçu un total de 110 échantillons (sérum + écouvillons) provenant des centres collecteurs de l'étude GENOSYPH (Services de Dermatologie-MST des hôpitaux Cochin, CeGGiD de Tourcoing, de Nancy, de Marseille, Hôpital Jean Bernard de Valenciennes, Thionville). Les échantillons proviennent principalement d'Ile-de-France et des centres de Marseille, Valenciennes et Thionville (figure ci-dessous).



Figure. Répartition géographique des prélèvements GENOSYPH reçus pour l'année 2017.

Dans le cadre de l'étude microbiologique de la syphilis, nous avons recruté un total de 478 patients sur la période 2006–2010. Cette étude, localisée uniquement sur la région Parisienne nous a permis d'inclure, en plus d'un prélèvement sérique et d'un écouvillon, un prélèvement sanguin sur anticoagulant et de l'acheminer au CNR syphilis dans un délai d'un jour. A partir de 2011 nous avons mis en place l'étude GENOSYPH axée uniquement sur la collecte d'écouvillons et de sérums qui a permis d'étendre l'étude à plusieurs centres collecteurs répartis sur le territoire français (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.

L'année 2011 a été consacrée à la prise de contact par l'intermédiaire du réseau MST-SIDA de Centres volontaires voulant participer à cette étude. 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. Un total de 18 centres ont été contactés pour participer à l'étude GENOSYPH en plus des centres Parisiens. Il faut noter la participation constante du centre de Nancy (Dr. Pinault) et la forte participation des centres de Marseille (Drs. Martinet, Saule, Vernay-Vaisse).

Cependant, le nombre de centres participants reste peu important. Ce problème, identifié par le Comité des CNR, reste à améliorer. L'envoi d'une fiche recto-verso de type « flyer » regroupant les activités du CNR pour tenter d'augmenter le nombre de centres participants n'a pas permis de recruter plus de centres. La contrainte majeure reste les frais d'acheminement des échantillons. Dans le cadre de la création du nouveau CNR IST bactériennes, nous

envisageons de mettre en place un système d'enveloppes pré-payées par le CNR comme le réalise avec succès par le laboratoire du CHU de Bordeaux pour *C. trachomatis* et mycoplasmes urogénitaux.

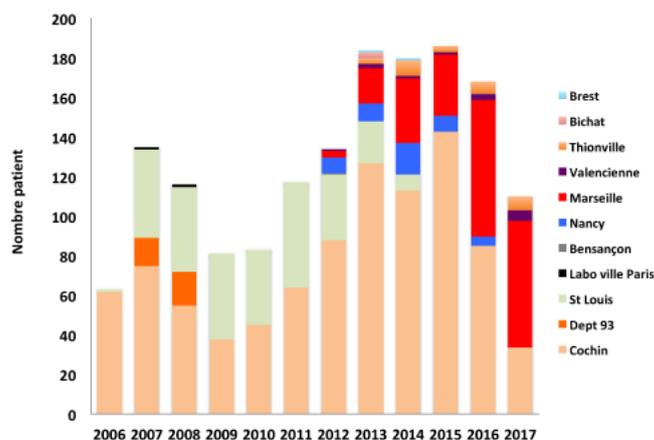


Figure. Nombre de patients recrutés par les centres préleveurs participant à GENOSYPH sur la période 2006-2017.

3.1.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2017, le laboratoire associé syphilis a reçu 749 échantillons correspondant à 643 patients répartis sur 100 centres différents. Les échantillons envoyés proviennent de l'ensemble du territoire avec principalement l'Ile-de-France qui reste fortement représentée. A ce jour, l'ensemble des régions, à l'exception de la Corse, nous ont envoyé des prélèvements pour l'année 2017 (figure ci-dessous).



Figure. Nombre et provenance des échantillon envoyés pour expertise pour l'année 2017.

A partir de l'année 2011, le nombres de centres envoyant des échantillons pour expertise n'a cessé d'augmenter graduellement pour atteindre une centaine en 2017 (tableau ci-dessous).

Tableau. Evolution du nombre de centres depuis 2011.

Année	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011
Nb de centre	100	86	91	92	65	37	39

Sur la période 2006-2017, 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 4 : Provenance des échantillons reçus par le CNR syphilis pour expertise en 2006-2017.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Notre surveillance concerne l'épidémiologie des anorectites à *C. trachomatis*.

3.2.1.1 Anorectites à souches L

Le nombre de cas de LGV en 2017 est de 469, soit une diminution de 24% par rapport à 2016 (582 cas). Nous observons un pic en 2016, et bien que le nombre de cas de LGV soit sensiblement le même entre 2015 et 2017, il apparaît que l'année 2017 est légèrement en dessous de la courbe épidémiologique. Il est à noter que nos collègues de Public Health England au Royaume Uni ont vu une diminution de 50% de leurs cas de LGV en 2017. L'année 2018 permettra de confirmer ou d'infirmer cette tendance. Toutefois, la courbe épidémiologique est toujours en hausse. Au total sur la période 2010-2017, le nombre de cas de LGV s'élève à 2785 (figure ci-dessous).



Figure. Evolution des cas de LGV en France 2010-2017.

Cette diminution des cas en 2017 s'observe plus fortement dans les laboratoires qui sont pérennes depuis 2010. Entre 2016 et 2017, on observe une baisse de 24% sur l'ensemble du territoire tandis que les laboratoires constants marquent un recul de 49,6 % (figure ci-dessous). Nous n'avons pas pour le moment d'explications très claires. Il est vrai que l'année 2016 a été marquée par une augmentation de 25% qui ne s'est pas confirmée en 2017. Le nombre de cas est stable entre 2015 et 2017 si on exclut 2016. D'autre part, en analysant plus finement les patients VIH+ symptomatiques qui sont majoritairement infectés par une souche L, nous constatons que la fréquence de souches non L est stable en 2015 et 2016, de l'ordre de 22,5% et que cette fréquence passe à 38,5% en 2017. Nous envisageons de séquencer ces souches non L (n=103) pour confirmer ou non l'hypothèse de la dissémination d'un nouveau variant non détecté par notre technique.



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 2017, le nombre de cas d'anorectites à souches non L a presque doublé (+ 45,5 %), passant de 790 cas en 2016 à 1150 cas en 2017. Il faut rappeler qu'en 2016, nous avons exclu 616 dossiers de la base de données en raison de la charge de travail. Ces dossiers exclus correspondaient à des patients asymptomatiques VIH- ou de statut VIH inconnu (figure ci-dessous). Cette très nette augmentation est due à la surveillance accrue des HSH sous PrEP qui font partie de la population VIH- asymptomatique précédemment exclue de notre vigilance. Dans cette population HIV-

ayant une anorectite à souche non L, 65,3% sont des patients sous PrEP. Cette population fera l'objet d'un paragraphe à part.

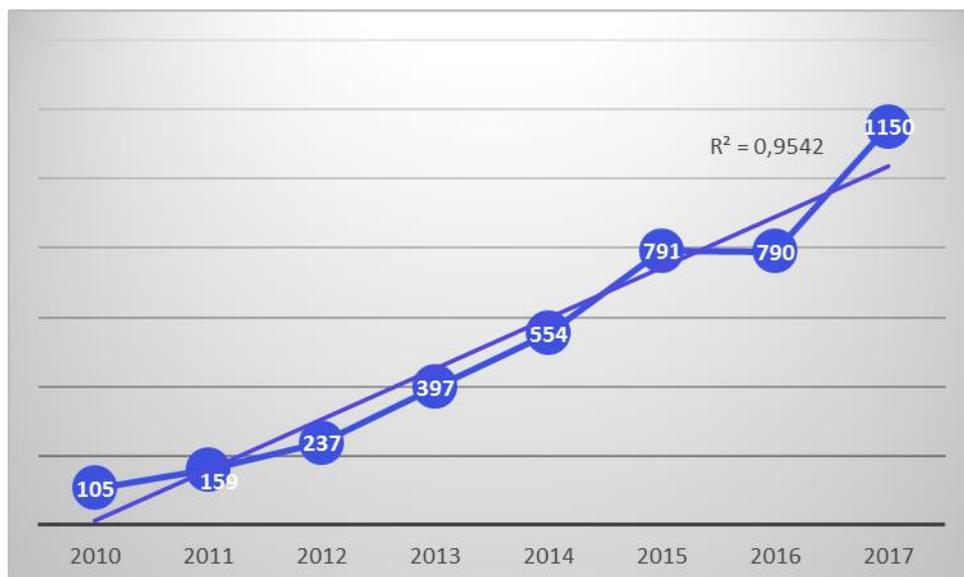


Figure. Évolution des cas d'anorectites non LGV en France 2010-2017.

Notre activité de typage de souches non L continue d'augmenter. Cette hausse ne s'explique pas uniquement par l'accroissement de la taille du réseau de nos correspondants ; en effet, l'augmentation de 45,5 % sur l'ensemble de la population est corroborée par celle de nos 10 laboratoires pérennes (+ 45,8 %).

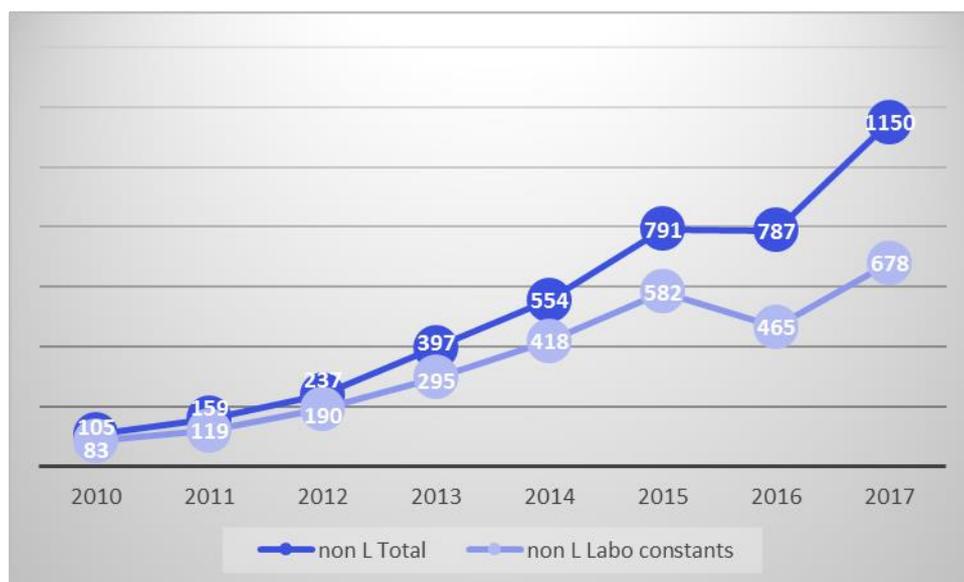


Figure. Évolution du nombre de cas d'anorectites non LGV sur le réseau et sur les laboratoires constants.

Le typage régulier des souches non L anorectales ne montre pas de variation de génovar d'une année sur l'autre. Quatre types dominent dans l'ordre D/Da > G > E > J. Cependant, en 2017, nous avons identifié 5 souches de génovar B, habituellement trouvé dans le trachome. Quelques souches de génovar B ont été identifiées dans les échantillons urogénitaux mais jamais à notre connaissance dans l'anus. L'analyse génétique de ces souches est en cours.

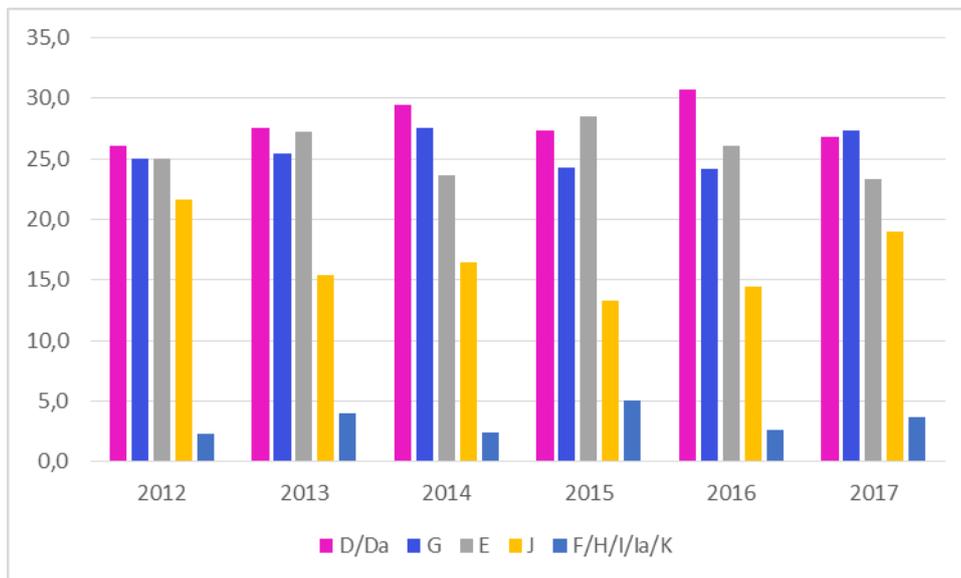
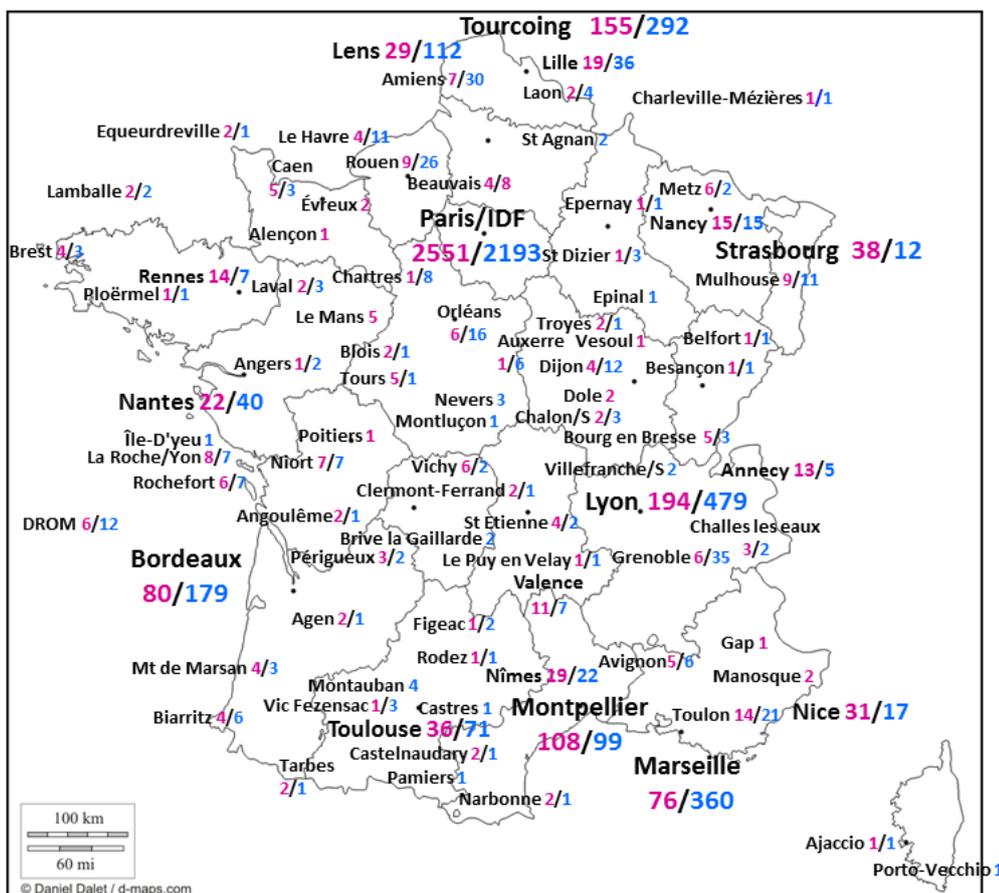


Figure. Génovars retrouvés dans les anorectites non L, 2012-2017.

3.2.1.3 Répartition géographique des anorectites

L'implantation du réseau couvre la majeure partie du territoire comme le montre la carte géographique ci-dessous. Si Paris reste la ville où l'on observe le plus de cas de LGV (2551 cas), viennent ensuite par ordre de fréquence Lyon (194 cas), Lille-Tourcoing (174 cas), Montpellier (108 cas), Bordeaux (80 cas), Marseille (76 cas) et Strasbourg (38 cas).

Répartition géographique LGV (3703) / non LGV (4589) France 2002-2017



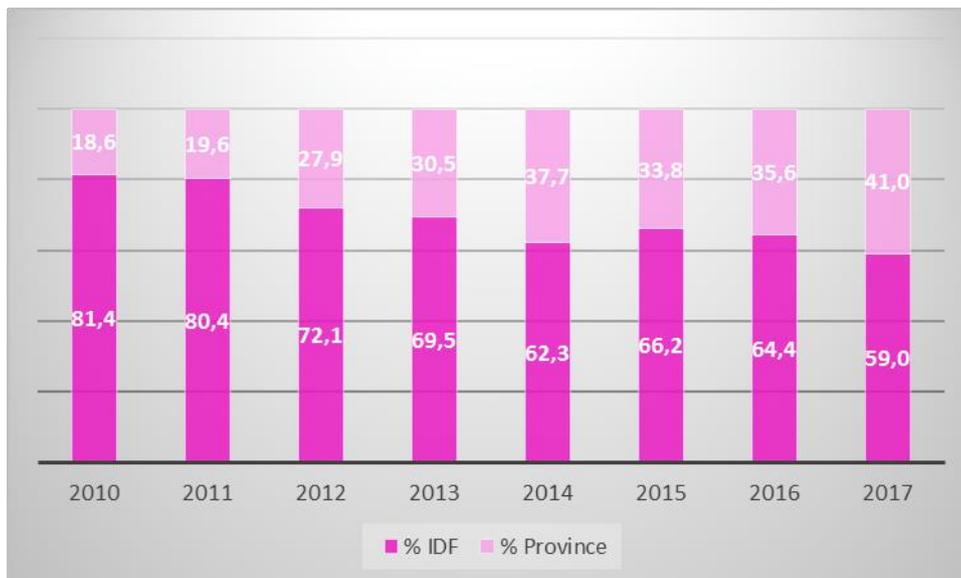


Figure. Répartition des cas de LGV entre Paris et la province.

Les cas d'anorectites non LGV majoritairement localisés à Paris en 2010, sont devenus prépondérants en province entre 2012 et 2016 et redeviennent essentiellement franciliens en 2017, (figure ci-dessous). Cet accroissement des cas d'anorectites à souche non L en région parisienne peut partiellement s'expliquer par la localisation des patients sous PrEP qui habitent cette région dans presque 70% des cas.

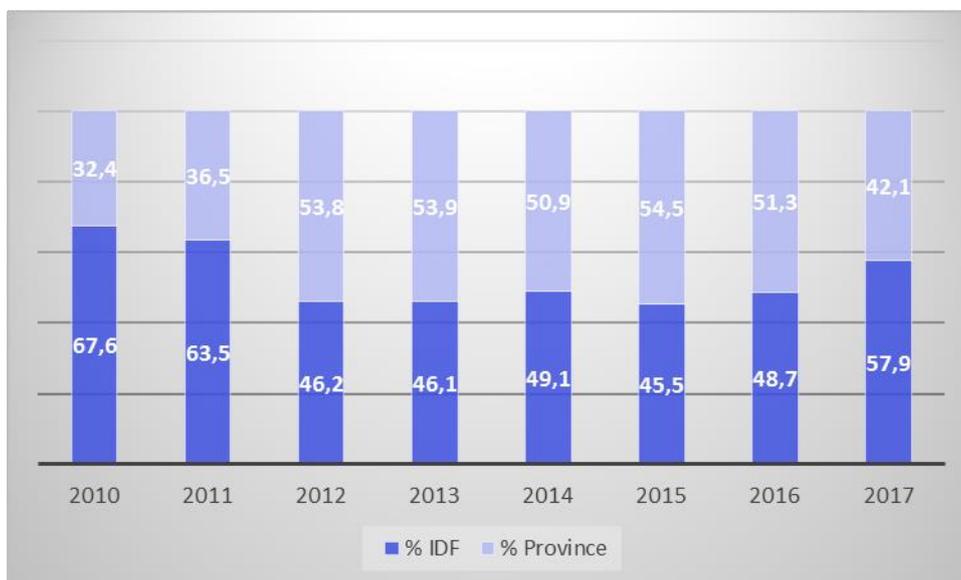


Figure. Répartition des cas d'anorectites non LGV entre Paris et la province.

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

Pour 2017 comme les années précédentes, les infections anorectales touchent majoritairement les hommes qui sont pour la plupart des HSH. Il faut noter 95 cas d'anorectite 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), un seul cas à souche L ayant été publié en 2011 par le CNR.

Les données de l'année 2017 n'étant recueillies en totalité, l'analyse des données biologiques, cliniques et comportementales ne sera effectuée qu'en mai 2018 et transmises aux membres du réseau sous la forme d'un poster, comme les années précédentes.

Le fait de recentrer la surveillance sur les patients VIH+ ou VIH- symptomatiques explique l'augmentation de patients VIH+ parmi les patients ayant une anorectite à souche non L, comme le montre la figure ci-dessous mais n'explique la diminution des cas de LGV parmi les VIH+.



Figure. Nombre de cas de LGV et d'anorectite non LGV parmi les patients séropositifs pour le VIH, 2010-2017.

- Analyse du groupe de patients sous PrEP

Pour rappel, la prophylaxie pré-exposition pour le VIH est remboursée en France depuis janvier 2016. Durant 2017, 524 échantillons provenant de patients bénéficiant de la PrEP ont été reçus. Parmi ceux-ci, nous avons exclus dans notre analyse 6 patients considérés comme doublon (deux échantillons reçus à moins de trois mois d'intervalle), 15 patients considérés comme récidivistes (même souche isolée chez un même patient à plus de 3 mois d'intervalle) et 10 patients considérés comme recontaminés (souche différente isolée chez un même patient à plus de 3 mois d'intervalle). Au total, notre analyse porte sur 493 patients prenant la PrEP. Une souche de génovar L a été détectée dans 90 cas (18,3%) et de génovar non L dans 403 cas (81,7%).

L'âge était similaire au sein des 2 groupes, LGV et non LGV, (âge médian = 36,7 [22-55] vs 35,9 [17-69]). Les symptômes cliniques étaient plus fréquents dans les cas LGV (67,1%, 51/76 vs 20,9%, 65/311) ($p < 0,001$). Un partenaire sexuel occasionnel était rapporté dans 100% (41/41) des cas LGV, vs 96,1% (149/155) des cas non LGV. Dans les cas LGV, 83,7% (41/79) ont rapporté au moins 5 partenaires sexuels différents au cours du mois précédent, vs 69,4% (120/173) des cas non LGV ($p = 0,048$). Dans les cas LGV, 19,7% (13/66) étaient co-infectés par *N. gonorrhoeae* versus 23% (65/282) dans les cas non LGV ($p = 0,56$). Enfin, 18,3% (13/71) des cas LGV avaient une syphilis versus 7,3% (21/288) des cas non LGV ($p = 0,005$).

Le séquençage du gène *ompA* a été obtenu pour 300 échantillons. Un génovar L a été confirmé dans 75 cas (25%) : 27 génovars L2 et 32 génovars L2b. Dans les 16 échantillons restants, 3 variants génétiques de L2b *ompA* ont été identifiés : L2bV1 (n=9), L2bV2 (n=5) et L2bV4 (n=2). Un génovar non L a été confirmé dans 215 cas (71,7%) : 60 D/Da, 58 E, 52 G, 37 J, 5 F, 2I/Ia et 1 B. Dans 6 cas, une coinfection ou un variant résultant d'un échange génétique entre un génotype LGV et un génotype Da (n=4), F (n=1) ou J (n=1) a été détecté. Dans 4 cas, une souche non L a été détectée par la PCR LGV alors que le séquençage du gène *ompA* a identifié 3 souches de génovar L2b et une de génovar L2.

Une prévalence élevée de LGV (18,3%, 90/493) a été identifiée parmi les cas d'anorectites à *C. trachomatis* chez les patients utilisant la PrEP. Il est intéressant de noter que ces patients sont plus jeunes que ceux ayant une LGV sans PrEP (37,6 ans vs 41,5 ans ; $p = 0,013$). De plus, les cas LGV présentaient des comportements sexuels à haut risque d'IST. La répartition des génovars est similaire à celle que nous avons récemment publiée (Peuchant et al, Emerg Infect Dis. 2016). Nous avons également trouvé des souches présentant un signal positif avec la PCR spécifique LGV alors que la séquence du gène *ompA* a identifié une souche de génovar Da ou F ou J, suggérant un échange génétique entre génotypes ou un mélange de souches.

3.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Les données épidémiologiques des gonococcies sont issues des cas déclarés sur le site SolIST. Tous les laboratoires n'ont actuellement pas rempli toutes les variables du questionnaire mais les données ont été figées au 26.04.18 pour les besoins du rapport (problèmes de dysfonctionnement du site pendant une période et retard de déclaration de certains laboratoires). Globalement, le nombre de cas déclarés dans le réseau a fortement augmenté entre 2012 et 2016, passant de 2830 à 4676 cas, mais on observe une diminution des déclarations en 2017 (3667 cas).

3.2.2.1 Répartition en fonction du sexe

Après une très légère augmentation entre 2012 et 2016, la proportion de cas chez l'homme a très légèrement diminué mais cela n'a pas impacté le sexe ratio qui reste à 2,8 en 2016 et 2017 (tableau ci-dessous).

Tableau. Nombre de cas de gonococcies par année et par sexe 2012-2017.

	2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Hommes	1949	68,90%	2214	69,00%	2463	69,90%	2816	70,00%	3437	73,50%	2654	72,38%
Femmes	879	31,10%	988	30,80%	1049	29,80%	1168	29,00%	1237	26,45%	939	25,61%
NP	2	0,10%	7	0,20%	12	0,30%	12	0,30%	2	0,04%	74	2,02%
TOTAL	2830	100%	3209	100%	3524	100%	3996	100%	4676	100%	3667	100%

3.2.2.2 Répartition en fonction de l'âge

Depuis 2013, chez l'homme, ce sont les 20-29 ans qui sont les plus atteints et, chez la femme, la classe d'âge la plus touchée est 15-24 ans (tableaux ci-dessous).

Tableau. Distribution des cas de gonococcies par classes d'âge chez l'homme 2012-2017.

HOMMES	2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-4 ans	4	0%	1	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
5-9 ans	26	1%	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%
10-14 ans	0	0%	2	0%	6	0%	1	0%	2	0%	0	0%
15-19 ans	2	0%	153	7%	269	11%	210	8%	206	6%	161	7%
20-24 ans	153	8%	625	29%	692	28%	744	27%	941	28%	585	24%
25-29 ans	581	31%	536	25%	531	22%	610	22%	805	24%	577	23%
30-34 ans	416	22%	313	14%	275	11%	417	15%	488	14%	396	16%
35-39 ans	276	15%	205	9%	196	8%	292	11%	313	9%	270	11%
40-44 ans	161	9%	139	6%	163	7%	178	7%	221	7%	172	7%
45-49 ans	128	7%	85	4%	113	5%	112	4%	170	5%	132	5%
50-54 ans	81	4%	53	2%	80	3%	79	3%	125	4%	88	4%
55-59 ans	44	2%	34	2%	37	2%	50	2%	60	2%	40	2%
60-64 ans	16	1%	17	1%	28	1%	29	1%	26	1%	28	1%
65 ans et +	16	1%	15	1%	72	3%	16	1%	26	1%	11	0%
Total	1904	100%	2178	100%	2462	100%	2738	100%	3384	100%	2460	100%

Tableau. Distribution des cas de gonococcies par classes d'âge chez la femme 2012-2017.

FEMMES	2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-4 ans	0	0%	1	0%	3	0%	2	0%	0	0%	0	0%
5-9 ans	18	2%	0	0%	1	0%	0	0%	2	0%	0	0%
10-14 ans	2	0%	10	1%	15	1%	2	0%	8	1%	2	0%
15-19 ans	13	2%	284	29%	309	29%	235	20%	258	21%	217	25%
20-24 ans	270	31%	361	37%	309	29%	386	34%	410	34%	275	31%
25-29 ans	306	36%	147	15%	162	15%	215	19%	209	17%	158	18%
30-34 ans	109	13%	55	6%	83	8%	103	9%	90	7%	97	11%
35-39 ans	61	7%	31	3%	43	4%	72	6%	61	5%	32	4%
40-44 ans	31	4%	24	2%	22	2%	39	3%	45	4%	39	4%
45-49 ans	14	2%	17	2%	22	2%	21	2%	38	3%	20	2%
50-54 ans	8	1%	14	1%	26	2%	22	2%	29	2%	19	2%
55-59 ans	15	2%	14	1%	17	2%	22	2%	44	4%	14	2%
60-64 ans	10	1%	10	1%	17	2%	17	1%	17	1%	9	1%
65 ans et +	2	0%	8	1%	19	2%	11	1%	12	1%	3	0%
Total	859	100%	976	100%	1048	100%	1147	100%	1223	100%	885	100%

3.2.2.3 Répartition en fonction du site de prélèvement

Chez l'homme, la gonococcie siège principalement au niveau urétral. La majorité des gonocoques est isolée au niveau de l'urètre ou du premier jet urinaire (73,4% en 2017). La proportion de souches isolées au niveau anorectal augmente depuis 2012 et est passée de 9% à 15% entre 2015 et 2016. Elle reste stable à 15,7% en 2017. De même, la proportion de gonocoques isolés au niveau du pharynx est passée de 4% à 10% entre 2015 et 2016 et reste à 10,7% en 2017. Cette augmentation traduit certainement une augmentation du dépistage des personnes ayant des pratiques à risques mais le portage pharyngé reste vraisemblablement sous-évalué car l'utilisation des préservatifs lors des rapports bucco-génitaux est très rare et les symptômes pharyngés, quasiment inexistant, n'incitent pas à cette recherche.

Chez la femme, le gonocoque est principalement responsable de cervicites et la majorité des souches de gonocoques reste isolée au niveau col/vagin (83,5%). Cependant, on note une augmentation des souches isolées au niveau de l'urètre ou des urines de premier jet car les demandes de dépistage/diagnostic sur ces prélèvements sont en augmentation : 6% en 2015 vs 11% en 2016 et 11,3% en 2017.

3.2.2.4 Répartition en fonction du caractère symptomatologique ou non de l'infection

Chez l'homme, l'infection est généralement symptomatique (83% des cas renseignés) mais chez la femme, l'infection est généralement peu ou pas symptomatique et de nombreux cas correspondent à un dépistage systématique chez les femmes jeunes normalement asymptomatiques, ce qui implique l'absence d'informations et la répartition variable des cas symptomatiques ou non.

3.2.2.5 Répartition en fonction de la présence d'IST associées et du type d'IST associées

La présence d'IST associées est difficile à évaluer car cette donnée est peu renseignée. Toutefois, lorsque le type d'IST associées est renseigné, chez l'homme, les infections à *C. trachomatis*, restent les plus fréquentes (61,2%) mais on note une augmentation de la proportion de patients VIH (+) (7% en 2012, 16% en 2016 et 18,93% en 2017) et une association avec la syphilis qui est passée de 6% en 2012 à 16% en 2016 et 17,2% en 2017.

Chez la femme en revanche, les IST associées sont principalement des infections à *C. trachomatis* dans une proportion qui reste stable (89,5%). On note par ailleurs une proportion non négligeable d'association avec *M. genitalium* (3,4%).

3.2.2.6 Répartition en fonction de la structure de consultation et du type de prescripteur

D'une façon globale, les gonococcies sont majoritairement diagnostiquées en ville (45,43%) mais les informations émanant du réseau de surveillance sont un peu biaisées car celui-ci est principalement constitué de structures privées. La part des infections diagnostiquées dans les CeGIDD reste stable depuis 2012 (26,4%) et concerne préférentiellement les hommes.

3.2.3 Laboratoire APHP Cochin

Sur la période 2006-2017, le laboratoire associé syphilis a réceptionné 481 sérums et 1530 écouvillons dans le cadre des protocoles d'étude et 2910 échantillons au titre de l'expertise. L'ANSP, 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

L'ensemble de ces échantillons a été testé par nPCR. La majorité des prélèvements réceptionnés sont des écouvillons d'origine génitale (49%) et buccale (27,3%) alors que les écouvillons d'origine anale ou cutanée sont moins représentés à 18,1 et 5,4%, respectivement (figure ci-dessous). Aucun sérum n'a été récolté pour l'année 2017. La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR dans l'ensemble des écouvillons est de 33,6% (37/110) se répartissant à 19% (21/110) d'échantillons positifs dans les écouvillons génitaux, à 6,3% (7/110) pour les écouvillons anaux, 7,2% (8/110) pour les écouvillons buccaux et 0,9% (1/110) pour les écouvillons cutanés.

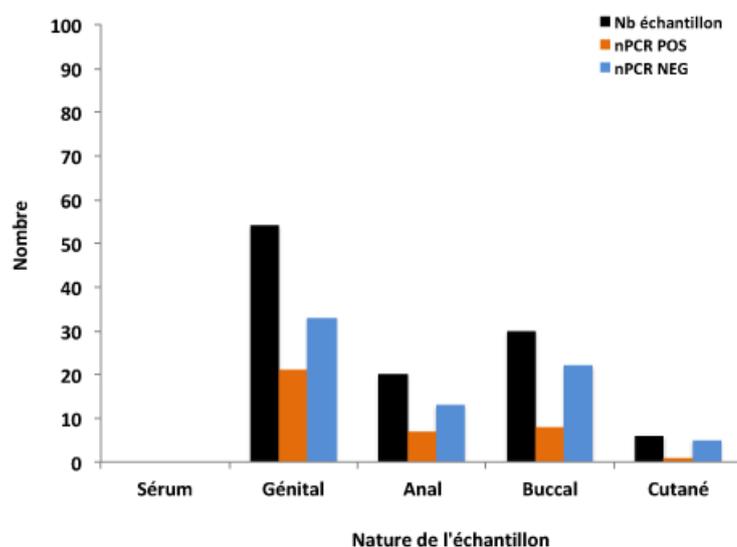


Figure. Répartition de la nature des échantillons et détection du résultat nPCR en 2017.

Pour l'année 2017, le laboratoire associé syphilis a reçu un total de 110 échantillons (sérums + écouvillons) provenant de 104 patients (80,6% d'hommes, d'âge moyen 36,1 ans). La population incluse dans l'étude microbiologique de la syphilis et GENOSYPH est en majorité masculine (figure ci-dessous) avec un total de 1261 hommes (93%) et de 95 femmes (7%). Le sexe ratio H/F est de 13,3:1.

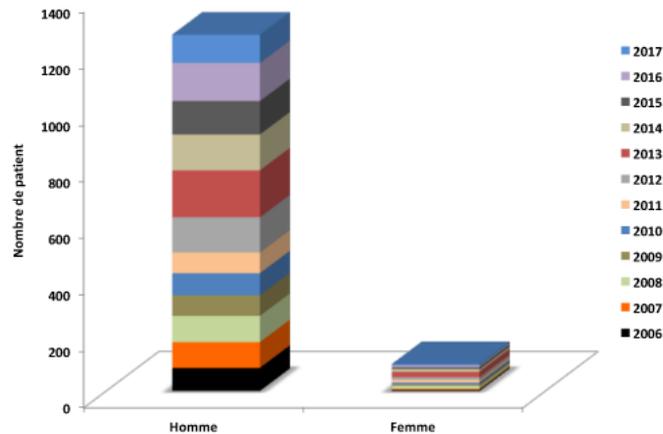


Figure. Répartition du sexe des patients recrutés sur la période 2006-2017.

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.

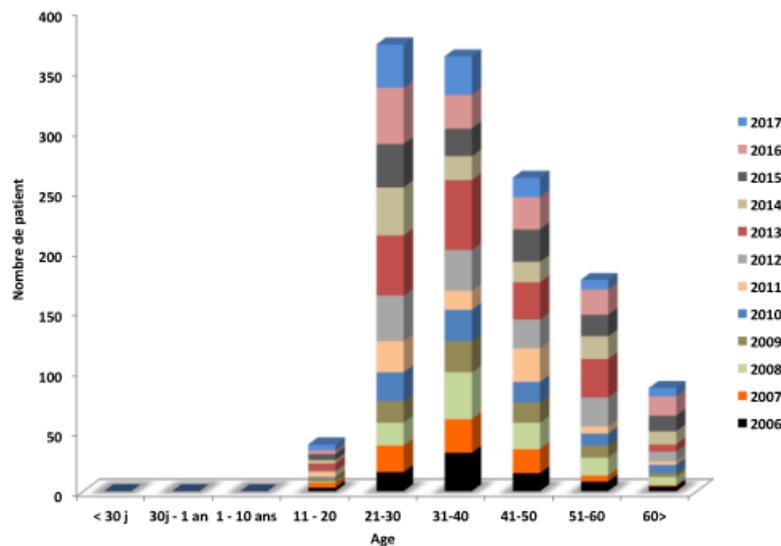


Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2017.

Sur la période 2006-2010, le nombre d'échantillons d'origine sanguine (sang total et sérum) a été satisfaisante 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 au centres préleveurs pour envoyer également des écouvillons d'origine buccale et anale. Depuis, la proportion d'écouvillons d'origine anale et buccale n'a cessé de progresser avec un fort recrutement des écouvillons buccaux depuis 2013 (figure ci-dessous).

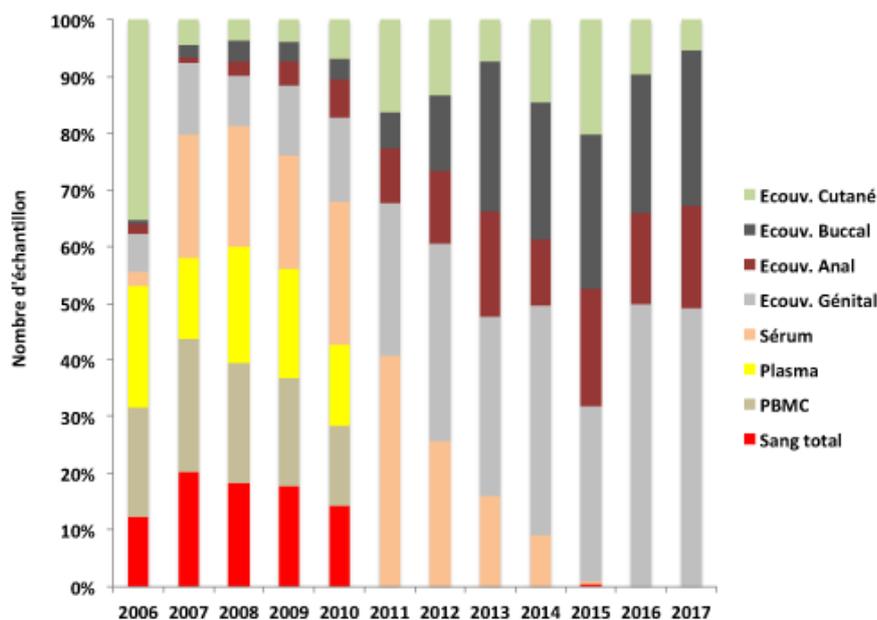


Figure. Répartition du site de prélèvement sur la période 2006-2017.

3.1.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2017, le laboratoire associé syphilis a reçu 749 échantillons correspondant à 643 patients (58,5% d'hommes d'âge moyen 47,4 ans). La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR du gène *tp47* correspond à 494 analyses dont 7,9% de résultats positifs. Les expertises sérologiques représentent 927 analyses dont 52,5% de résultats positifs, portant à un total de 1421 analyses réalisées pour expertise par le CNR sur l'année 2017. Les échantillons reçus pour expertise se répartissent comme suit : sérums (0,6%), sang total (5,7%), LCR (52,8%), écouvillons (19%), biopsies (3,4%), liquides amniotiques (2,4%), placentas (7,9%), sang cordon (0,8%) et autres (3,6%) (figure ci-dessous). Les autres échantillons correspondent à : liquide gastrique (4), humeur aqueuse (1), ADN extrait de liquide péritonéal (1), sécrétions nasales (2), chambre antérieure (1), membranes/placenta (3), ponction ganglion (1), liquide articulaire (1), prélèvements cutanés (3), bloc paraffine cloison nasale (1).

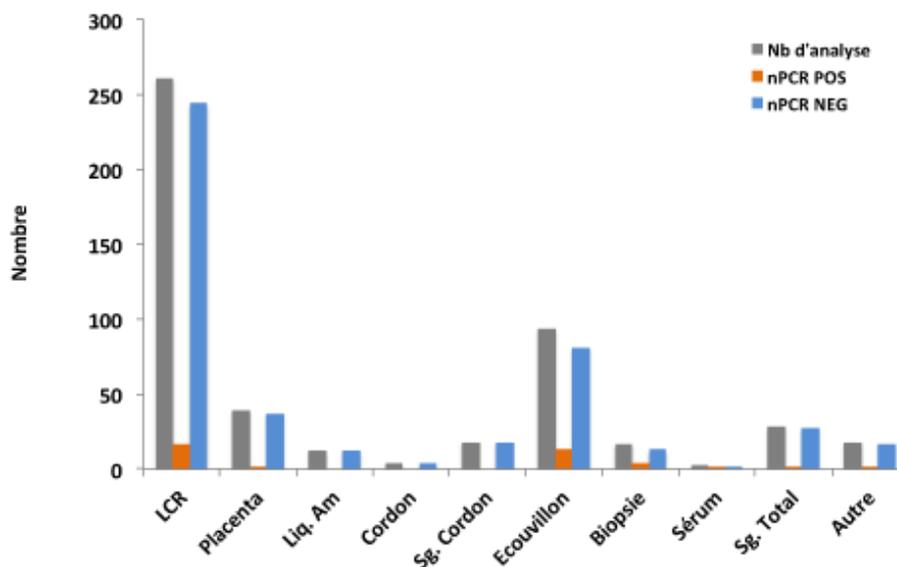


Figure. Répartition de la nature des échantillons reçus pour expertise en 2017 et analysés par nPCR.

Depuis 2012, le laboratoire associé syphilis 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 syphilis 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, beaucoup de laboratoires d'analyses médicales

ne souhaitant pas dans l'immédiat accréditer ce test et nous demande de le prendre en charge. Par ailleurs, il a été montré dans la littérature que le test non tréponémique RPR ne pouvait pas remplacer le VDRL (Marra *et al*, (2012) Sex Trans Dis 39:453) qui est toujours considéré comme test classant pour le diagnostic de neurosyphilis. Pour 2017, nous avons reçus 489 demandes d'expertise sérologique qui ont été testées par un TNT et par au moins un TT (figure ci-dessous). Ces demandes d'expertise sérologiques représentent 65,2% de l'ensemble des analyses réalisées.

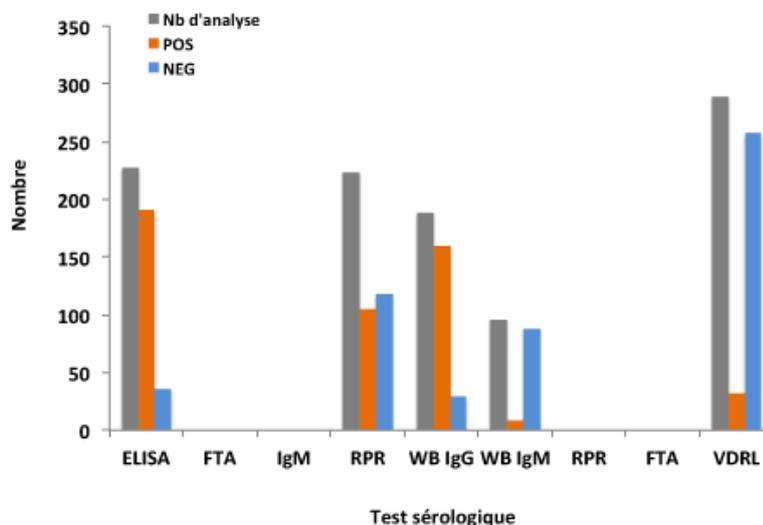


Figure. Répartition de la nature des analyses sérologiques effectuées en 2017.

Depuis sa création, le laboratoire associé syphilis 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 et de 32% en 2017 (figure ci-dessous).

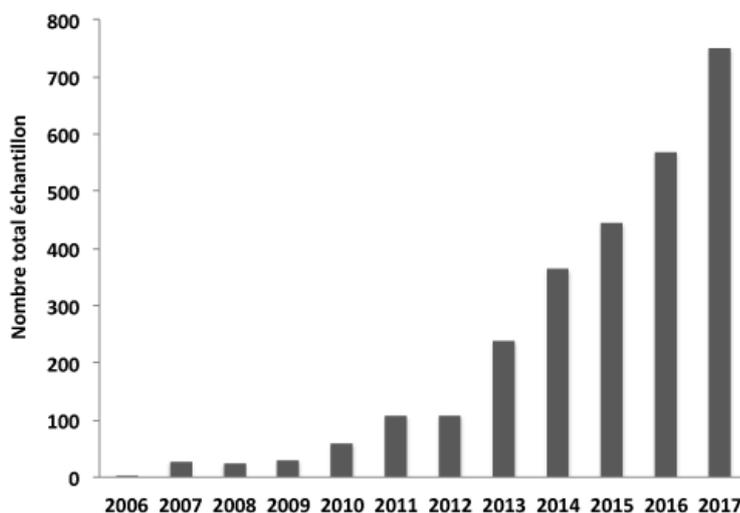


Figure. Echantillons extérieurs répertoriés par le CNR syphilis sur la période 2006-2017.

C'est une population à dominante masculine (figure ci-dessous) avec un total de 1526 hommes (64,5%) et de 838 femmes (35,4%). Le ratio sexe ratio H/F est de 1,8:1. La tranche d'âge 21-50 ans est majoritaire et représente plus de 50% des individus. Les nouveau-nés d'un âge inférieur à 30 j représentent 11% de la population analysée alors que la population âgée de 60 ans et plus représente 20% des échantillons envoyés (figure ci-dessous).

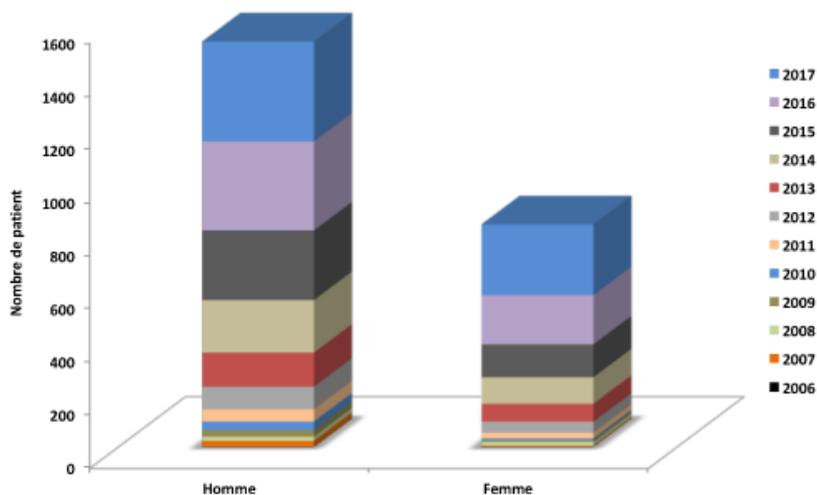


Figure. Répartition du sexe des patients sur la période 2006-2017.

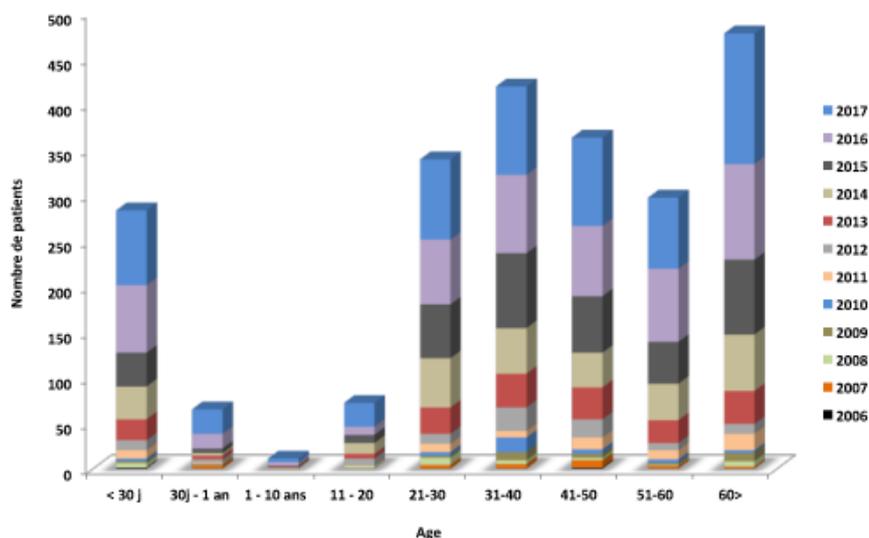


Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2017.

Il est intéressant de noter l'évolution de la nature des échantillons reçus par le laboratoire associé syphilis sur la période 2006-2017 (figure ci-dessous). A l'exception de 2006 (seulement 3 échantillons reçus), 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). Les écouvillons et les prélèvements sanguins représentent 12,2% et 29,3% des échantillons. Les biopsies, hors prélèvements périnataux, sont à 14,2%. Les prélèvements périnataux (liquide amniotique, placenta, cordon) représentent 10% des prélèvements. Les LCR représentent 32% des échantillons sur la période 2006-2016.

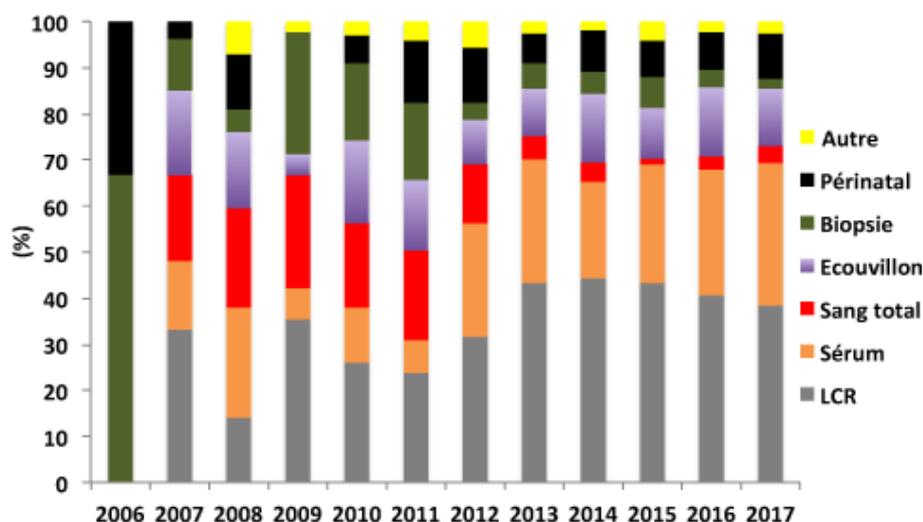


Figure 14. Répartition de la nature des échantillons reçus par le CNR syphilis sur 2006-2017.
Autre : liquide gastrique, biopsies ganglionnaire, cutanée et pulmonaire, humeurs aqueuse et vitrée.

La forte proportion de demandes sur le LCR a incité le laboratoire associé syphilis, en association avec Ndeindo Ndeikoundam de Santé Publique France, à prendre en compte différemment la gestion de ces échantillons. Ainsi, pour chaque résultat positif, le CNR syphilis envoie une demande de renseignement complémentaire lors du retour des résultats.

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

3.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

3.3.1.1 Etude IPERGAY

Dans le cadre de l'essai ANRS IPERGAY, coordonné par Jean-Michel Molina (APH Saint-Louis), qui a démontré l'efficacité de la PrEP en France, le CNR IST bactériennes a participé à l'étude ancillaire qui a évalué l'impact d'une prophylaxie post exposition (PEP) par doxycycline lors de rapports sexuels sur l'acquisition d'une IST bactérienne (infection à gonocoque, à *C. trachomatis*, à *M. genitalium* et à *T. pallidum*) chez les HSH. L'usage de la PEP par doxycycline a entraîné une diminution de 47% du risque d'acquérir une nouvelle IST (chlamydia, gonocoque ou syphilis), de 70% du risque d'acquérir une nouvelle infection à *C. trachomatis* et de 73% du risque d'acquérir une nouvelle syphilis chez les patients traités. Le CNR IST a typé les échantillons positifs à *C. trachomatis*, a isolé 5 souches à partir des échantillons pour lesquelles les CMI des tétracyclines et de l'azithromycine ont été réalisées. Aucune souche résistante n'a été isolée et 5 souches L ont pu être identifiées parmi les 14 échantillons typables dans cette population de PrEPeurs. Le CNR a également recherché la résistance aux fluoroquinolones chez 23 échantillons positifs à *M. genitalium* dont 2 se sont avérés mutés en ParC. Cette étude a été publiée dans Lancet Infect Dis en 2017 (Molina et al, Post-exposure prophylaxis with doxycycline to prevent sexually transmitted infections in men who have sex with men: an open-label randomised substudy of the ANRS IPERGAY trial. Lancet Infect Dis, Dec 8. pii: S1473-3099).

3.3.1.2 Surveillance de la résistance de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* aux tétracyclines et fluoroquinolones en France entre 2012 et 2015, avec caractérisation moléculaire des souches résistantes

Cinq cent quarante-quatre souches de *Ureaplasma* spp. et 91 souches de *M. hominis* ont été antibiogrammées par la galerie Mycofast RevolutionN (Elitech Microbio) et les CMI de la tétracycline et des fluoroquinolones, lévofloxacine et moxifloxacine ont été déterminées pour les souches résistantes (cf tableau ci-dessous). Les critères de catégorisation S, I ou R utilisés sont ceux définis par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les mycoplasmes humains, seuls existants à l'heure actuelle.

Tableau. Distribution des CMI des souches cliniques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* catégorisées résistantes par le kit MYCOFAST RevolutionN.

Espèces et antibiotiques ^a	No. (%) de souches catégorisées résistantes par le kit	No. (%) de souches avec la CMI (mg/L) indiquée								No. (%) de souches résistantes selon les CMI et le CLSI	
		<0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16		>16
<i>Ureaplasma</i> spp. (N=544)											
TET	59/544 (10.8)			5/59 (8.5)	9/59 (15.2)	19/59 (32.2)	7/59 (11.9)	3/59 (5.1)	4/59 (6.8)	12/59 (20.3)	45/544 (8.3)
L VX	54/544 (9.9)	1/54 (1.9)	11/54 (20.4)	11/54 (20.4)	14/54 (26.0)	11/54 (20.4)	4/54 (7.4)	1/54 (1.8)	1/54 (1.8)		6/544 (1.1)
MXF	18/544 (3.3)	9/18 (50)	2/18 (11.1)	5/18 (27.8)	1/18 (5.5)		1/18 (5.5)				1/544 (0.2)
<i>M. hominis</i> (N=91)											
TET	9/91 (9.9)				1/9 (11.1)					8/9 (88.9)	8/91 (8.8)
L VX	3/91 (3.3)					1/3 (33.3)			2/3 (66.7)		3/91 (3.3)
MXF	2/91 (2.2)					2/2 (100)					2/91 (2.2)

^aTET, tétracycline; LVX, lévofloxacine; MXF, moxifloxacine.

Le kit Mycofast RevolutionN surestime la résistance aux fluoroquinolones chez *Ureaplasma* spp. avec 8,8% (48/544) et 3,1% (17/544) de faux cas de résistance à la lévofloxacine et à la moxifloxacine respectivement identifiés. La résistance à la tétracycline semble également surestimée pour les *Ureaplasma* spp. avec 14 (2,6%) de souches faussement résistantes mais la différence n'est pas significative. Ces discordances ne sont pas retrouvées pour *M. hominis*.

La prévalence de la résistance était d'environ 8% pour les tétracyclines dans les deux espèces et était inférieure à 3% pour les fluoroquinolones (tableau ci-dessous). La recherche du gène *tet(M)* et de mutations au niveau des Quinolone Resistance Determining Regions ou QRDR *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* a été effectuée pour toutes les souches présentant une augmentation des CMI.

Tableau. Prévalence de la résistance aux tétracyclines et aux fluoroquinolones parmi 635 souches de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* collectées entre le 6 octobre 2012 et le 31 décembre 2015.

Année	Tétracycline ^a		Lévofloxacine ^a		Moxifloxacine ^a	
	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.	<i>M. hominis</i>
2012 ^b	12.8% (5/39)	0% (0/5)	2.6% (7/39)	0% (0/5)	2.6% (1/39)	0% (0/5)
2013	10.6% (17/161)	12.1% (4/33)	1.2% (2/161)	6.1% (2/33)	0% (0/161)	3.0% (1/33)
2014	5.6% (12/215)	5.1% (2/39)	0.9% (2/215)	2.6% (1/39)	0% (0/215)	2.6% (1/39)
2015	8.5% (11/129)	14.3% (2/14)	0.8% (1/129)	0% (0/14)	0% (0/129)	0% (0/14)
Total						
IC	8.3% (45/544)	8.8% (8/91)	1.1% (6/544)	3.3% (3/91)	0.2% (1/544)	2.2% (2/91)
95% ^c	[6.2-10.9]	[4.5-16.4]	[0.5-2.4]	[1.1-9.2]	[0.03-1.0]	[0.6-7.7]

^a % de résistance (nombre de souches résistantes/ nombre de souches testées).

^b Du 6 octobre au 31 décembre 2012.

^c IC 95%, intervalle de confiance à 95%.

La résistance aux tétracyclines était toujours liée à la présence du gène *tet(M)*. La résistance à la lévofloxacine était toujours associée à des mutations dans les QRDR du gène *parC* ou *parE*, tandis que la résistance à la moxifloxacine était associée à des mutations supplémentaires dans le gène *gyrA*.

Une publication est en cours de révision dans J. Antimicrobiol. Chemother.

3.3.1.3 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides à Bordeaux

La résistance aux macrolides chez *M. genitalium* est apparue en 2006 à Bordeaux. Après un palier autour de 14-15% entre 2007 et 2012, la résistance est en forte augmentation depuis 2015, dépassant en 2017 la valeur de 28% (figure ci-dessous).

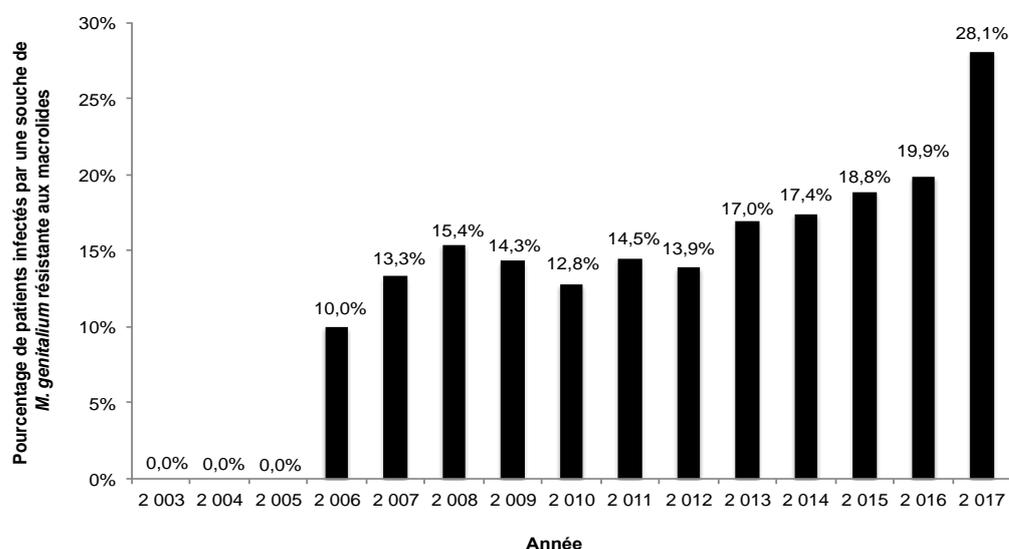


Figure. Evolution de la résistance aux macrolides de *M. genitalium* au CHU de Bordeaux entre 2003 et 2017.

Pour les années 2015 et 2016, la résistance aux fluoroquinolones a été étudiée chez respectivement 159 et 144 patients positifs à *M. genitalium* par PCR et séquençage de la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *parC* codant la topoisomérase IV, cible de ces antibiotiques. Dans cette population la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était de 13,2% en 2015 et de 6,3% en 2016. La proportion de double résistance, à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones, s'élevait à 3,7% en 2015 et à 2,3% en 2016.

3.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

3.3.2.1 Réseau de surveillance des gonococcies en France (Renago)

- Méthodes

Afin de s'adapter à l'évolution des molécules disponibles et de répondre aux recommandations européennes de traitement des infections génitales basses non compliquées (ceftriaxone 500 mg en IM plus azithromycine 2g *per os* : Unemo, M., Euro Surveill. 2012), le panel d'antibiotiques actuellement testé et recommandé est constitué de céfixime, ceftriaxone, azithromycine, gentamicine, tétracycline et ciprofloxacine. La méthode de l'antibiogramme repose sur la détermination des CMI par Etest. Les critères d'interprétation des antibiogrammes de gonocoque suivent la règle du CASFM, version février 2018 (cf. tableau ci-dessous).

Tableau. Catégorisation SIR en fonction des valeurs critiques de chaque antibiotique testé

Caractérisation	Valeurs Critiques (mg/l)					
	Tétracycline	Ciprofloxacine	Ceftriaxone*	Céfixime**	Spectinomycine	Azithromycine
Sensible	≤ 0,5	≤0,03	≤0,125	≤0,125	≤ 64	≤ 0,25
Intermédiaire	> 0,5 - ≤ 1	0,06	-	-	-	> 0,25 - ≤ 0,5
Résistant	> 1	> 0,06	> 0,125	-	> 64	> 0,5

* Les souches qui présentent une CMI à la ceftriaxone > 0,125 mg/l sont considérées comme résistantes d'après les critères de l'EUCAST. Le CA-SFM 2013 ne fixe pas de valeurs critiques de résistance. Seules des observations cliniques permettront de définir plus précisément ce point.

** Les souches qui présentent une CMI au céfixime > 0,125 mg/l sont considérées comme de sensibilité diminuée d'après les critères du CA-SFM 2013. L'EUCAST ne fixe aucune valeur critique pour cette molécule qui n'est plus recommandée en traitement. Au-delà de ces critères, les valeurs d'ECOFF (Epidemiological Cut-off value) permettent de différencier les souches sauvages des souches suspectes d'avoir acquis un mécanisme de résistance. Ainsi, pour des CMI ceftriaxone ≤ 0,032 mg/l les souches de gonocoques sont considérées comme sauvages mais des CMI ceftriaxone > 0,032 mg/l font suspecter des souches de sensibilité diminuée cet antibiotique et constitue un critère de vigilance.

- Evolution de la sensibilité à la tétracycline et à la ciprofloxacine

Après une progressive augmentation entre 2001 (62,7%) et 2005 (80,1%), la proportion de souches résistantes à la tétracycline s'est stabilisée autour de 80% jusqu'en 2014. Entre 2014 et 2015, elle est passée de 78,6% à 66,7%. Depuis 2015, elle est stable autour de 65% (65,4% en 2017). La proportion de souches de résistance à haut niveau aux tétracyclines correspond à un quart d'entre elles (23,2% en 2017).

Pour la ciprofloxacine, après une forte augmentation de la résistance entre 2001 (14%) et 2006 (47%), le nombre de souches résistantes aux fluoroquinolones reste stable autour 40% mais a légèrement diminué en 2017 (37,2%) (figure ci-dessous).

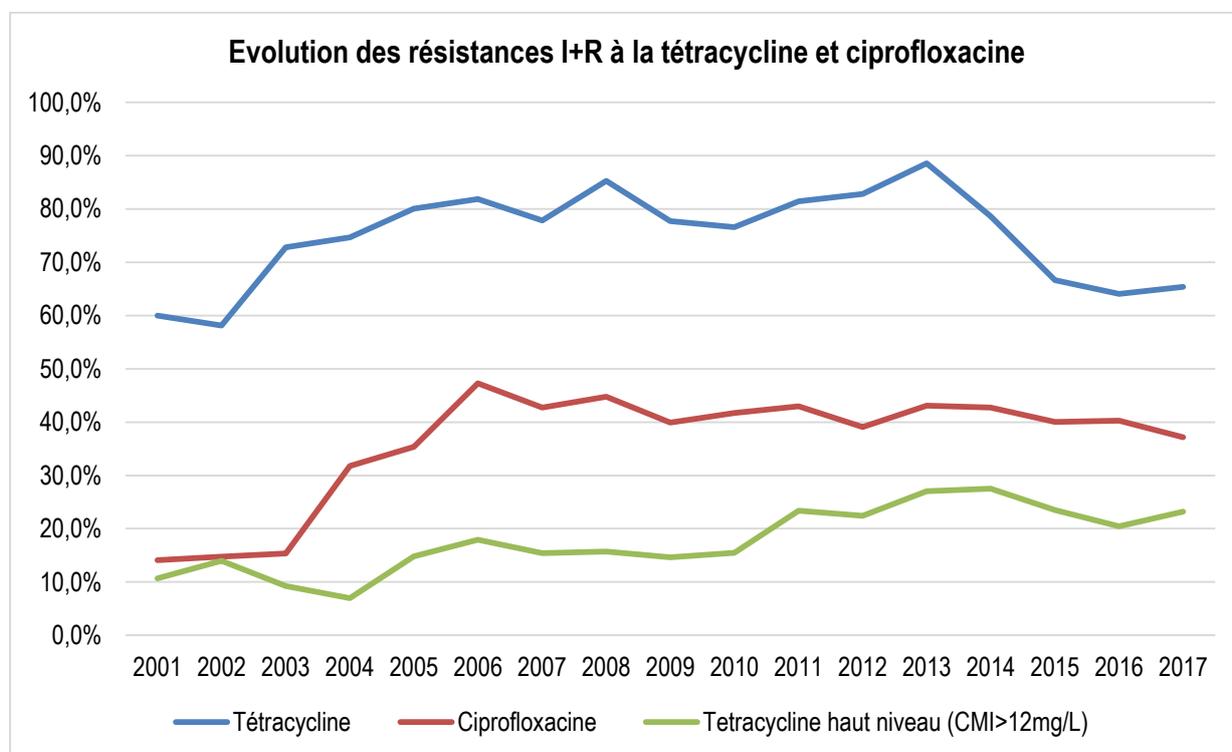


Figure. Evolution des résistances à la tétracycline et la ciprofloxacine entre 2001 et 2017.

- Evolution de la sensibilité aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfixime et ceftriaxone)

Céfixime

Entre 2008 et 2012, les CMI du gonocoque vis-à-vis des C3G, et surtout du céfixime, ont progressivement augmenté. La proportion de souches présentant une CMI au céfixime > 0,125 mg/l est ainsi passée de 0,12% en 2008 à plus de 3% en 2012 avec une importante progression entre 2011 et 2012. Entre 2012 et 2015, la proportion de ces souches a très nettement diminué (3 % en 2012 vs 0,3% en 2015) mais a légèrement réaugmenté depuis 2016 et reste stable (0,7% en 2016 et 0,73% en 2017) (cf figure ci-dessous).

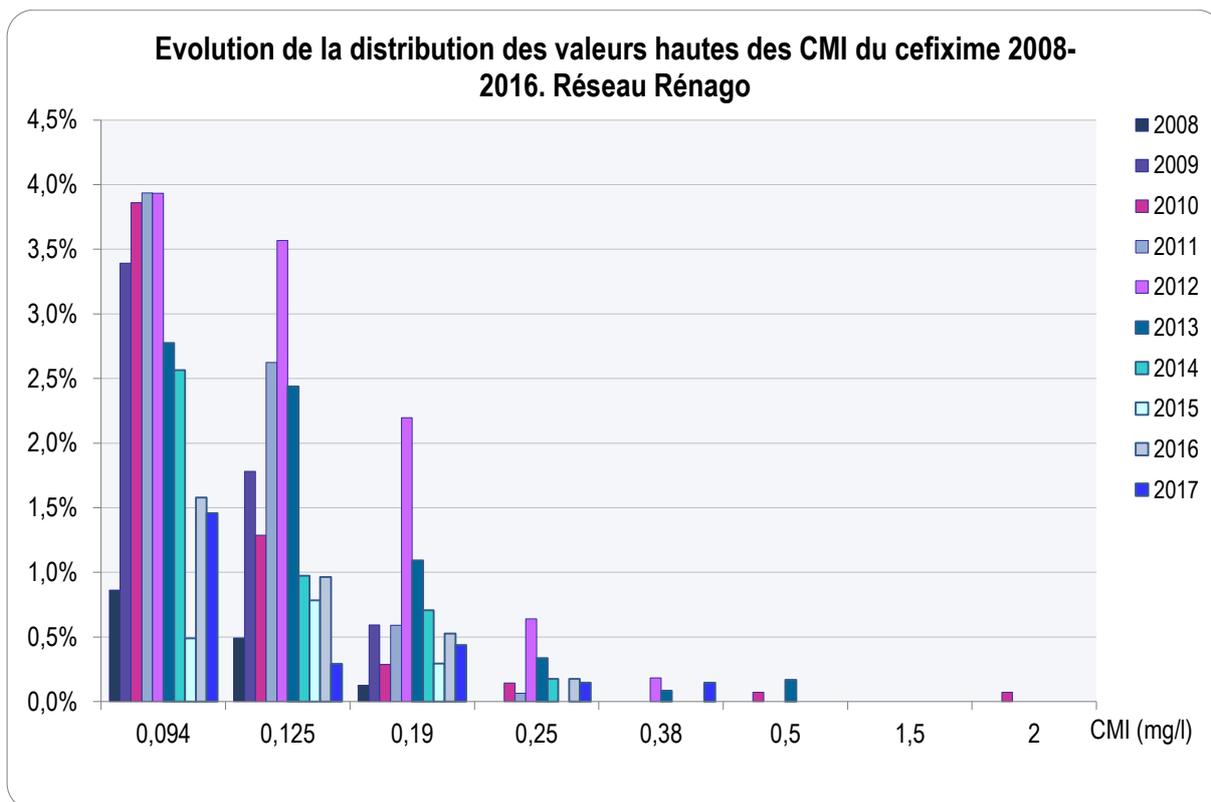


Figure : Evolution de la distribution des valeurs hautes des CMI du céfixime 2008-2017.

De même, la proportion de souches ne présentant plus des CMI de souches sauvages (> 0,064 mg/l) qui était de 10,52% en 2012 a diminué à 1,57% en 2015 et est de 2,48% en 2017 (figure ci-dessous). Il reste donc indispensable de suivre l'évolution des résistances à cet antibiotique afin de détecter les souches qui ont des gènes *penA* mosaïques car des remaniements additionnels pourraient entraîner une évolution vers un haut niveau de résistance aux C3G.

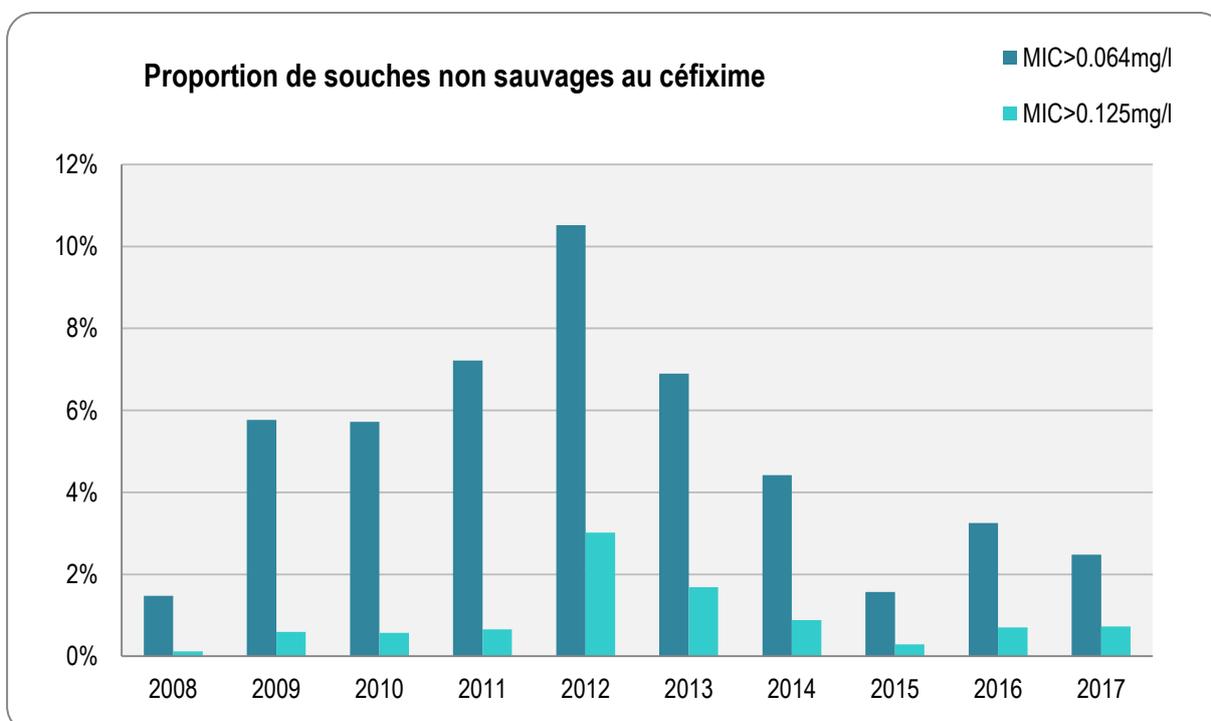
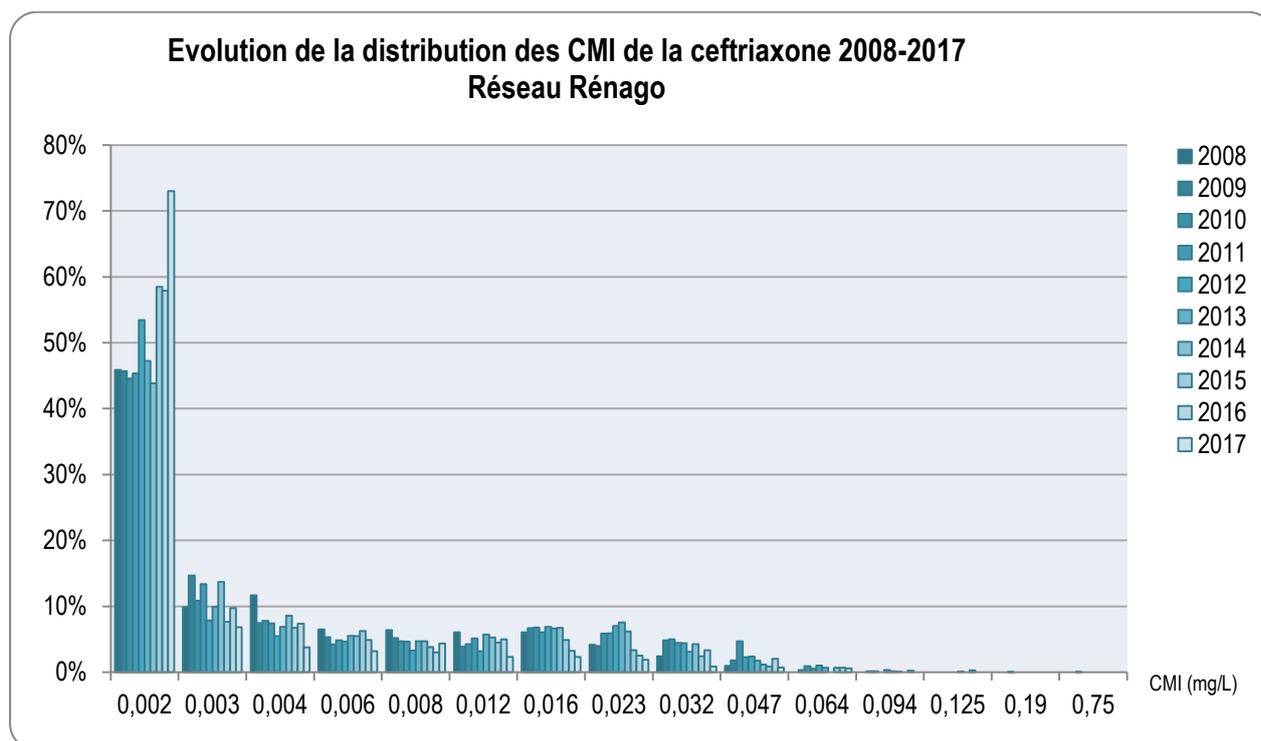


Figure. Evolution de la proportion de souches non sauvages au céfixime (CMI >0,064 mg/L) 2008-2017.

Ceftriaxone

En 2010, deux souches de gonocoque résistantes à la ceftriaxone ont été mises en évidence en France, dont la première souche française décrite (2^e mondiale) (Unemo *et al.* AAC 2012 ; 56(3):1273-80). Depuis, nous avons isolé 6 souches (3 en 2015 et 3 en 2016) présentant une CMI égale à la concentration critique de 0,125 mg/l. En 2017, une nouvelle souche (indépendante des effectifs étudiés dans le cadre de la surveillance) a été isolée au CeGGID de l'hôpital St Louis (cf figure ci-dessous). La description de cette souche est décrite dans le paragraphe ci-après.

En 2017, la majorité des souches présente toujours des CMI très basses (proches de 0,002 mg/l) et les très rares cas de résistance observés semblent n'être que sporadiques. Cependant, le contexte global d'émergence de résistances, tant chez le gonocoque que chez les autres espèces bactériennes, nous incite à rester très vigilants et à suivre de très près l'évolution de la sensibilité de *N. gonorrhoeae* aux céphalosporines. [Shimuta K *et al.* Antimicrob Agents Chemother. 2013 Nov;57(11):5225–32] ; [Cole MJ *et al.*, Euro Surveill. 2014;19(45):20955].



De même, la proportion de souches ne présentant plus des CMI de souches sauvages (> 0,032 mg/l) qui était de 5,93% en 2010 a diminué à 1,24% en 2014. Après une nouvelle augmentation à 2,98% en 2016, une nouvelle diminution est observée à 1,31% en 2017 (figure ci-dessous). Ces résultats sont concordants avec ce qui a été observé dans le même intervalle de temps avec le céfixime.

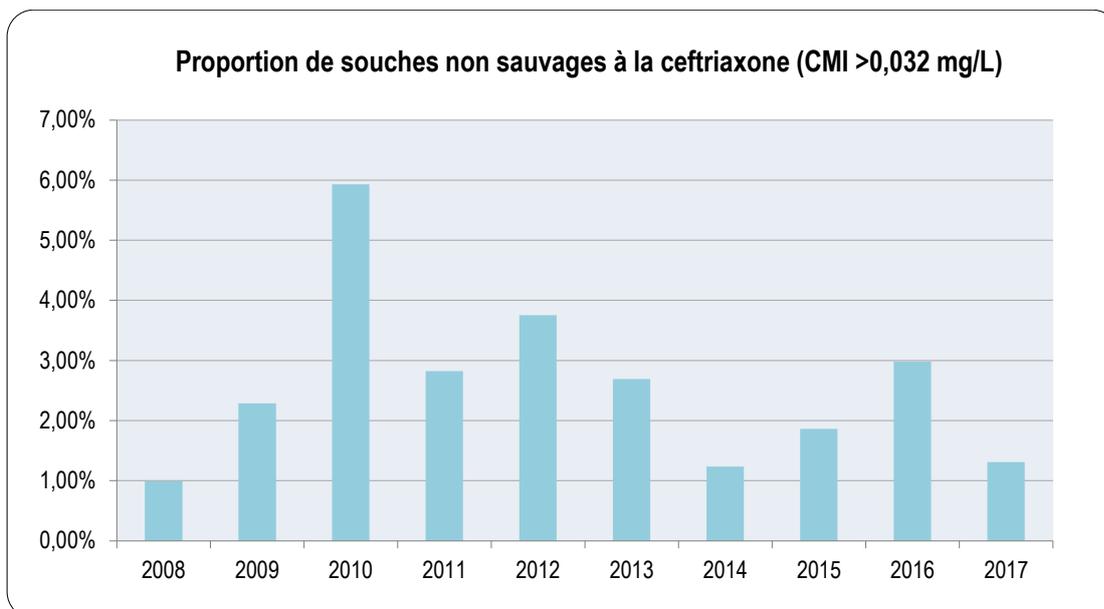


Figure. Evolution de la proportion de souches non sauvages à la ceftriaxone (CMI >0,032 mg/L) 2008-2017.

- Evolution de la sensibilité à l'azithromycine

L'évolution de la sensibilité du gonocoque à l'azithromycine est suivie depuis 2013. Entre 2013 et 2015, nous avons constaté une augmentation de la proportion de souches non sensibles (I + R) à cette molécule. La proportion de souches intermédiaires ($0,25 < \text{CMI} \leq 0,5 \text{ mg/l}$) a continué à augmenter pour atteindre 27,7% en 2015 vs 11,3% en 2013. Les souches résistantes (CMI > 0.5 mg/L) représentaient 6,2% des souches, contre 1,2% en 2013. Depuis, la proportion de souches intermédiaires reste élevée mais a tendance à diminuer (22,48% en 2017) et le pourcentage de souches résistantes, stable en 2016, décroît légèrement (5,5% en 2017) (cf figure ci-dessous). Cet antibiotique est à surveiller car il constitue la première ligne de traitement en association avec la ceftriaxone.

Des résistances à haut niveau sont exceptionnelles en France (2 souches répertoriées en 2014). En 2017, aucune souche présentant un haut niveau de résistance n'a été signalée et il n'y a eu aucune épidémie impliquant ce type de souches.

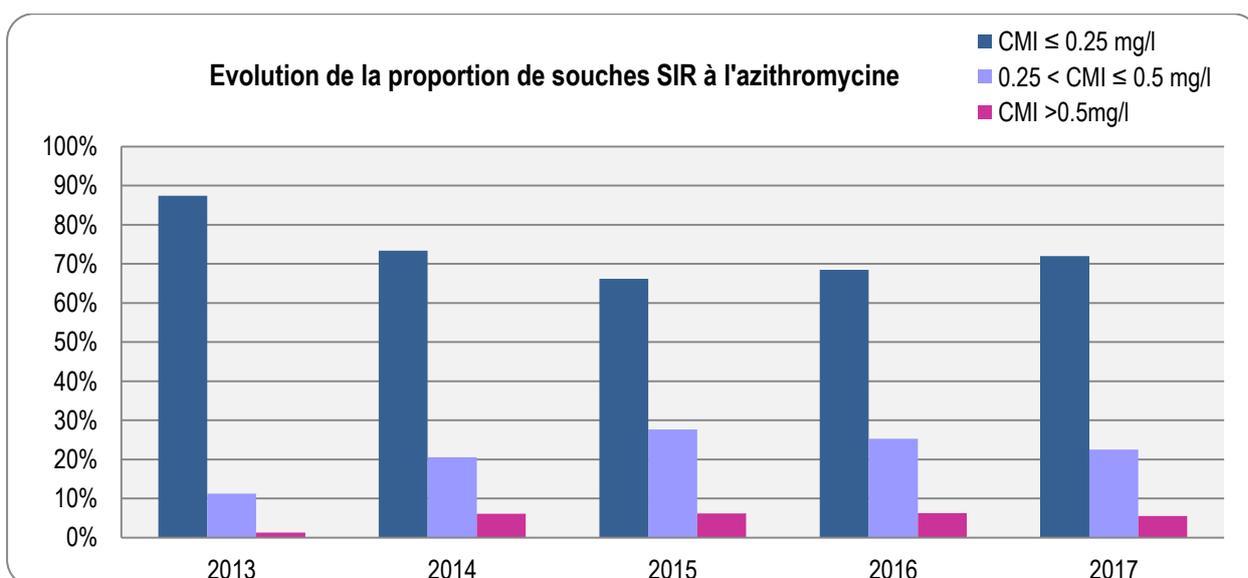


Figure : Evolution de la proportion de souches sensibles (CMI ≤ 0,25 mg/l), intermédiaires ($0,25 < \text{CMI} \leq 0,5 \text{ mg/l}$) et résistantes (CMI > 0,5 mg/l) à l'azithromycine 2013-2017.

Il est important de souligner que des variations inter-fournisseurs ont été observées selon les fournisseurs de bandelettes E-tests. Entre le 21 septembre 2017 et 10 octobre 2017, nous avons comparé les bandelettes i2a et bioMérieux à partir d'un même inoculum, même lot et même opérateur (cf. tableau ci-dessous). Les variations sont,

pour la grande majorité des cas, non significatives. Cependant, elles peuvent modifier la catégorisation de la souche lorsque la valeur de la CMI est proche du break point. Cela n'a aucun impact sur la détection du haut niveau de résistance.

N° de dossier	N° Renago	Valeur de la CMI azithromycine Bandelette i2a	Valeur de la CMI azithromycine Bandelette Biomérieux	Nombre de dilutions d'écart	Changement de catégorisation
101740.0457	75IFOUR GON-27108	2	2		N
101741.0092	94BEGIN GON-26983	1 (R)	0,5 (I)	1	O
101739.1202	84ALLEN GON-27012	1	1		N
101739.0056	93VERGA GON-1373	0,5 (I)	0,25 (S)	1	O
101740.1776	75IFOUR GON-27203	0,5 (I)	0,25 (S)	1	O
101739.0984	75IFOUR GON-27021	0,5 (I)	0,25 (S)	1	O
101741.0181	75IFOUR GON-27228	0,5 (I)	0,25 (S)	1	O
101739.0308	75IFOUR GON-269898	0,5	0,5		N
ATCC499226	Lot 648721 05/10/17	0,5	0,5		N
101741.0184	75IFOUR GON-27230	0,25	0,064	2	N
101738.1128	67SCHUH GON-26888	0,25	0,125	1	N
101738.1124	GONO1 93VERGA	0,25	0,125	1	N
101739.1446	75IFOUR GON-27054	0,25	0,125	1	N
101739.1684	17ROCHE GON-27029	0,25	0,125	1	N
101740.1888	75IFOUR GON-27213	0,25	0,125	1	N
101739.1452	75IFOUR GON 27056	0,25	0,125	1	N
101740.1248	75IFOUR GON-27125	0,25	0,125	1	N
101739.1014	75IFOUR GON-27031	0,25	0,125	1	N
101740.1778	75IFOUR GON-27207	0,25	0,125	1	N
101740.1250	75IFOUR GON-27126	0,25	0,25		N
101739.1447	75IFOUR GON-27055	0,25	0,25		N
101741.0183	75IFOUR GON-27229	0,25	0,25		N
101738.1451	75IFOUR GON-26982	0,25	0,25		N
101739.0311	75IFOUR GON-2700	0,25	0,25		N
101739.0456	85ALLAI GON-26985	0,125	0,064	1	N
101739.0798	51GILLA GON-26989	0,125	0,064	1	N
101740.1777	75IFOUR GON-27206	0,125	0,064	1	N
101740.0463	75IFOUR GON-27110	0,125	0,064	1	N
101740.0459	25COURT GON-27076	0,125	0,064	1	N
101740.0092	25COURT GON-27060	0,125	0,064	1	N
101740.0845	25COURT GON-27083	0,125	0,064	1	N
101739.1012	75IFOUR GON-27025	0,125	0,064	1	N
101739.0801	24AMOUR GON-26986	0,125	0,064	1	N
101740.1251	75IFOUR GON-27127	0,125	0,064	1	N
101740.1653	85ALLAI GON-27119	0,125	0,064	1	N
101738.1656	GON-26964	0,125	0,125		N
101740.0846	S1GILLA GON-27049	0,125	0,125		N
101740.0462	75IFOUR GON-27109	0,064	0,016	2	N
101739.1600	93VERGA GON270M	0,064	0,032	1	N
101740.1655	85ALLAI GON-27118	0,064	0,032	1	N

Tableau. Evaluation des bandelettes E test i2A et bioMérieux.

3.3.2.2. Nouvelle souche résistante à la ceftriaxone en France - Novembre 2017

Aucune souche de *N. gonorrhoeae* avec un haut niveau de résistance à la ceftriaxone n'avait été isolé en France depuis 2010 (souche F89). En novembre 2017, une patiente de 23 ans vient en consultation au CeGGID de l'hôpital St Louis pour un écoulement vaginal. Elle est hétérosexuelle et rapporte des rapports sexuels non protégés avec un partenaire présentant un écoulement urétral. Lors de sa prise en charge, des prélèvements vaginaux et pharyngés sont réalisés et la patiente reçoit un traitement empirique associant une dose unique de ceftriaxone 250 mg (IM) avec un traitement par doxycycline 100 mg, deux comprimés par jour pendant 7 jours. La présence de gonocoque au niveau génital et dans le pharynx est confirmée par PCR et culture. Les profils de résistance des isolats pharyngés et génitaux sont identiques et répertoriés dans le tableau ci-dessous.

La patiente revient 28 jours plus tard au CeGGID pour un contrôle de guérison. N'étant plus symptomatique, aucun traitement n'est donné. Les PCR et cultures des écouvillons génitaux reviennent négatives pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, tandis que l'on observe une persistance du portage pharyngé (PCR et culture positives pour *N. gonorrhoeae*) par une souche au profil de résistance inchangé. En l'absence de rapports sexuels entre la première et la seconde visite, une réinfection est exclue.

La caractérisation moléculaire de la souche nommée F90 par séquençage haut débit permet de la typer MLST1903, NG-MAST3435 et NG-STAR233 et déterminer la présence du gène mosaïque *penA60.001* (cf tableau ci-dessous). Ce profil est similaire aux isolats FC428 et FC460 observés au Japon en 2015 (Nakayama et al. 2016). Cette observation s'inscrit dans le contexte de diffusion de ce clone avec des descriptions en 2017 au Canada, au Danemark et Australie (MLST1903, NG-STAR233) (Lahra et al. 2018).

Tableau : Caractérisation phénotypique et moléculaire de la souche F90 résistante à haut niveau à la ceftriaxone.

Antibiotiques	CMI en mg/l (catégorisation)	Genes	Mutations
Penicilline G	2 (R)	<i>penA</i>	<i>penA60.001</i> (A311V, T483S)
Ampicilline	2 (I)	<i>ponA</i>	L421P
Céfixime	1 (R)	<i>porB1b</i>	G120K, A121D
Ceftriaxone	0,5 (R)	<i>pilQ</i>	Absence de mutation
Cefotaxime	2 (R)	promoteur de <i>mtrR</i>	A délétion
Ertapenem	0.004 (S)	ARNr 23S	Absence de mutation
Ciprofloxacine	> 32 (R)	<i>tetM</i>	Absence de mutation
Azithromycine	0,5 (I)	<i>rpsJ</i>	V57M
Gentamicine	8	<i>parC</i>	S87R
Spectinomycine	8 (S)	<i>gyrA</i>	S91F, D95A
Tétracycline	4 (R)		
Genotypes : NG-MAST ST3435	MLST ST1903	NG-STAR 233	

3.3.2.3. Surveillance des gonococcies résistantes aux cyclines dans le cadre de l'étude ancillaire Ipergay

Dans le cadre de l'essai ANRS IPERGAY, coordonné par Jean-Michel Molina (APH Saint-Louis), qui a démontré l'efficacité de la PrEP en France, le CNR IST bactériennes a participé à l'étude ancillaire qui a évalué l'impact d'une prophylaxie post exposition (PEP) par doxycycline lors de rapports sexuels sur l'acquisition d'une IST bactérienne (infection à gonocoque, à *C. trachomatis*, à *M. genitalium* et à *T. pallidum*) chez les HSH. L'usage de la PEP par doxycycline a entraîné une diminution de 47% du risque d'acquérir une nouvelle IST (chlamydia, gonocoque ou syphilis), de 70% du risque d'acquérir une nouvelle infection à *C. trachomatis* et de 73% du risque d'acquérir une nouvelle syphilis chez les patients traités. Les résultats de cette étude ont été publiés dans le Lancet infectious Diseases en mars 2018.

L'objectif de cette étude a été (i) de calculer la prévalence de la résistance à la tétracycline des gonocoques circulants dans cette population, (ii) de caractériser le support génétique de cette résistance à partir des souches de gonocoques isolées ou à partir des prélèvements retrouvés positifs en PCR dans cette cohorte et d'établir la clonalité des isolats.

Le laboratoire de St Louis a réceptionné 70 écouvillonnages prélevés entre le 06/08/2015 et le 16/06/2016. Ces écouvillonnages provenaient de 43 participants (1 à 4 écouvillons /participant) issus de la population de l'étude ancillaire de l'essai IPERGAY. Parmi les sites d'origines, il y avait 32 écouvillonnages rectaux, 36 oraux et 2 urines. Le CNR a également reçu 8 souches de gonocoques isolées en culture issues de la même population.

- Investigation des 8 souches ; caractérisation des déterminants de résistance aux cyclines et génotypage

Les 8 souches isolées étaient sensibles aux C3G, à l'azithromycine, à la spectinomycine ; la moitié d'entre elles étaient résistantes aux quinolones. Il n'a pas de catégorisation pour la doxycycline mais 87,5% d'entre elles étaient intermédiaires ou résistantes à la tétracycline dont une à haut niveau de résistance.

La résistance de haut niveau à la tétracycline était expliquée par l'acquisition du déterminant *tet(M)*.

La résistance de bas niveau à la tétracycline était expliquée par :

- (i) l'acquisition d'une mutation dans la protéine ribosomale S10 (Val57Met) (87,5% des souches),
- (ii) des modifications dans la pompe d'efflux MtrCDE (A délétion du promoteur du gène *mtrR* (37,5%) et/ou mutations dans la protéine MtrR (75%).

Sept génogroupes sont déterminés dont deux souches avec le génogroupe G5793. Le génotype multirésistant G1407 n'est y pas représenté.

Tableau. Caractérisation phénotypique et moléculaire des 8 souches isolées de *N. gonorrhoeae* issues de l'étude. *, productrice de bêta-lactamase; WT, sauvage.

Nom de la souche	S2	S4	S15	S19	S21	S23	S41	S73
	FR063102	FR063154	FR076016	F078018	FR049047	FR098004	FR063048	FR049014
	OMDA	REYN	ZOAW	ERKY	URNY	ZEAL	ZUYR	APCU
Concentrations minimales inhibitrices (mg/l)								
Benzylpénicilline	0.125 (I)	1 * (R)	2 * (R)	0.125 (I)	0.125 (I)	0.5 (I)	1 (I)	>32 * (R)
Céfixime	<0.016 (S)	0.032 (S)	0.032 (S)	<0.016 (S)				
Ceftriaxone	<0.016 (S)	0.016 (S)	0.032 (S)	<0.016 (S)				
Tétracycline	64 (R)	1 (I)	1 (I)	2 (R)	0.5 (S)	4 (R)	4 (R)	1 (I)
Minocycline	64	1	1	1	0.5	4	2	1
Doxycycline	24	1	1	1	0.5	4	4	1
Ciprofloxacine	8.0 (R)	0.004 (S)	0.004 (S)	0.002 (S)	0.004(S)	16 (R)	16 (R)	2 (R)
Azithromycine	0.25 (S)	0.125 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)	0.125 (S)	0.125 (S)
Gentamicine	4	4	4	4	4	4	4	4
Spectinomycine	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	4 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)
Génotype								
promoteur <i>mtrR</i>	A deletion	WT	WT	WT	A deletion	WT	A deletion	WT
protéine MtrR	G45D	A39T	A39T	A39T/R44H	WT	A39T/R44H	G45D	WT
gène <i>tetM</i>	Present	-	-	-	-	-	-	-
protéine S10	V57M	V57M	V57M	V57M	WT	V57M	V57M	V57M
allèle <i>porB</i>	6024	55	55	2656	30	5029	55	90
allèle <i>tbpB</i>	33	39	39	1579	18	563	4	2305
NG-MAST	10421	5793	5793	8709	5441	8503	69	13467

- Investigation des 70 échantillons cliniques : caractérisation des déterminants de résistance aux cyclines

Afin d'effectuer une recherche moléculaire de la résistance à la tétracycline sur les 70 prélèvements cliniques de l'étude IPERGAY, nous avons établi un algorithme décisionnel en se basant sur les données de CNR établies en 2016 (Master K. Djelloul, 2016) et les données de la littérature. Cet algorithme est proposé ci-dessous. Cet algorithme permet une prédiction moléculaire de la résistance à la tétracycline.

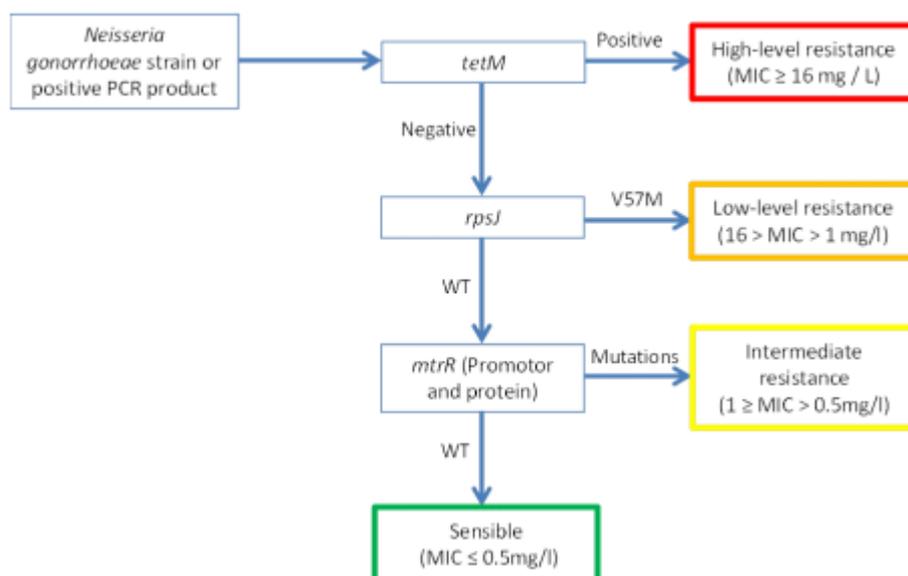


Figure. Algorithme décisionnel utilisé pour caractériser la résistance à la tétracycline d'un échantillon clinique positif à *N. gonorrhoeae*.

Les 70 échantillons cliniques investigués étaient composés de 32 écouvillons rectaux, 36 écouvillons oraux et 2 urines. Etant donné la prévalence du gène *tet(M)* dans les microbiotes et les réactions croisées possibles avec les *Neisseria* commensales, des amorces spécifiques d'espèces ont été caractérisées pour cette étude. Les régions d'intérêt des gènes responsables de la résistance de *N. gonorrhoeae* à la doxycycline (*tet(M)*, *rpsJ*, *mtrR* et son promoteur) ont été amplifiés par PCR.

Résistance de haut niveau aux cyclines : le gène *tet(M)* a été retrouvé dans 18,6% des prélèvements.

Résistance de bas niveau aux cyclines :

- la mutation V57M de la protéine ribosomale S10 a été retrouvée chez 81,2% des prélèvements.
- Le promoteur de *mtrR* a pu être étudié pour 40/70 des prélèvements et la mutation Del55 a été retrouvée dans 30%.
- Le gène a pu être amplifié pour 38/70 des échantillons et les mutations A39T, R44H et G45D de la protéine ont été retrouvées pour 78,9% d'entre eux.

Ces résultats nous ont permis de caractériser la résistance aux cyclines suivant notre algorithme (cf tableau ci-dessous).

Tableau : Synthèse des mutations impliquées dans la résistance à la doxycycline retrouvées dans les 70 prélèvements (ND : Non Déterminé)

<i>tet(M)</i>	Mutation du gène <i>rpsJ</i> (protéine S10)	Mutations de <i>mtr</i>		Prédiction moléculaire de la résistance à la tétracycline
		Promoteur	Protéine	
Présent (n=13)	V57M ou double population (n=11)	A délétion (n=3)	G45D (n=2) WT (n=1)	Résistance de haut niveau (n=13) 18,6%
		WT (n=4)	A39T (n=4)	
		ND (n=4)	ND (n=4)	
	WT (n=1)	WT (n=1) A39T (n=1)		
	ND (n=1)	ND (n=1) ND (n=1)		
Absent (n=57)	V57M ou double population (n=45)	A délétion (n=3)	G45D (n=3)	Résistance de bas niveau (n= 45) 64,3%
		WT (n=21)	A39T (n=9)	
			A39T/R44H (n=7)	
			G45D (n=1)	
			R44H (n=1)	
			WT (n=1)	
ND (n=2)	ND (n=2)			
ND (n=21)	ND (n=21)			

WT (n=12)	A délétion (n=6)	WT (n=6)	Sensibilité probable (n=12) 17,1%
	WT (n=2)	A39T (n=1)	
		A39T/R44H (n=1)	
ND (n=4)	ND (n=4)		

- Investigation des 70 échantillons cliniques : génotypage

Afin d'établir la clonalité de *N. gonorrhoeae* dans ces échantillons, une PCR nichée a été mise au point. ; elle a permis de typer 28 des 70 échantillons, montrant ainsi la présence de clones principaux ST5441, ST5624, ST5793 et ST10529. Le génotype multirésistant G1407 n'était pas présent dans ces échantillons.

3.3.3 Laboratoire APHP Cochin : détection de la résistance de *T. pallidum* à l'azithromycine

3.3.3.1 Définition de l'échantillon de souches testées

Les souches de *T. pallidum* testées pour leur résistance à l'azithromycine sont toutes celles qui auront été envoyées au laboratoire associé syphilis et qui auront été détectées positives par le test de diagnostic de nPCR *tp47*.

3.3.3.2 Définition utilisée pour exprimer la résistance

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 ARNr 23S.

3.3.3.3 Distribution des résultats

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. A ce jour, aucun cas de résistance clinique à un antibiotique a été rapporté au CNR.

Nous avons testé un total de 170 échantillons provenant d'écouvillon de patients avec syphilis et testés positifs pour *tp47* par nPCR. Nous montrons que **82% des échantillons testés possèdent la mutation A2058G** (numérotation *E. coli*) au niveau de l'ARNr 23S associé à la résistance clinique à l'azithromycine (figure ci-dessous).

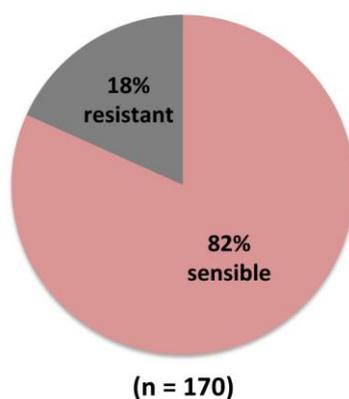


Figure. Proportion de souches résistantes à l'azithromycine en France.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNR IST bactériennes a échangé avec Santé Publique France (Florence Lot, Ndeindo Ndeikoundam, Delphine Viriot, Nelly Fournet) lors de plusieurs réunions présentielles ou téléphoniques au cours de 2017 sur la pertinence des réseaux à développer et le développement d'une meilleure coordination des enquêtes entre les différents réseaux.

Ainsi, un réseau de CHU, CH et laboratoires privés a été constitué lors de l'enquête de prévalence des infections urogénitales à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et de la résistance de *M. genitalium* aux antibiotiques (cf paragraphe 3.5) à partir des fichiers de laboratoires participant aux réseaux Renachla, LGV et Renago. Ces enquêtes seront renouvelées tous les ans.

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.

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 :

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

Dans ce cadre, des souches de *C. trachomatis* de génovar L isolées ces 5 dernières années de patients présentant une anorectite et provenant de différents pays d'Europe (Suisse, France, Suède, Pays-Bas, Espagne, Croatie, Slovénie) et d'Australie, ont été centralisées par Helena Smith et son équipe en Suisse. Une PCR en temps réel L2b ainsi que le séquençage du gène *ompA* ont été réalisées. Les résultats confirment les nôtres au niveau national (O. Peuchant, et al, Emerg Infect Dis 2016), à savoir que sur 292 souches testées, 153 (52,5%) sont de type L2, 82 (28%) sont de type L2b et 57 (19,5%) sont des variants L2b. L'analyse de souches recombinantes a mis en exergue les limites de l'identité des souches par séquençage du gène *omp1* et une uniformisation de la dénomination des variants a été proposée dans une lettre à Eurosurveillance cosignée par l'ensemble des participants à ce projet :

HM Seth-Smith, JC Galán, D Goldenberger, DA Lewis, O Peuchant, C Bébéar, B de Barbeyrac, A Bénard, I Carter, J Kok, SM Bruisten, B Versteeg, SA Morré, NR Thomson, A Egli, HJ de Vries. 2017. Concern regarding the alleged spread of hypervirulent Lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* strain in Europe. Euro Surveill. 13;22(15). Le séquençage du génome a été réalisé pour 96 des 292 souches testées ayant une amplification positive en PCR en temps réel L2b. Parmi ces 96 souches, 23 sont issues de notre collection. Les résultats sont en cours d'analyse.

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.

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

- avec les laboratoires CERBA et Biomnis,
- avec l'ensemble des laboratoires parisiens et de province qui participent au réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis*,
- 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 et IAF

Le laboratoire associé collabore avec :

- Ndeindo Ndeikoundam, Delphine Viriot et Florence Lot de Santé Publique France
- Jean Michel Molina, étude ANRS dans le cadre de la surveillance du HIV
- plusieurs spécialistes européens de *N. gonorrhoeae* internationalement reconnus avec lesquels les liens doivent être renforcés dans le cadre de la surveillance pour l'ECDC European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Suède.
- Magnus Unemo PhD Assoc. Professor
- Catherine Ison & Michele Cole, Angleterre, Public Health England, London, United Kingdom
- Gianfranco Spiteri, ECDC
- Réseau RésIST, réseau de cliniciens exerçant dans différents lieux de prise en charge des IST (CIDDIST, consultations hospitalières ou libérales) qui assure le suivi de la Syphilis, de la LGV et de la gonococcie depuis 2004.

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 Laboratoire CHU de Bordeaux

Enquête de surveillance des génotypes d'infections urogénitales à *C. trachomatis* et de la prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*, semaine 46 (13 au 19 novembre 2017).

Objectifs :

- **Typage des souches de *C. trachomatis*** responsables d'infection urogénitales pour étudier les génotypes des souches circulantes en Métropole et DROM.
- Détermination de la **résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones** pour évaluer la prévalence nationale de cette résistance.

Matériels et méthodes :

Dans les centres participants, pendant la semaine du 13 au 19 novembre 2017, tous les échantillons uro-génitaux (urine, vagin, col) positifs à *C. trachomatis* et 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 (sauf les DROM). 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.

Trente-trois laboratoires de CHU, 16 de CH, 14 laboratoires privés et 2 CeGIDD ont participé à l'étude. Soixante-quatre laboratoires métropolitains et des DROM ont envoyé des échantillons positifs à *C. trachomatis* et 21 laboratoires ont envoyé des échantillons positifs à *M. genitalium*. Un total de **1014 et 79 échantillons** ont été collectés respectivement pour le typage des souches de *Chlamydia* et la prévalence de la résistance chez *M. genitalium* (Voir carte ci-dessous).

C. trachomatis (1014 échantillons) / M. genitalium (79 échantillons)

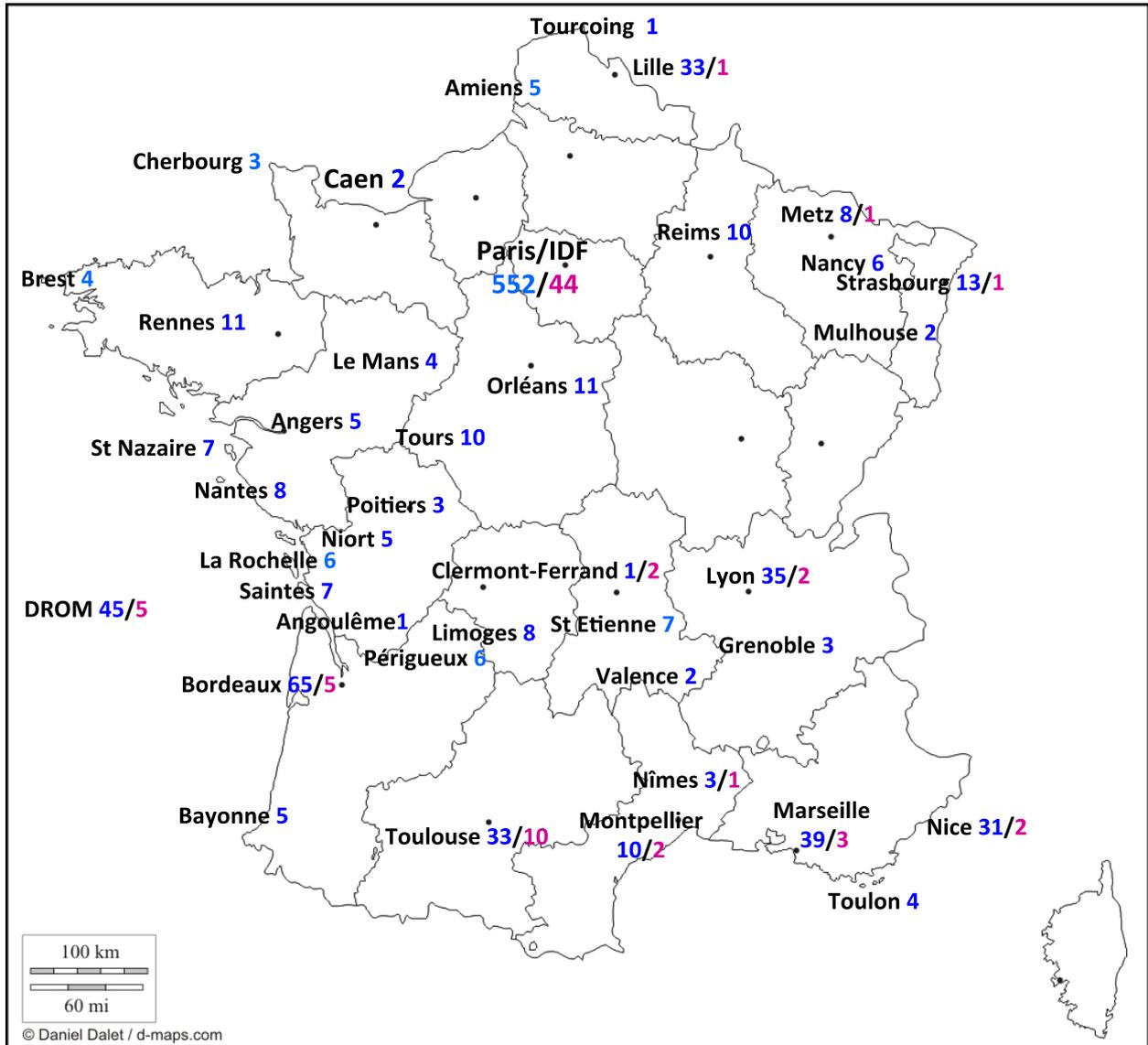
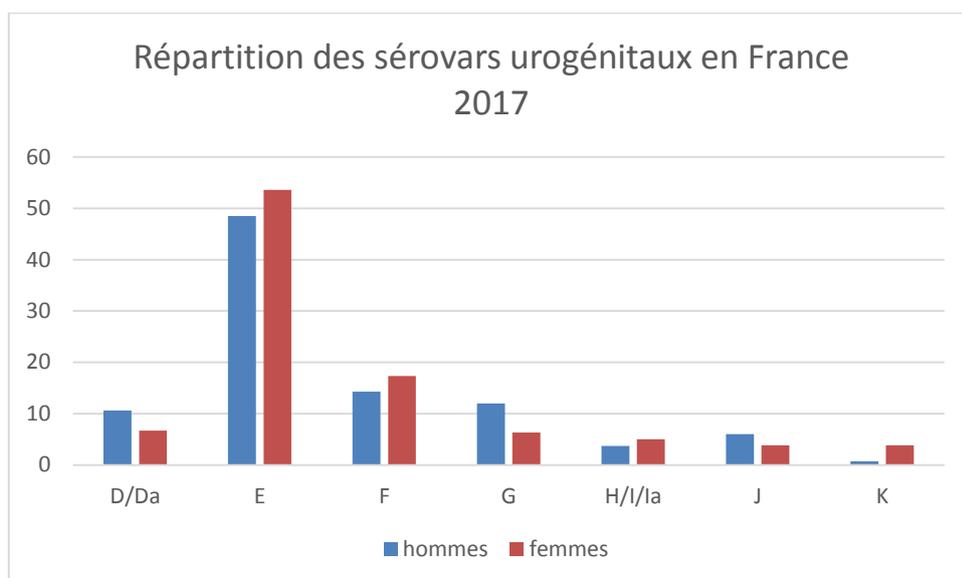


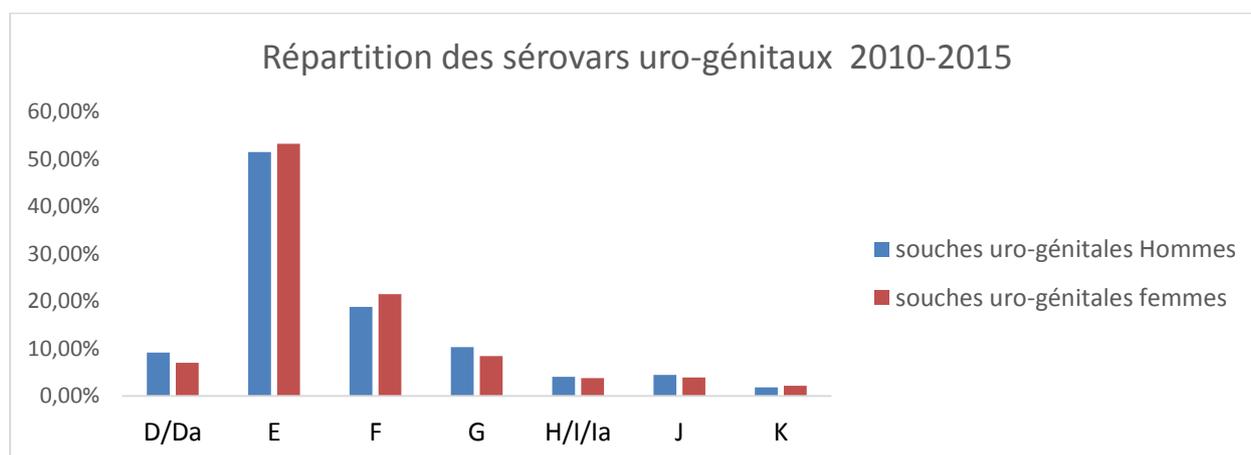
Figure. Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par centre

Infections urogénitales à C. trachomatis

L'étude concernant la répartition des génovars de souches urogénitales récoltées en France est en cours. Les résultats préliminaires sur environ la moitié des échantillons montre que **le génovar E est majoritaire**, autour des 50%, suivi des génovars F, G et D/Da, aussi bien chez les hommes que chez les femmes (figure ci-dessous).



Cette répartition est en tout point comparable à celle observée parmi les souches urogénitales typées au sein du CNR Chlamydia ces dernières années dont la provenance était majoritairement en région bordelaise (figure ci-dessous).



Résistance aux macrolides et fluoroquinolones chez *M. genitalium*

- Population étudiée

Au total, **79 échantillons provenant de 73 patients (42,7% femmes et 56,1% d'hommes)** ont été collectés. Parmi les échantillons féminins, 83,9% (26/31) étaient des écouvillons cervico-vaginaux et 16,1% (5/31) des premiers jets d'urine. Les échantillons masculins comprenaient 61% (25/41) d'urine de premier jet, 32% (13/41) de prélèvements rectaux et 7% d'autres types de prélèvements. L'âge moyen des patients était de 32 ans et l'âge médian était de 30 ans, les 25-34 ans représentant 46,6% (34/73) des patients. Les services prescripteurs étaient composés à près de 50% de CeGIDD et de services de maladies infectieuses.

Un total de 42,4% (31/73) des patients déclarait avoir des pratiques hétérosexuelles, 19,2% (14/73) des patients étaient des HSH et 38,4% (28/73) des patients avaient des pratiques inconnues. Enfin, 13,7% (10/73) des patients étaient positifs à *C. trachomatis* et 17,8% (13/73) d'entre eux était séropositifs au VIH.

- Prévalence de la résistance aux macrolides

Les échantillons positifs à *M. genitalium* ont été soumis à une 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 16,4 % (12/73) des patients. Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, 57,4% (35/61) étaient

sensibles aux macrolides tandis que **42,6% (26/61) d'entre eux étaient résistants aux macrolides** (tableau ci-dessous). La culture de *M. genitalium* n'étant pas réalisable à partir d'échantillons, aucune CMI n'a pu être déterminée.

Parmi les 28 échantillons issus des 26 patients présentant une mutation associée à la résistance, **la mutation A2059G** (numérotation *Escherichia coli*) **était la plus fréquente dans 57,1% (16/28) des cas**, suivi de la substitution A2058G dans 21,4% (6/28) des cas, et de la mutation A2058T dans 7,1% (2/28) des cas. Les mutations A2058C et A2059C représentent respectivement 3,6% (1/28) des cas. Dans 7,1% (2/28) des cas, la position exacte de la mutation n'a pas pu être déterminée. Pour un patient de l'hôpital Cochin, deux mutations différentes ont été détectées dans 2 sites de prélèvement, la mutation A2058T dans l'urine et la mutation A2059G dans l'écouvillonnage rectal.

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

Centre	Type de centre	Nb de prélèvements	Nb de patients	Nb (%) de patients avec résistance aux macrolides*	Nb (%) de patients avec sensibilité aux macrolides*	Nb (%) de patients avec ARNr23S non amplifié	Nb (%) de patients avec résistance aux fluoroquinolones*
ANTOINE BECLERE	CHU APHP	4	4	2 (50%)	2	0	1
BARLA NICE	Privé	2	2	1 (50%)	1	0	0
BIO 67 STRASBOURG	Privé	1	1	0 (0%)	1	0	0
CERBALLIANCE	Privé	10	9	6 (85%)	1	2	1
CHR METZ THIONVILLE	CH	1	1	0 (0%)	1	0	0
CHU BORDEAUX	CHU	5	5	3 (75%)	1	1	0
CHU CLERMONT FERRAND	CHU	2	2	2 (100%)	0	0	0
CHU LILLE	CHU	1	1	1 (100%)	0	0	0
CHU LYON	CHU	2	2	1 (50%)	1	0	0
CHU MONTPELLIER	CHU	2	2	0 (0%)	0	2	0
CHU NIMES	CHU	1		0 (0%)	1	0	0
CHU TOULOUSE	CHU	8	7	2 (33%)	4	1	0
COCHIN	CHU APHP	13	11	2 (25%)	6	3	3
FELIX GUYON, LA REUNION	CHU	1	1	1 (100%)	0	0	0
IAF PARIS	Privé	1	1	1 (100%)	0	0	0
IHU MARSEILLE	CH	1	1	0 (0%)	1	0	0
LDA 13, MARSEILLE	CeGIDD	2	2	1 (50%)	1	0	0
LOUIS MOURIER	CHU APHP	9	8	1 (12%)	7	0	0
PAPEETE	CH	2	2	0 (0%)	2	0	0
PASTEUR TOULOUSE	Privé	2	2	0 (0%)	2	0	0
SAINT-ANTOINE	CHU APHP	7	6	2 (66%)	1	3	0
SUD REUNION	CHU	2	2	0 (0%)	2	0	0
22		79	73	26 (42,6%*)	35 (57,4%*)	12 (16,4%)	5 (7,5%*)

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

La résistance aux macrolides a été étudiée en fonction du statut VIH et des pratiques sexuelles des patients (tableau ci-dessous). Bien que la résistance aux macrolides paraisse plus importante chez les HSH que chez les sujets

hétérosexuels (58,3% versus 28%) et chez les sujets VIH+ que chez les sujets VIH- (72,7% versus 44,8%), les différences ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$, test du Chi2). Une augmentation de la population étudiée pourrait permettre d'atteindre la significativité statistique.

Tableau. Prévalence de la résistance aux macrolides en fonction du statut VIH et des pratiques sexuelles.

% de patients avec résistance aux macrolides*		Statut VIH			
		VIH +	VIH -	INCONNU	
Pratiques sexuelles	HSH	66,6 % (4/6)	40% (2/5)	100% (1/1)	58,3% (7/12)
	HETERO	66,6% (2/3)	30,8% (4/13)	11,1% (1/9)	28% (7/25)
	INCONNU	100% (2/2)	63,6% (7/11)	27,3% (3/11)	50% (12/24)
		72,7% (8/11)	44,8% (13/29)	23,8% (5/21)	42,6% (26/61)

* Le % de résistance a été calculé à partir des patients pour lesquels une amplification de l'ARNr 23S a été obtenue.

- Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

Les échantillons positifs à *M. genitalium* ont été soumis à une PCR en point final ciblant le gène *parC* suivi d'un séquençage pour rechercher les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones. Aucune amplification du gène *parC* n'a pu être obtenue chez 8,2 % (6/73) des patients.

Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, 92,5% (62/67) étaient sensibles aux fluoroquinolones tandis que **7,5% (5/67) d'entre eux étaient résistants aux fluoroquinolones** (tableau ci-dessus). Parmi ces cinq patients, quatre présentaient une résistance aux macrolides et une amplification pour la recherche de résistance aux macrolides n'a pas pu être obtenue pour le cinquième. **La proportion de double résistance**, calculée pour les 56 patients pour lesquels une amplification a été obtenue pour la recherche de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones, **s'élevait donc à 7,1% (4/56)**.

Parmi les patients présentant une résistance, cinq mutations différentes ont été retrouvées : Asp87(84)~>Asn, Ser83(80)~>Cys, Aps87(84)~>Tyr, Ser83(80)~>Ile et Met92(89)~>Thr (Numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèse). Chez le patient de l'Hôpital Cochin présentant deux mutations associées à la résistance aux macrolides différentes dans l'urine et l'écouvillon rectal, deux profils de résistance aux fluoroquinolones distincts ont aussi été retrouvés avec une souche mutée Ser83(80)~>Ile dans l'urine et une souche non mutée au niveau rectal. Ceci suggère que ce patient est infecté par deux souches distinctes dans les deux sites anatomiques.

- Prévalence des résistances en fonction des traitements antérieurs par macrolides

La prévalence de la résistance a été étudiée en fonction d'éventuels traitements antérieurs par les macrolides. L'information a pu être recueillie chez 46,6% (34/73) des patients (tableau ci-dessous).

Tableau. Prévalence de la résistance en fonction de traitement antérieur par les macrolides.

Traitement antérieur par macrolides	% de patients	Résistance aux macrolides			Résistance aux fluoroquinolones		
		Résistant*	Sensible*	NA	Résistant*	Sensible*	NA
Inconnu	53,4% (39/73)	50% (16/32)	50% (16/32)	17,9% (7/39)	5,4% (2/37)	94,6% (35/37)	5,1% (2/39)
Non	41,1% (30/73)	28% (7/25)	72% (18/25)	16,7% (5/30)	7,7% (2/26)	92,3% (24/26)	13,3% (4/30)
Oui	5,5% (4/73)	75% (3/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	25% (1/4)	75% (3/4)	0% (0/4)

*Les % de patients infectés par une souche résistante ou sensible ont été calculés à partir des patients pour lesquels une amplification a pu être obtenue. NA, absence d'amplification.

Parmi les patients préalablement traités par les macrolides, 75% (3/4) étaient infectés par une souche résistante aux macrolides tandis que parmi les patients n'ayant pas reçu de traitement préalable par les macrolides, seulement 28% des patients étaient infectés par une souche résistante ($p=0,1$, test de Fisher). Cette différence n'était pas significative mais les effectifs réduits limitent la puissance statistique. La différence de prévalence de résistance aux fluoroquinolones entre les patients préalablement traités ou non par les macrolides (25% versus 7,7%) n'était pas non plus significative ($p=0,4$, test de Fisher).

En résumé, cette prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* est très élevée et inquiétante. Ce sont les 1^{ers} chiffres de prévalence nationaux, qui demanderont à être confirmés l'an prochain sur un effectif plus grand. La résistance aux fluoroquinolones, moins élevée, paraît plus stable puisque nous décrivons une prévalence à Bordeaux de 6% en 2013-2014 (Le Roy Emerg Infect Dis 2016), 13,2% en 2015 et de 6,3% en 2016. Elle est cependant préoccupante, la moxifloxacin étant pratiquement la seule alternative en cas d'échec des macrolides.

3.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

3.5.2.1 Enquête de surveillance nationale des infections à *N. gonorrhoeae* en France du 4 au 8 décembre 2017 (semaine 49)

Objectifs :

Typage des souches de *N. gonorrhoeae* et des échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* par amplification d'acides nucléiques responsables d'infection urogénitales ; étude des clones circulants en Métropole et DROM.

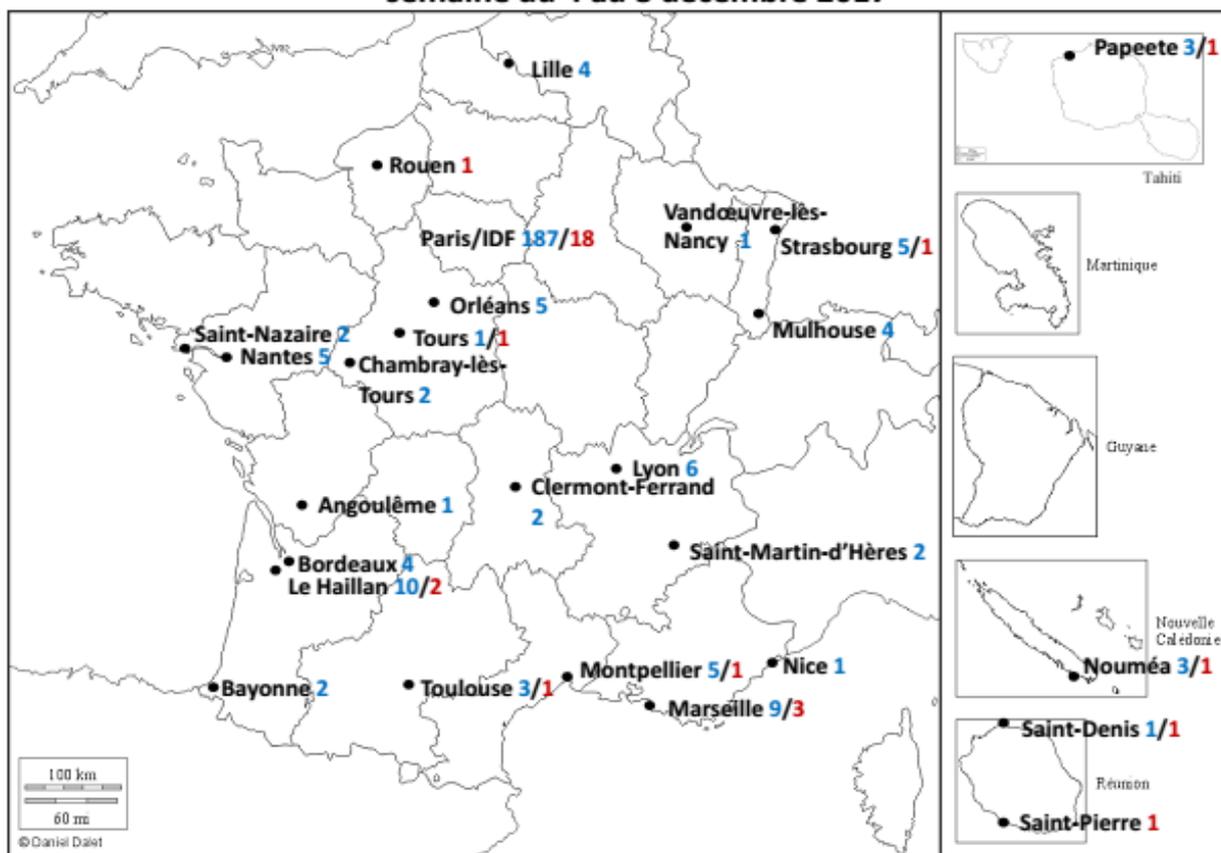
Matériels et méthodes :

Cent vingt-trois laboratoires ont été invités à participer à l'étude. Il était demandé aux centres participants de collecter pendant la semaine du 4 au 8 décembre 2017 tous les échantillons (urine, urètre, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge) positifs à *N. gonorrhoeae* par amplification d'acides nucléiques et/ou les souches si elles avaient été obtenues en culture, puis de les faire parvenir au CNR à +4°C en milieu liquide (Eswab, Copan). Les données concernant les échantillons devaient être colligées de façon anonyme sur un fichier Excel comportant le nombre total d'échantillons testés en PCR pendant la semaine de l'étude, le sexe, la date de naissance, la nature de l'échantillon, le service demandeur, la notion de dépistage et de symptômes, le traitement antérieur et les techniques utilisées par la recherche du *N. gonorrhoeae* par PCR ou les antibiogrammes.

Répartition des laboratoires :

Quarante laboratoires de CHU, 16 CH, 13 laboratoires privés et 3 CeGIDD ont participé à l'étude et 58 laboratoires métropolitains et des DROM ont envoyé des échantillons positifs à *N. gonorrhoeae*. Au total, pendant la semaine du 4 au 8 décembre 2017, ces 58 laboratoires ont reçu 3143 échantillons cliniques pour la recherche *N. gonorrhoeae* en PCR (nombre variant de 0 à 681 échantillons par laboratoire). **Le taux de positivité des échantillons cliniques en PCR s'établit à 9,1%**. Un total de **25 souches et 268 échantillons** étaient positifs à *N. gonorrhoeae* (voir carte ci-dessous).

N. gonorrhoeae : échantillons cliniques (268) / cultures (25)
semaine du 4 au 8 décembre 2017



Population étudiée :

Les **268 échantillons** provenaient de **243 patients** dont 19% (51/268) femmes, 78,4% (210/268) hommes, 0,7% (2/268) transsexuels et 1,9% (5/268) inconnus. L'âge moyen des patients était de 31 ans et l'âge médian était de 29 ans, les 24-33 ans représentant 43,2% des patients. Parmi ces échantillons 10,1% (27/268) provenaient de patients séropositifs pour le VIH. Un total de 10,8% (29/268) des patients déclarait avoir des pratiques hétérosexuelles, 22,8% (61/268) des patients étaient des HSH, 0,4% (1/268) était bisexuel et 66% (177/268) des patients avaient des pratiques inconnues. Les services prescripteurs sont décrits dans la figure ci-dessous.

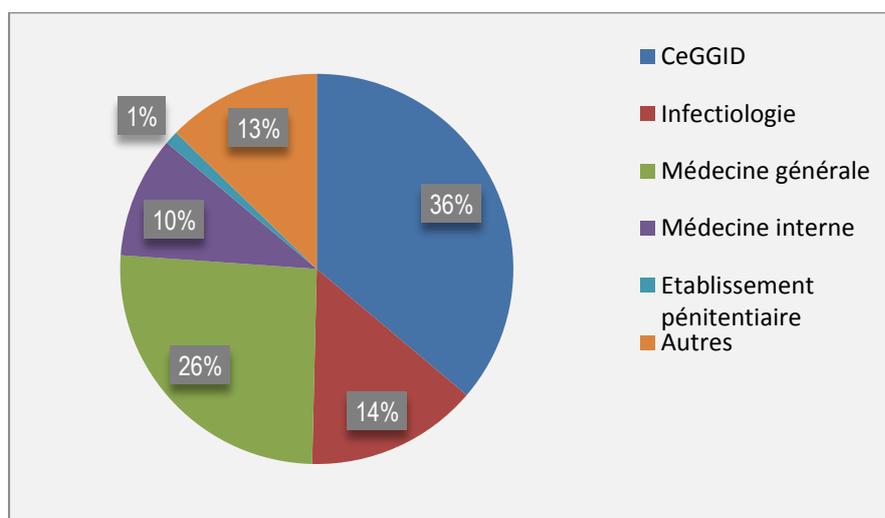


Figure. Répartition des services prescripteurs de l'étude

La répartition des sites de prélèvements reçus est de 29,9% de 1^{er} jets d'urines, 25% anus, 20,5% pharynx, 13,1% vagin ou cervico-vaginal, 8,2% urètre et 3,4% non renseigné.

Les techniques d'amplification d'acides nucléiques utilisées sont listés dans le tableau ci-dessous. Les 4 systèmes d'amplification majoritairement utilisées étaient les automates de Hologic, Cepheid, Roche et Abbott.

Automates	Fabricants	Nombre de laboratoires utilisateurs
Panther	Hologic	11
GenXpert	Cepheid	11
Cobas 4800	Roche diagnostic	10
m2000sp	Abbott	9
MAX	BD	3
LightCycler 480	Roche Life Science	3
Non indiqué	Non indiqué	3
CFX96-AllplexSTI	Seegene	2
InGenius	ELITechGroups	1
LightCycler 96	Roche Life Science	1
COBAS ® TaqMan ® 48	Roche diagnostic	1
Rotor-Gene Q	QIAGEN	1
CFX96 Touch	BioRad	1
SaMag	SACACE	1

Sensibilité des souches aux antibiotiques

Sur les 32 souches réceptionnées, 25 ont été obtenues en subculture pour antibiogramme et génotypage par la technique de NG-MAST. Ces souches provenaient de 25 patients (2 femmes et 23 hommes) ; les échantillons représentaient 8 1^{er} jets d'urine, 12 urètres, 2 vagins, 2 écouvillons rectaux et une gorge.

Les résultats des antibiogrammes sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau. Répartition des CMI des souches isolées dans l'enquête nationale

CMI en mg/L	Azithromycine	Pénicilline G*	Ceftriaxone	Céfixime	Ciprofloxacine*	Tétracycline
<0,016	2	4	22	23	14	0
0,016	0	1	3	2	0	0
0,032	2	1	0	0	0	0
0,064	3	3	0	0	0	2
0,125	10	5	0	0	1	0
0,25	4	5	0	0	0	3
0,5	2	1	0	0	0	8
1	2	0	0	0	3	2
2	0	2	0	0	1	4
4	0	0	0	0	3	0
8	0	1	0	0	2	1
16	0	0	0	0	0	1
32	0	1	0	0	0	3
48	0	0	0	0	0	1
% souches sensibles	84% (21)	25% (6)	100%	100%	58.3% (14)	20% (5)
% de souches intermédiaires	8% (2)	58.3% (14)	0	0	0	40% (10)
% souches résistantes	8% (2)	16.7% (4)	0	0	41.7% (10)	40% (10)

*les CMI affichant une résistance sont affichées en rouge ; les CMI de la pénicilline G et de la ciprofloxacine n'ont pas pu être déterminées pour une souche.

Aucune résistance au céfixime et à la ceftriaxone n'a été remarquée dans cette population. Les souches résistantes ou intermédiaires à l'azithromycine proviennent de l'institut Alfred Fournier, de l'hôpital Lariboisière de Paris et du laboratoire d'analyse LD13 de Marseille. Deux souches ont été envoyées des DROM, une du centre hospitalier de Polynésie Française de Papeete et une du CHU Félix Guyon de La Réunion. La souche de La Réunion présente une multirésistance à la pénicilline G, à la ciprofloxacine et à la tétracycline. La souche de Papeete montre une résistance intermédiaire à la pénicilline G et une résistance à la tétracycline.

Génotypage des souches par NG-MAST

L'analyse retrouve la circulation du clone ST5441 en majorité (cf figure ci-dessous).

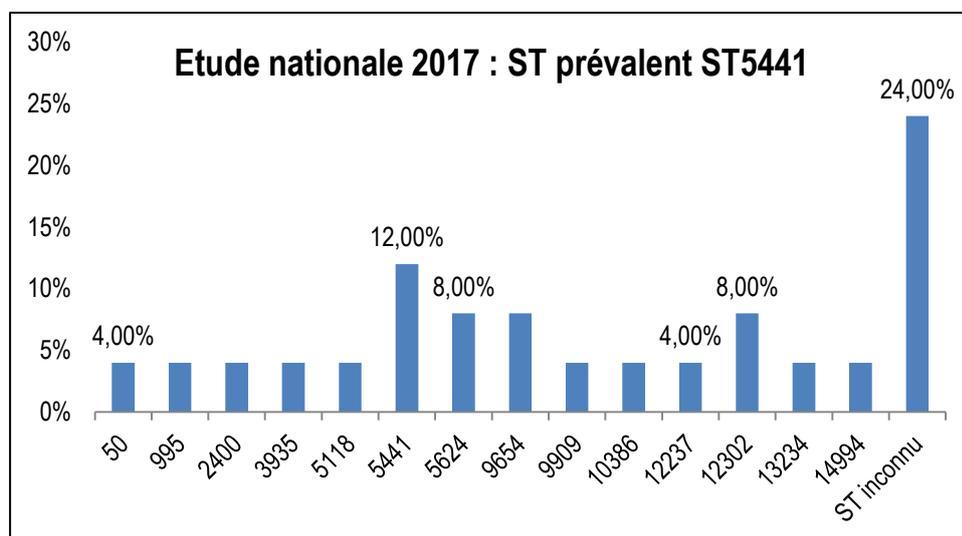


Figure : Distribution des ST en % des 25 souches de gonocoques isolées pour l'enquête nationale.

Conclusion et perspectives :

Cette étude a permis d'établir, pendant la semaine du 4 au 8 décembre 2017, un taux de positivité à *N. gonorrhoeae* de 9,1% pour les échantillons cliniques testés en PCR. A partir des échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* parvenus au CNR, il est prévu d'extraire l'ADN et d'effectuer un typage par PCR au moyen d'une technique de PCR nichée mise au point en 2017 par le CNR.

3.5.2.2 Enquête de surveillance européenne TESSy - clones de *N. gonorrhoeae* circulants en France

Chaque année, afin de suivre l'évolution des résistances de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques au niveau européen, les données microbiologiques et épidémiologiques de 100 gonococcies par pays participant sont transmises à l'ECDC via **TESSy**, la base de données qui centralise les informations.

En 2017, 98 souches françaises consécutives isolées dans le réseau Renago ont été sélectionnées par Santé Publique France sur la période sélectionnée. Les CMI des souches sélectionnées sont visualisées sur le tableau ci-dessous.

Tableau : Répartition des CMI des souches isolées en 2016 pour l'enquête ECDC.

CMI en mg/L	Ciprofloxacine	Ceftriaxone	Cefixime	Azithromycine
0,002	0	54		
0,004	20	17		
0,008	37	7		
0,016	1	12	78	
0,032	3	6	9	1
0,064	0	2	7	12
0,125	1		3	21
0,25	1		1	32
0,5	2			25
1	4			4
2	5			3

4	11			
8	8			
16	4			
32	1			
% souches sensibles	62.2% (61)	100% (98)	98.9% (97)	67.3% (66)
% de souches intermédiaires	0	0	0	25.5% (25)
% souches résistantes	37.8% (37)	0	1.1% (1)	7.1% (7)

Le génotypage de 98 souches a été effectué par la technique NG-MAST dans le laboratoire de l'hôpital St Louis. Les ST identifiés montre la circulation des clones ST2, ST5441, ST5793 et ST13113 (cf figure ci-dessous). Le clone européen ST1407 impliqué dans la résistance aux C3G est faiblement représenté dans la population observée.

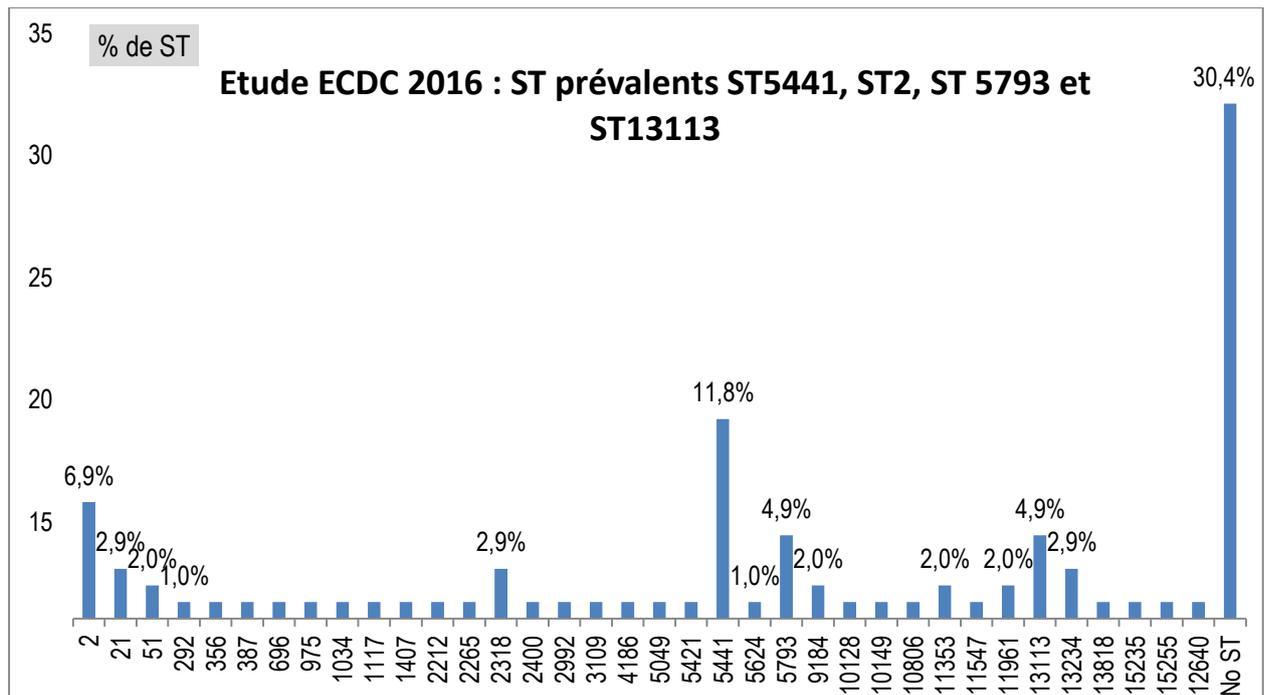


Figure : Distribution des ST en % des 102 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2016 et expertisées en 2017 pour la surveillance européenne de l'ECDC.

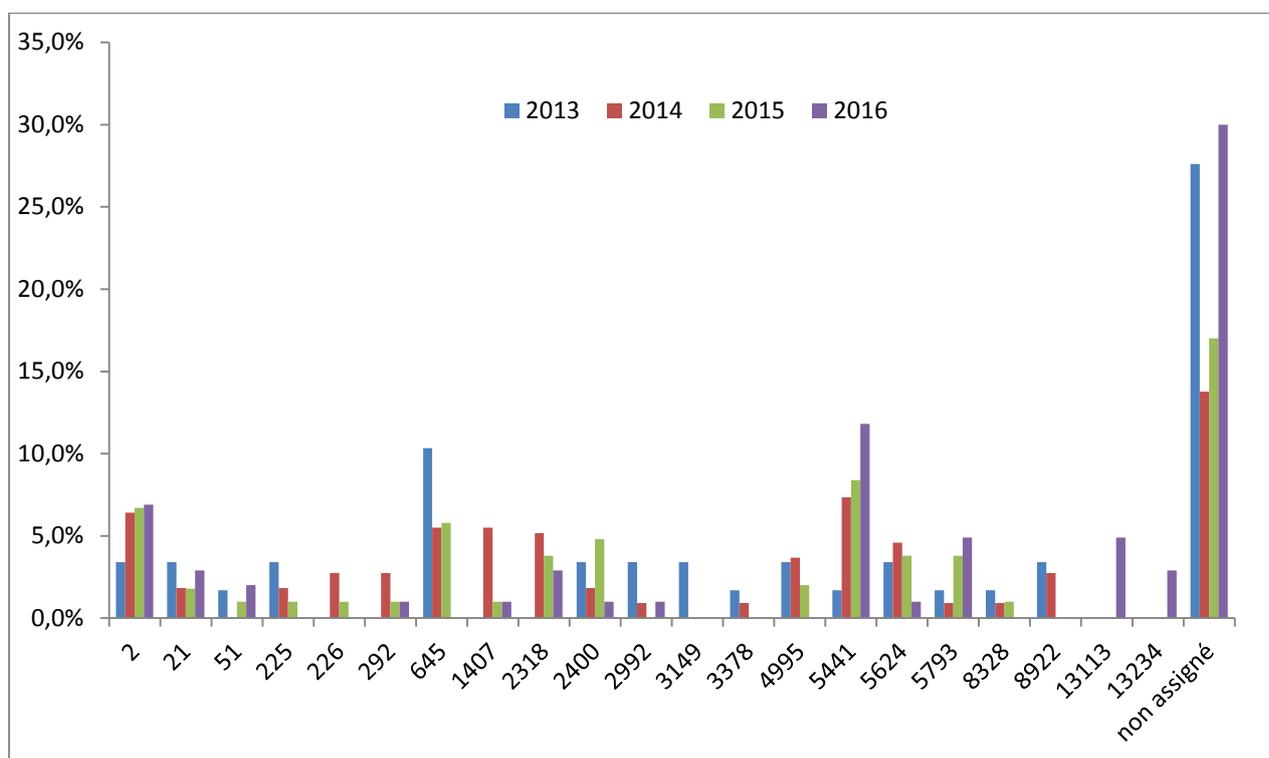


Figure 1 : Distribution des ST en % des souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago entre 2013 et 2016 pour la surveillance européenne de l'ECDC.

Lorsque l'on analyse les résultats des génotypages de souches de gonocoques isolées en France entre 2013-2016, il existe 3 clones prédominants ST2, ST645 et ST5441. Ces clones n'ont pas été reliés à la multirésistance aux antibiotiques. Le clone européen ST1407 impliqué dans la résistance aux C3G est faiblement représenté dans la population observée.

Pour rappel, les ST retrouvés dans l'étude IPERGAY étaient les ST5793 ST5441 et ST5624. Un séquençage plus conséquent de souche par la technique de NGS permettra le suivi plus particulier de ces génotypes.

3.5.3 Laboratoire APHP Cochon

En partenariat avec la Direction des maladies infectieuses de Santé Publique France, le laboratoire associé syphilis a entrepris la mise en place d'une étude des cas de syphilis congénitale depuis 2011. Cette étude englobe la France métropolitaine ainsi que la Polynésie et les DOM TOM. Elle permettra à terme pour :

- 1) Santé Publique France, d'évaluer le nombre de cas de syphilis congénitale répertoriés ainsi que l'efficacité des voies de remontée de ces informations. Une attention est plus particulièrement apportée pour les informations provenant des DOM-TOM;
- 2) le CNR d'évaluer la place de la PCR sur les prélèvements périnataux dans le cadre du diagnostic de syphilis congénitale.

4 Alerte

4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Pas d'alerte en 2017.

4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

4.2.1 Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS

Les conditions d'alerte ont été définies en accord avec Santé Publique France et concernent les cas suivants :

- Souche présentant une résistance à la ceftriaxone ou à l'azithromycine
- Recrudescence importante du nombre de cas, que ce soit une augmentation générale ou une épidémie localisée
- Événement inhabituel (identification de plusieurs cas d'infections extra-génitales, notamment de gonococcies oculaires)

Si un de ces cas est identifié ou adressé au CNR, Santé Publique France est informé dans les plus brefs délais par mail ou par téléphone. Les interlocuteurs privilégiés sont Ndeindo Ndeikoundam, Florence Lot et Delphine Viriot.

4.2.2 Signalements et/ou alertes en 2017

En 2017, une alerte a été adressée à Santé Publique France pour une souche résistante haut niveau à la ceftriaxone découverte chez une patiente du CeGGID de St Louis, Paris, novembre 2017. Aucune épidémie localisée ou cas groupés n'ont par ailleurs été signalés en 2017.

4.2.3 Analyse des tendances et du fonctionnement du système de signalement

La communication avec Santé Publique France et avec les laboratoires du réseau fonctionne très bien, que ce soit par échanges téléphoniques ou électroniques. La tendance est à confirmer mais il semble que les nouvelles modalités d'envoi des souches (deux périodes annuelles au lieu d'un envoi permanent toute au long de l'année) soient à l'origine d'une diminution de la participation des laboratoires Renago à la surveillance épidémiologique (seuls 35 laboratoires sur 64 ont participé à la surveillance microbiologique en 2017). Cette évolution est donc à surveiller et il est indispensable de continuer à entretenir ce réseau pour suivre l'évolution des cas et des souches.

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 N. Dupin. C'est Santé Publique France qui se charge de contacter le centre demandeur pour classer le cas.

4.3.2 Pour l'année 2017 :

- 8 alertes de suspicion de syphilis congénitale ont été déclenchées par le CNR syphilis à Santé Publique France.

Numéro CNR	Centre	Age	Sexe	PRELEVEMENTS	Date du prélèvement	nPCR	Edition
01178	St Maurice	1 j	F	Ecouvillon gorge-nez	29/12/16	pos	06/01/17
011731	St Denis La Réunion	1 j	F	LCR	07/01/17	pos	20/01/17
031710	Necker	1 j	F	Serum / Ecouvillon nasal	02/03/17	neg/fpos	10/03/17
071725	Troyes	1 j	F	LCR	01/07/17	pos	19/07/17
091752	Valenciennes	25	F	Placenta	20/09/17	pos	29/09/17
091767	Bézier	39	F	Sang cordon / Placenta / Serum pour expertise	20/09/17	pos	29/09/17
10176	Cergy Pontoise	24	F	Liq. Ascite	27/09/17	pos	06/10/17
101735	La Pitié	1 j	M	Ecouv. Nasal / Sérum pour expertise sérologique	16/10/17	pos	27/10/17

- 41 alertes de suspicion de neurosyphilis ont été déclenchées par le CNR syphilis.

Numéro CNR	Centre	Age	PRELEVEMENTS	Date du prélèvement	nPCR	VDRL	Edition
01177	St Lo	46	LCR	14/12/16	neg	Pos	05/01/17
011714	Dax	71	LCR	04/01/17	neg	Pos	23/01/17
011717	Créteil	43	LCR	06/01/17	Pos	Neg	23/01/17
011719	Nancy	69	LCR	05/01/17	Pos	Pos	23/01/17
011727	Tourcoing	30	LCR	06/01/17	Neg	Pos	17/01/17
011729	Strasbourg	49	LCR	04/01/17	Pos	Pos	23/01/17
011731	St Denis La Réunion	1 j	LCR	07/01/17	Pos	Pos	24/01/17
011738	Angers	68	LCR	18/01/17	Pos	Neg	24/01/17
011741	Cochin/Med Int	36	LCR	21/01/17	Pos	Pos	24/01/17
011743	St Lo	46	LCR	24/01/17	Neg	Pos	01/02/17
02175	Cochin/Med Int	36	LCR	01/02/17	Neg	Pos	13/02/17
021715	Pointe a Pitre	54	LCR / Sérum pour expertise sérologique	31/01/17	Neg	Pos	13/02/2017 - 16/02/17
021717	Bondy	73	LCR	09/02/17	Neg	Pos	17/02/17
021733	Tenon	52	LCR	17/02/17	Pos	Neg	02/03/17
03175	St Louis	34	LCR	28/02/17	Pos	Neg	14/03/17
031751	Fort de France	51	LCR (qt insuff pour PCR)	20/03/17	/	Pos	30/03/17
04172	Fort de France	51	LCR	20/03/17	Pos	/	/
041723	Lariboisière	47	LCR	12/04/17	Neg	Pos	28/04/17
041729	Dax	27	LCR	20/04/17	Neg	Pos	28/04/17
041732	Nice	40	LCR	12/04/17	Pos	Neg	28/04/17
05173	Strasbourg	69	LCR	26/04/17	Neg	Pos	11/05/17
051717	Angers	61	LCR	09/05/17	Pos	Pos	18/05/17
051735	Colombes	39	LCR	18/05/17	Neg	Pos	30/05/17
071720	Tourcoing	26	LCR	10/07/17	Neg	Pos	25/07/17
071725	Troyes	1 j	LCR	01/07/17	Pos	Neg	24/07/17
071733	Lariboisière	31	LCR	11/07/17	Pos	Neg	24/07/17
081739	Lens	52	LCR	28/08/17	Neg	Pos	30/08/17
081740	Cochin	59	LCR	25/08/17	Neg	Pos	30/08/17
09171	Lille	39	LCR (qt insuff pour VDRL)	16/05/17	Pos	/	/
09173	Haguenau	89	LCR	18/08/17	Neg	Pos	07/09/17
091712	La Pitié	88	LCR	06/09/17	Neg	Pos	14/09/17
091714	Lille	52	LCR	25/08/17	Pos	Neg	14/09/17
091754	Ambroise Paré	40	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	20/09/17	/	Pos	21/09/17
091761	Guerét	49	LCR	19/09/17	Neg	Pos	28/09/17
091773	Necker	51	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	23/09/17	/	Pos	28/09/17
10174	Libourne	61	LCR	28/09/17	Pos	Neg	05/10/17
101715	Nice	74	LCR	29/09/17	Pos	Neg	12/10/17
101743	HEGP	79	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	20/10/17	/	Pos	26/10/17
11174	Reims	69	LCR	25/10/17	Neg	Pos	09/11/17
12178	Garches	57	LCR	04/12/17	Neg	Pos	12/12/17
121736	Cochin/Réa Med	44	LCR/Ecouvillon genital	20/12/17	Neg	Pos	28/12/17

4.3.3 Correspondance avec l'ANSP

- Le laboratoire associé syphilis envoie les résultats de détection génomique par nPCR des échantillons répertoriés dans le cadre du protocole GENOSYPH. Santé Publique France envoie au CNR syphilis une extraction de la base de données (diagnostic final syphilis, statut VIH, fond noir, sérologie, lieu de prélèvement, orientation sexuelle) sur les échantillons relatifs à GENOSYPH en utilisant le numéro CNR correspondant à chaque échantillon.

- Réunion annuelle avec Santé Publique France pour faire le point, discuter et classer les cas de diagnostic difficile envoyés pour analyse et définir les axes de travail en termes de surveillance.

4.3.4 Détection et investigation des cas groupés

Pas de détection de cas groupés en 2017.

4.3.5 Analyse des tendances et fonctionnement du système

Analyse du système

Compte tenu du nombre actuel de prélèvements positifs, la fréquence du système d'alerte mise en place conjointement par Santé Publique France et le CNR est adéquate. Dans le cas des alertes sur les syphilis congénitales il permet une réactivité très rapide. De plus la périodicité d'alerte à Santé Publique France pour tout autre échantillon positif peut être facilement réduite en fonction du nombre de cas reçus.

Retour des demandes de renseignements

Les demandes de renseignements complémentaires ont été effectuées pour les échantillons de LCR positifs en nPCR. Une fiche spécifique a été élaborée et envoyée par courrier au centre demandeur. Sur 41 demandes de renseignements complémentaires, 16 sont revenues au CNR (39%) dans un délai moyen de 28 jours. Après relance, 80% des renseignements complémentaires sont revenus sous 6 mois.

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

Le site de web du CNR des IST bactériennes est en cours de création. Le CNR a fait appel à la société Big Bang Communication pour élaborer le site web avec serveur sécurisé de résultats et un logo pour le CNR. Après 4 mois de travail, le site web du CNR devrait être publié en mai 2018. Les correspondants pourront trouver tous les documents à envoyer pour expertise d'un échantillon ou d'une souche, rentrer de manière anonymisée et sécurisée leurs demandes d'expertise. Ils auront également accès aux rapports du CNR, des documents et publications de référence et aux actualités concernant le CNR.

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

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

B. de Barbeyrac. Approche syndromique des infections génitales par biologie moléculaire. Colloque des laboratoires RBML, Alphabio, 23 juin 2017, Biarritz.

S. Pereyre. *Mycoplasma genitalium*. 1^{ère} journées Francophones de biologie Médicale, Bordeaux, 27-29 septembre 2017.

B. de Barbeyrac. Infections à *Chlamydia trachomatis*. 1^{ère} journées Francophones de biologie Médicale, Bordeaux, 27-29 septembre 2017.

B. de Barbeyrac. *Mycoplasma genitalium* : nouvel agent d'IST. 31^{ème} journée du CGMMP. 6 octobre 2017. Marseille, France

S. Pereyre. Les mycoplasmes urogénitaux, des agents d'infections sexuellement transmissibles ? 51^{ème} journées de Biologie Praticienne, Paris, 1 décembre 2017.

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

- C. Bébéar, S. Pereyre. *Mycoplasma* et *Ureaplasma* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

- B. de Barbeyrac. *Chlamydia* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

- F. Grattard, C. Payan, M. Abou, A. Beby-Defaux, C. Bébéar. Infections uro-génitales et sexuellement transmissibles. In : Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

- K.B. Waites, C. Bébéar. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. In press.

- C. Bébéar, J. S. Dumler. Algorithms for identification of *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and obligate intracellular bacteria. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. In press.

- *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. Celui de l'année 2017 est en préparation et devrait être envoyé en mai 2018.

- *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) ;*

Le site web du nouveau CNR des IST bactériennes est en cours de production (cf plus haut).

Le dernier rapport 2016 du précédent CNR chlamydiae a été mis en ligne courant 2017.

Du 1^{er} avril 2017 au 31 décembre 2017, le site initialement dédié aux chlamydiae (<http://www.cnrchlamydiae.u-bordeaux.fr/>) a été actualisé pour l'élargir aux mycoplasmes urogénitaux : ajout de fiches clinico-biologiques concernant *M. genitalium* d'une part et *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* d'autre part, ajout de fiches de demandes et modalités d'envoi concernant les analyses proposées par le CNR pour les mycoplasmes urogénitaux, ajouts de recommandations européennes récentes concernant *M. genitalium*.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé :*

- Mise en place d'une adresse email générique cnr.ist@chu-bordeaux.fr dont les destinataires sont les membres du CNR pour 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.

- Depuis le 1^{er} avril 2017, 60 à 70 échanges téléphoniques ou par email concernant les activités d'expertises (conseils techniques pour la détection et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux, 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 et IAF

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

B. Berçot. « Actualités sur les infections à gonocoque : quelles stratégies pour combattre l'émergence de la résistance » MSD Care - RPS 1701-068245 "VIH et Maladies Sexuellement Transmissibles, 28 février 2017, Nantes.

A. Goubard, Syphilis : actualités, diagnostic et conduite à tenir. Entretiens de Bichat. 2017.

- *Accueil de stagiaires pour le transfert de techniques ;*

Stagiaires	Diplômes préparés	Périodes
ASERE Frédérique (Université Rennes)	Master 1 Microbiologie fondamentale et appliquée	27 mars 2017 au 25 mai 2017
DAI Karine (Estba)	BTS Analyses bio-médicales	13 mars 2017 au 14 avril 2017
DALDOUL Asmaa (Université de Lorraine)	Master 1 BIOMANE	3 avril 2017 au 26 mai 2017
ENDREGAT Amina (Lycée Maximilien Sorre à Cachan)	BTS Analyses bio-médicales	9 janvier au 10 février 2017
LEVOYER Cécile (Lycée Marie Curie Versailles)	BTS Analyses bio-médicales	9 janvier au 10 février 2017
AQUINO Camille Grace (Lycée Marie Curie Versailles)	BTS Analyses bio-médicales	9 janvier au 10 février 2017
LE BLOAS Jeanne (Lycée Marie Curie Versailles)	BTS Analyses bio-médicales	9 janvier au 10 février 2017
COLLOT Kylian (ENCPB)	BTS Analyses bio-médicales	13 février au 17 mars 2017
VALOGGIA Christophe (ESTBA)	BTS Analyses bio-médicales	22 mai au 7 juillet 2017
MADI BOUNOU Soifiya (Lycée Maximilien Sorre)	BTS Analyses bio-médicales	22 mai au 7 juillet 2018
GALLE Enola (Lycée Marie Curie Versailles)	BTS Analyses bio-médicales	22 mai au 7 juillet 2019
Diéïnaba NIAKATE (Lycée Maximilien Sorre)	BTS Analyses bio-médicales	22 mai au 7 juillet 2020

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

A. Goubard, B. Berçot. *Neisseria gonorrhoeae*. Référentiel de Microbiologie médicale, 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

- *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), ...*
- Depuis le 1^{er} avril 2017, l'expertise gonocoque dans le cadre du CNR IST bactériennes est localisé à l'hôpital St Louis, Paris avec deux sites d'envoi des souches et prélèvements.
- Surveillance Renago : les souches de gonocoque reçues dans le cadre de la surveillance Rénago (surveillance communautaire) sont toujours à adresser à l'IAF où elles sont enregistrées dans le logiciel de gestion du laboratoire coordonnateur sous un code intégrant l'identifiant du laboratoire transmetteur et le numéro de la souche ou, pour les souches télédéclarées dans SollST, le numéro donné par le logiciel de saisie. Les résultats obtenus sont enregistrés dans le système de lecture et d'expertise des antibiogrammes (SIRscan®) puis transférés dans le logiciel de gestion des analyses du laboratoire. Les comptes rendus de résultats sont envoyés au laboratoire transmetteur par courrier et par fax.
- Surveillance du réseau national des hôpitaux et surveillance des souche résistantes aux C3G (CMI > 0.125 mg/l) ou à haut niveau à l'azithromycine (CMI > 8 mg/l) : les souches de gonocoques et échantillons sont à envoyer à l'hôpital St Louis, Paris.
- Les informations concernant les différentes missions du CNR, les expertises, l'envoi des souches, les alertes, les conseils seront documentés sur le nouveau site internet déployé courant 2018. Les numéros de téléphones ainsi que les adresses mails des différents membres du CNR y seront répertoriés.
- En ce qui concerne les infections à gonocoque, nous répondons à toutes les demandes d'informations concernant le diagnostic et/ou le traitement des infections gonococciques, émanant de biologistes ou de médecins. Un biologiste est de permanence tous les jours de 8h30 à 18h30 et le samedi de 8h30 à 13h à l'Institut Fournier et à Hôpital St Louis, Paris. Les biologistes sont également joignables par messagerie électronique.

5.1.3 Laboratoire APHP Cochin

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

Nicolas Dupin, participation à de nombreux FMC et congrès :

- Dépistage et traitement des IST; 68èmes Journées Pharmaceutiques Internationales de Paris, 23 Novembre 2017, ASIEM 6 rue Albert de Lapparent
- Infections sexuellement transmissibles ; 39^{ème} Congrès de Pharmacie Hospitalière, 23-24 Novembre 2017, Maison Internationale, Cité Internationale Universitaire de Paris
- FMC 77, La syphilis est épidémique : ce que vous devez absolument savoir en 2017, Journées Dermatologiques de Paris 2017, 15 Décembre 2017, Palais des Congrès, Paris
- FMC de médecins généralistes, d'infectiologie et de dermatologie, DIU, DU
- Staff du service de Maladies Infectieuses et tropicales, Hôpital Tenon, manifestations buccales classiques et non classiques des IST
- 25^{ème} congrès européen de Dermatologie (EADV), skin diseases indicating early HIV infection

Ouvrages didactiques

- Rédaction des recommandations de prise en charge des MST

Nadjet Benhaddou

Congrès RICAI, 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 18-19 décembre 2017

Staff dans les CHU en 2017 : Communication inter-hôpital : syphilis congénitale, réanimation néonatale à l'hôpital Trousseau

Guides élaborés : REMIC 2018, chapitre syphilis

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

L'ensemble des données de surveillance et de production sont diffusées par l'intermédiaire du site internet du CNR syphilis (www.cnr-syphilis.fr). Le nouveau site internet du CNR IST Bactérienne est en cours de réalisation, cf plus haut.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé*

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 2017, cette activité a consisté en moyenne à 3-4 appels par semaine. Sur l'année, le CNR a répondu à plus de 150 appels. Les appels sont assez homogènes sur la période. Le CNR propose également une assistance par courrier électronique, 200 demandes par mail ont été reçues pour 2017.

Nos interlocuteurs sont principalement des médecins cliniciens et des biologistes de toute la France. En moyenne, 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

Bertille de Barbeyrac et Cécile Bébéar participent respectivement aux groupes de travail et groupe de lecture mis en

place par la HAS dans le cadre des travaux sur la « Réévaluation de la stratégie de dépistage des infections à *Chlamydia trachomatis* » réalisés à la demande de la Direction Générale de la Santé.

5.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

B. Berçot est la représentante française du réseau de surveillance européen EURO-GASP : The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme des Infections Sexuellement Transmissibles pour le gonocoque en contact avec l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

5.2.3 Laboratoire APHP Cochin

- Participation au groupe de travail « Commission de Nomenclature » de la CNAM et de la Société Française de Microbiologie du Dr. Bennhaddou pour la mise en place de la nouvelle nomenclature pour le dépistage de la syphilis en routine.

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

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 Laboratoire CHU de Bordeaux

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, 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 permettra de tester 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. Deux mille cinq cent 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 laboratoire en tant que principal co-investigateur réalise les tests diagnostiques CT/NG et participe à l'analyse des résultats. Les inclusions ont commencé en janvier 2016. A ce jour, 577 étudiantes ont été incluses, 291 dans le bras intervention et 286 dans le bras témoin.

Le protocole a été publié dans *Trials* en 2017 : J. Tamarelle, A. C. M. Thiébaud, B. Sabin B, C. Bébéar, P. Judlin, A. Fauconnier, D. Rahib, L. Méau-de-Roufai, J. Ravel, S. A. Morré, B. de Barbeyrac, E. Delarocque-Astagneau and the i-Predict study group. 2017. Early screening for *Chlamydia trachomatis* in young women for primary prevention of pelvic inflammatory disease (i-Predict): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017 Nov 13;18(1):534.

6.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Souches de gonocoque résistantes au céfixime isolées en France (2014 à 2017) : étude du résistome et de l'épidémiologie moléculaire par séquençage haut débit (NGS)

Mémoire de Master 2 Recherche de Thibault Poncin. Analyse bioinformatique : Manel Merimeche

Dans ce contexte où émerge la menace d'impasses thérapeutiques avec les gonococcies, l'étude vise à mieux comprendre les déterminants de résistance aux C3G voire d'en identifier de nouveaux. Par ailleurs, surveiller la

dissémination de clones multirésistants peut être un puissant outil de prévention afin de limiter leur propagation.

L'objectif de notre travail est de décrire le résistome et le core-genome de souches de gonocoque résistantes au céfixime et d'étudier la clonalité de ces souches dans un but épidémiologique. Notre étude inclut une centaine de souches de gonocoques résistantes au céfixime, isolées en France entre 2008 et 2017 dans le cadre du réseau Renago. Le résistome et core-génome des souches sont obtenus par l'analyse des séquences issues du séquençage haut débit (NGS, technique Illumina), et l'étude phylogénétique est générée par les techniques de MLST, NG-MAST et NG-STAR. Dans le cadre de ce travail, nous avons identifié une nouvelle souche résistante à la ceftriaxone en novembre 2017 au CeGGID de St Louis décrit dans ce dossier (en cours de publication ; Poncin, communication orale, ECCMID 2018, Madrid).

6.1.3 Laboratoire APHP Cochin

Objectifs : Le typage des souches de *T. pallidum pallidum* (TPA) est un enjeu important pour mieux caractériser l'épidémie au sein de la population et de bien caractériser les souches entre elles. Dans cette étude, des souches TPA provenant de différentes localisations en France sont typées à l'aide d'une nouvelle technique MLST.

Partenariat et apport du CNR : En collaboration avec l'équipe du Dr. Smajs (Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic), nous avons participé au typage de souche de TPA par une nouvelle technique MLST développée par cette équipe. Un nombre de 133 souches, récoltées en France (Aix-en-Provence (n=8), Fréjus (n=1), Marseille (n=23), Metz-Thionville (n=10), Nancy (n=6), Paris (n=79), Tourcoing (n=2), Valenciennes (n=3)) et la Martinique (1) par le CNR sur la période 2010-2016 dans le cadre de l'expertise et du programme GENOSYPH, ont été analysées.

Etat d'avancement et principaux résultats : A partir des 133 échantillons, le profil allélique complet a été obtenu sur 112 échantillons (84,2% d'efficacité d'amplification). L'ensemble des échantillons, avec profils complet et incomplet, se répartissent en 18 profils alléliques différents (tableau ci-dessous). Deux groupes SS14-like et Nichols sont mis en évidence dans la population étudiée. La majorité des échantillons (110) appartiennent au cluster SS14-like alors que 7 échantillons se regroupent sous le cluster Nichols-like.

Table. MLST allelic profiles of typed samples

Allelic profile ¹	Typing	TP_0136 allelic variant ²	TP_0548 allelic variant ²	TP_0705 Allelic variant ²	23S rDNA ³	Genetic group ⁴	Frequency
1.1.1	Complete	1	1	1	S (6)/R8 (10)	SS14-like	16
1.1.9	Complete	1	1	9	S	SS14-like	1
1.1.11	Complete	1	1	11	R8	SS14-like	1
1.1.13	Complete	1	1	13	R8	SS14-like	1
1.17.9	Complete	1	17	9	R8	SS14-like	2
2.1.2	Complete	2	1	2	S	SS14-like	1
1.3.1	Complete	1	3	1	S (1)/R8 (68)/UN (1)	SS14-like	70
1.18.1	Complete	1	18	1	R8	SS14-like	1
1.19.1	Complete	1	19	1	R8	SS14-like	1
1.21.1	Complete	1	21	1	R8	SS14-like	1
1.23.1	Complete	1	23	1	R8	SS14-like	1
14.3.1	Complete	14	3	1	R8	SS14-like	1
1.1.8	Complete	1	1	8	S (1)/R8 (4)	SS14-like	5
1.11.8	Complete	1	11	8	R8	SS14-like	2
1.22.12	Complete	1	22	12	S	SS14-like	1
9.7.3	Complete	9	7	3	S (1)/R8 (4)	Nichols-like	5
9.20.3	Complete	9	20	3	S	Nichols-like	1
3.2.3	Complete	3	2	3	R8	Nichols-like	1
1.X.1	Partial	1	NA ⁵	1	S (1)/R8 (1)	SS14-like	2

1.3.X	Partial	1	3	NA ⁵	R8	SS14-like	1
1.X.9	Partial	1	X	9	R8	SS14-like	1
X.17.9	Partial	NA ⁵	17	9	R8	SS14-like	1
X.X.3	Partial	NA ⁵	NA ⁵	3	S	unknown	1

¹Allelic profiles are based on a three-number code: the first number corresponds to the allelic variant in TP0136 locus, the second corresponds to the allelic variant in the TP0548 locus and the third corresponds to the allelic variant in the TP0705 locus (Grillová et al. 2018).

²SNVs that determine the allelic variants are shown in the Figures 1-3.

³S – no mutation in 23S rDNA (sensitive), R8 – A2058G mutation in 23S rDNA (resistance), UN – unknown. In cases where sensitive and resistant cases were found for one profile the frequency is given in parenthesis.

⁴According to Nechvátal et al. 2014.

⁵NA, not available.

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

S. Pereyre, Ch. Bébéar, C. Bébéar. Mycoplasmes. Précis de Bactériologie clinique, 3ème Edition, Ed P. Riegel, ESKA, Paris, 2017.

B. de Barbeyrac, O. Peuchant, C. Bébéar. Chlamydia. Précis de Bactériologie clinique, 3ème Edition, Ed P. Riegel, ESKA, Paris, 2017.

C. Bébéar, Ch. Bébéar. 2017. Mycoplasmes. In: Encycl. Méd. Chir., Biologie médicale. Doi : 10.1016/S2211-9698(17)74612-2.

S. Pereyre, C. Bébéar. Infections à *Mycoplasma hominis*. Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Ed. scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies Infectieuses, sous presse.

C. Bébéar, S. Pereyre. *Mycoplasma* et *Ureaplasma* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

B. de Barbeyrac. Les Chlamydioses humaines. Feuille de biologie, N° 341, 15-26, -mars 2018

B. de Barbeyrac. Chlamydia spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

F. Grattard, C. Payan, M. Abou, A. Beby-Defaux, C. Bébéar. Infections uro-génitales et sexuellement transmissibles. In : Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

Publications internationales :

S. Pereyre, C. Laurier Nadalié, C. Bébéar, investigator group. 2017. *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. Clin. Microbiol. Infect. 23 :122.e1-122.e7.

C. Le Roy, N. Hélin, C. Bébéar, S. Pereyre. 2017. Evaluation of a commercial multiplex qPCR assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance-associated mutations in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 55:978-979.

C. Le Roy, S. Pereyre, N. Hélin, C. Bébéar. 2017. French prospective clinical evaluation of the Aptima[®] *Mycoplasma genitalium* assay (CE-IVD) and macrolide resistance detection using three distinct assays. J. Clin. Microbiol. 55:3194-3200.

C. Le Roy, N. Hélin, S. Pereyre, C. Bébéar. 2017. Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France. Emerg. Infect. Dis. 22: 1677-1679.

- 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. 2017. Early prosthetic joint infection due to *Ureaplasma urealyticum*: benefit of 16S rRNA gene sequence analysis for diagnosis. J. Microbiol. Immunol. Infect. pii : S1684-1182.
- E. Canouï, K. Blanc, J. Loubinoux, S. Valade, C. Hamard, A. Lefebvre, S. Amorim, C. Bébéar, V. Rodriguez-Nava, D. Lebeaux, O. Launay, M. Alifano, A. Rabbat, S. Kernéis. 2017. The value of molecular techniques to diagnose *Ureaplasma urealyticum* and *Nocardia farcinica pleuropneumonia* in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. Int. J. Infect. Dis. 64 : 93-95.
- D. Kersaudy-Rahib, N. Lydié, C. Le Roy, L. March, C. Bébéar, P. Arwidson, B. de Barbeyrac. 2017. Chlamyweb study II: a randomised controlled trial of an online offer on home-based chlamydia sampling in France. Sex. Transm. Infect. 93:188-195.
- J. Tamarelle, A. C. M. Thiébaud, B. Sabin B, C. Bébéar, P. Judlin, A. Fauconnier, D. Rahib, L. Méau-de-Roufai, J. Ravel, S. A. Morré, B. de Barbeyrac, E. Delarocque-Astagneau and the i-Predict study group. 2017. Early screening for *Chlamydia trachomatis* in young women for primary prevention of pelvic inflammatory disease (i-Predict): study protocol for a randomised controlled trial. Trials. 2017 Nov 13;18(1):534.
- H.M. Seth-Smith, J.C. Galán, D. Goldenberger, D.A. Lewis, O. Peuchant, C. Bébéar, B. de Barbeyrac, A. Bénard, I. Carter, J. Kok, S.M. Bruisten, B. Versteeg, S.A. Morré, N.R. Thomson, A. Egli, H.J. de Vries. 2017. Concern regarding the alleged spread of hypervirulent *lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis* strain in Europe. Euro. Surveill. 22 pii : 30511.
- A. Desclaux, A. Touati, D. Neau, C. Laurier-Nadalié, C. Bébéar, B. de Barbeyrac, C. Cazanave. 2017. Extra-rectal *lymphogranuloma venereum* in France: a clinical and molecular study. Sex. Transm. Infect. 94:3-8.
- R. Haber, I. Maatouk, B. de Barbeyrac, M. Bagot, M. Janier, S. Fouéré. 2017. *Lymphogranuloma Venereum*-serovar L2b presenting with painful genital ulceration: an emerging clinical presentation? Sex. Transm. Dis. 44: 310-312.
- N. Lydié, B. de Barbeyrac, L. Bluzat, C. Le Roy, D. Kersaudy-Rahib. 2017. Chlamyweb study I: rationale, design and acceptability of an internet based chlamydia testing intervention. Sex. Transm. Infect. 93:179-187. A. Desclaux, N. Mehzen-Cetre, O. Peuchant, A. Touati, C. Cazanave. 2017. Reactive arthritis associated with *Chlamydia trachomatis* genovar L2b proctitis. Med. Mal. Infect. 47: 177-178.
- J.M. Molina, I. Charreau, C. Chidiac, G. Pialoux, E. Cua, C. Delaugerre, C. Capitant, D. Rojas-Castro, J. Fonsart, B. Bercot, C. Bébéar, L. Cotte, O. Robineau, F. Raffi, P. Charbonneau, A. Aslan, J. Chas, L. Niedbalski, B. Spire, L. Sagaon-Teyssier, D. Carette, S. L. Mestre, V. Doré, L. Meyer; ANRS IPERGAY Study Group. 2017. Post-exposure prophylaxis with doxycycline to prevent sexually transmitted infections in men who have sex with men: an open-label randomised substudy of the ANRS IPERGAY trial. Lancet Infect Dis. Dec 8. pii: S1473-3099.
- K. B. Waites, C. Bébéar. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. Sous presse.
- C. Bébéar, J. S. Dumler. Algorithms for identification of *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and obligate intracellular bacteria. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. Sous presse.
- B. de Barbeyrac, C. Laurier-Nadalié, A. Touati, C. Le Roy, L. Imounga, N. Hénin, O. Peuchant, C. Bébéar, G. La Ruche, N Ndeikoundam Ngangro. Observational study of anorectal *Chlamydia trachomatis* infections in France through the LGV surveillance network, 2010-2015. En révision dans Int J STD AIDS.
- A. Meygret, C. Le Roy, H. Renaudin, C. Bébéar, S. Pereyre. Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2012 and 2015. En révision dans J Antimicrob Chemother.

Communications nationales

- A. Meygret, C. Le Roy, H. Renaudin, C. Bébéar, S. Pereyre. 2017. Tetracycline and fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis*. 36^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 12-13 décembre. Paris. Communication orale.
- M. Deborde, S. Pereyre, C. Bébéar, M. Hessamfar, F. Le Marec, F. Dabis, C. Cazanave. 2017. *Mycoplasma genitalium* chez les PrEPeurs : mythe ou réalité ? 18^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie. Juin, Saint Malo. Communication orale.

Communications internationales

C. Le Roy, N. Hénin, C. Bébéar, S. Pereyre. 2017. Prospective clinical evaluation of the Aptima *Mycoplasma genitalium* assay (CE-IVD) in France. 31st Congress of IUSTI-Europe on Sexually Transmitted Infections. 31 August-02 September Helsinki, Finlande. Communication orale.

B. de Barbeyrac, A. Touati, C. Laurier-Nadalié, C. Le Roy, N. Hénin, O. Peuchant, N. Ndeikoundam, C. Bébéar, G. La Ruche. 2017. Lymphogranuloma venereum proctitis are still increasing in France. STI and HIV world congress, 8-12 July, Rio, Brésil. Communication orale.

C. Le Roy, N. Hénin, S. Pereyre, C. Bébéar. 2017. Prospective clinical evaluation of the Aptima *Mycoplasma genitalium* assay (CE-IVD) in various specimens from symptomatic and asymptomatic patients in France. STI and HIV world congress, 8-12 July, Rio, Brésil. Communication orale.

Conférences sur invitation

S. Pereyre. *Mycoplasma genitalium*. 1^{ères} journées Francophones de biologie Médicale, Bordeaux, 27-29 septembre 2017.

S. Pereyre. Les mycoplasmes urogénitaux, des agents d'infections sexuellement transmissibles ? 51^{èmes} journées de Biologie Praticienne, Paris, 1 décembre 2017.

B. de Barbeyrac. Approche syndromique des infections génitales par biologie moléculaire. Colloque des laboratoires RBML, Alphabio, 23 juin 2017 Biarritz, Hotel sofitel Louison Bobet.

B. de Barbeyrac. Infections à *Chlamydia trachomatis*. 1^{ères} journées Francophones de biologie Médicale, Bordeaux, 27-29 septembre 2017.

B. de Barbeyrac. *Mycoplasma genitalium* : nouvel agent d'IST. 31^{eme} journée du CGMMP. 6 octobre 2017. Marseille, France

C. Bébéar, B. Berçot, N. Dupin. 2017. Should we fear antibiotic resistance for STIs? 9th IAS Conference on HIV Science. 23-26 July, Paris, France.

C. Bébéar. 2017. Emergence de la résistance et impact clinique : Chlamydia, mycoplasmes et gonocoque. 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 18-19 décembre. Paris. Symposium.

C. Bébéar. 2017. Infections Sexuellement Transmissibles bactériennes : des bactéries multi-résistantes ? 37^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 18-19 décembre. Paris. Symposium.

6.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Publications nationales

A. Goubard, B. Berçot. Chapitre du Rémic *Neisseria gonorrhoeae*. Référentiel de Microbiologie médicale, 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). Sous presse.

Publications internationales

S. Pereyre, C. Laurier-Nadalié, C. Bébéar; investigator group. *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* in France: a point prevalence study in people screened for sexually transmitted diseases. *Clin Microbiol Infect*, 2017 Feb;23(2):122.e1-122.e7.

PO. Sellier, S. Maylin, B. Berçot, D. Chopin, A. Lopes, G. Simoneau, J. Evans, V. Delcey, JL. Bénifla, F. Simon, JF. Bergmann. Prospective interventional study of tenofovir in pregnancy to prevent vertical transmission of hepatitis B in highly viremic women. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2017;29(3):259-263..

M. Micaelo, A. Goubard, G. La Ruche, E. Denamur, O. Tenaillon, E. Cambau, H. Jacquier, B. Berçot. Molecular Epidemiology of Beta-lactamase Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in France *Clin Microbiol Infect*, 2017 Dec;23(12):968-973.

PO. Sellier, S. Maylin, S. Briclier, B. Berçot, A. Lopes, D. Chopin, M. Pogliaghi, AL. Munier, V. Delcey, G. Simoneau, J. Evans, E. Gordien, F. Simon, JF. Bergmann. Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country. *Liver Int*, 2017 Aug 23.

J. Leblanc, G. Hejblum, D. Costagliola, I. Durand-Zaleski, F. Lert, P. de Truchis, G. Verbeke, A. Rousseau, H. Piquet, F. Simon, D. Pateron, T. Simon, AC. Crémieux; DICI-VIH (Dépistage Infirmier Ciblé du VIH) Group. Targeted HIV Screening in Eight Emergency Departments: The DICI-VIH Cluster-Randomized Two-Period Crossover Trial. *Ann Emerg Med*, 2017 Oct 30. pii: S0196-0644(17)31660-8.

J.M. Molina, I. Charreau, C. Chidiac, G. Pialoux, E. Cua, C. Delaugerre, C. Capitant, D. Rojas-Castro, J. Fonsart, B. Berçot, C. Bébéar, L. Cotte, O. Robineau, F. Raffi, P. Charbonneau, A. Aslan, J. Chas, L. Niedbalski, B. Spire, L. Sagaon-Teyssier, D. Carette, S. L. Mestre, V. Doré, L. Meyer; ANRS IPERGAY Study Group. 2017. Post-exposure prophylaxis with doxycycline to prevent sexually transmitted infections in men who have sex with men: an open-label randomised substudy of the ANRS IPERGAY trial. *Lancet Infect Dis*. Dec 8. pii: S1473-3099.

S R. Harris, M. J. Cole, G. Spiteri, L. Sánchez-Búso, D. Golparian, S. Jacobsson, R. Goater, K. Abudahab, C. A. Yeats, B. Berçot, M. J. Borrego, B. Crowley, P. Stefanelli, F. Tripodo, J. Vazquez, D. M. Aanensen, M. Unemo, on behalf of the Euro-GASP network. European survey of *Neisseria gonorrhoeae* using whole genome sequencing identifies spread of multidrug-resistant clones and provides a foundation for genomic surveillance. *Lancet infect Dis* sous presse.

Communications nationales

A. Goubard, ML. Stehle, L. Monfort, W. Tosini, JM. Bohbot, P. Sednaoui. *Mycoplasma genitalium* : taux de positivité et symptomatologie associée. Poster P-021, RICAI 2017.

Communications internationales

N Fournet, N. Ndeikoundam, D. VirioT, A. Goubard, B. Berçot, O. Hannachi, C. Ramus, F. Lot. Increase of positivity rates of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections among men and women in France, 2001-2015 ABSTRACT ID: 1037. *European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE)*, 6-8 November 2017 Stockholm, Sweden.

T. Poncin, A. Braille, M. Agsous, F. Camelena, S. Kumanski, M. Salmona, N. Schnepf, J. Timsit, S. Fouere, B. Berçot. A novel high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolate in France, November 2017. Présentation orale (late breaker). *Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Madrid, 21-24 April 2018.

N Fournet, N. Ndeikoundam, D. VirioT, A. Goubard, B. Berçot, O. Hannachi, C. Ramus, F. Lot. Increase of positivity rates of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections among men and women in France, 2001-2015. *57th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. ATLANTA, USA, June 07-11, 2018.

Conférences sur invitations

B. Berçot. « Actualités sur les infections à gonocoque : quelles stratégies pour combattre l'émergence de la résistance » MSD Care - RPS 1701-068245 "VIH et Maladies Sexuellement Transmissibles, 28 février 2017, Nantes.

C. Bébéar, N Dupin, B. Berçot. « Should we fear antibiotic resistance for STIs? ». *9th IAS Conference on HIV Science (IAS 2017)*, 23-26 juillet 2017, Paris.

B. Berçot. Diagnosis of Sexually transmitted diseases. Cepheid symposium. *31st Congress of IUSTI-Europe on Sexually Transmitted Infections*. 31 aout-02 Septembre Helsinki, Finlande. Communication orale.

A. Goubard. Syphilis : actualités, diagnostic et conduite à tenir. Entretiens de Bichat. 2017

B. Berçot. Sharing experiences from a French community based STI centre (Paris, France) Cepheid Breakfast Symposium. Communication orale. *10th European Meeting on Molecular Diagnostics (EMMD)*, Cepheid Integrated Symposium - From Point of Care to Infinity, October 11-13, 2017 Nordwich, Pays-Bas.

B. Berçot, N Reydellet. Implantation of a decentralized lab for screening of bacterial STD (Checkpoint Paris, Paris, France). *24^{ème} séminaire technico-scientifique Brésil-France pour les IST, HIV/SIDA et hépatites virales- Epidémiologie des IST dans le contexte de la Prophylaxie Préexposition & 8^{ème} rencontres thématiques du programme de recherche de Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales (ANRS)* ; 13 et 14 novembre 2017, Rio de Janeiro, Brésil.

B. Berçot, N. Dupin, C. Bébéar. Antibiotic resistance for bacterial STIs. *24^{ème} séminaire technico-scientifique Brésil-France pour les IST, HIV/SIDA et hépatites virales- Epidémiologie des IST dans le contexte de la Prophylaxie Préexposition & 8^{ème} rencontres thématiques du programme de recherche de Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales (ANRS)* ; 13 et 14 novembre 2017, Rio de Janeiro, Brésil.

6.2.3 Laboratoire APHP Cochin

Publications internationales

L. Mikalova, M. Strouhal, J. Oppelt, P. A. Grange, M. Janier, N. Benhaddou, N. Dupin, D. Smajs. 2017. Human *Treponema pallidum* 11q/j isolate belongs to subsp. endemicum but contains two loci with a sequence in TP0548 and TP0488 similar to subsp. *pertenue* and subsp. *pallidum*, respectively. PloS Negl Trop Dis 11(3) :e0005434.

F. Hoogewoud, L. Frumholtz, P. Loubet, C. Charlier, P. Blanche, D. Lebeaux, N. Benhaddou, N. Sedira, L. Coutte, C. Vanhaecke, O. Launay, C. Le Jeune, E. Héron, D. Monnet, O. Lortholary, JA. Sahel, N. Dupin, A. Brézin, MH. Errera, S. Salah, M. Groh. 2017. Prognostic factors in syphilis uveitis. Ophthalmol 124 :1808-1816.

J. Brochard, L. Khatchatourian, P. Woaye-Hune, C. Biron, M. Lefebvre, M. Denis-Musquer, P. Grange, N. Dupin, F. Raffi. 2017. Immune reconstitution inflammatory syndrome presenting as secondary syphilis with polymorphous erythema and knee arthritis. J Eur Acad Dermatol Venereol 31 :e381-e382.

Ouvrages didactiques

N. Dupin et P. Grange. 2017. Tréponèmes pathogènes pour l'homme n°92. ESKA

Publications nationales

N. Benhaddou, P. Grange, N. Dupin. 2017. Bulletin de veille sanitaire thématique IST & VIH Réunion & Mayotte : Point sur la syphilis congénitale. BVS 35 :19-22.

Communications nationales

P. Grange, N. Dupin, N. Benhaddou. 2017. Nouvelles perspectives épidémiologiques chez *Treponema* : quand *T. pallidum endemicum* recombine avec *T. pallidum pallidum* et *T. pallidum pertenue*. Villes, Sociétés Urbaines et Syphilis en Méditerranée et au-delà (XVIe-XXIe siècles). Marseille, 25-27 octobre.

Conférences sur invitation

C. Bébéar, N. Dupin, B Berçot. « Should we fear antibiotic resistance for STIs? ». 9th IAS Conference on HIV Science (IAS 2017), 23-26 juillet 2017, Paris.

B. Berçot, N. Dupin, C. Bébéar. Antibiotic resistance for bacterial STIs. 24^{ème} séminaire technico-scientifique Brésil-France pour les IST, HIV/SIDA et hépatites virales- Epidémiologie des IST dans le contexte de la Prophylaxie Préexposition & 8^{ème} rencontres thématiques du programme de recherche de Agence Nationale de Recherche sur le VIH/SIDA et les hépatites virales (ANRS) ; 13 et 14 novembre 2017, Rio de Janeiro, Brésil.

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 Combined Prevention of Sexually Transmitted Infections (STIs) in Men Who Have Sex with Men using oral TDF/FTC for HIV Pre-Exposure Prophylaxis (PrEP)

Une étude ancillaire complémentaire de l'étude IPERGAY sera proposée dans le cadre de l'étude **Prevenir ANRS**. Cet essai Prevenir coordonné par Jean-Michel Molina prévoit une inclusion de 3000 patients et vise à observer les effets à long terme de la PrEP sur les populations très exposées et les conséquences de l'utilisation de la PrEP à 3 ans sur l'incidence du VIH en région parisienne. Il a été déposé en mars 2017 pour un début d'inclusions en septembre 2017.

Une cohorte 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 sera suivie sur 2 ans. Dans un bras, l'impact de la vaccination contre le méningocoque sera évalué sur l'émergence des portages de

gonocoque. Huit points de suivi des portages et/ou infections à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* seront effectués. Les tests de dépistage des IST bactériennes seront centralisés à St Louis dans le laboratoire de Béatrice Berçot. Au total, près de 20 000 tests seront réalisés pour le diagnostic de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*. Des PCR syphilis seront réalisées au CNR AHPH Cochin à partir des ulcères génitaux ou oraux.

Les 3 laboratoires du CNR IST bactériennes sont impliqués dans **l'investigation de la résistance à la doxycycline des agents pathogènes** dont ils ont l'expertise. Les CMI des tétracyclines et de l'azithromycine seront déterminées pour les souches isolées de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. 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 dans cette population de PRePeurs.

Ce projet aura également pour objectif l'investigation des souches de *C. trachomatis* et de gonocoque circulant chez ces patients et l'élaboration de recommandations sur la nécessité de rechercher CT/NG/MG dans les 3 sites (anus, gorge, urine) de HSH symptomatiques ou asymptomatiques. La caractérisation moléculaire des échantillons positifs à *C. trachomatis* sera réalisée par PCR et séquençage et celle des clones de gonocoques circulants dans cette population sera investiguée par le séquençage haut débit des souches.

Un financement a été déposé à l'ANRS 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 labos du CNR seront financées sur leurs budgets propres.

8.2 Projet de recherche clinique Remind, 2018-2021, Santé Publique France -

Le 11 avril 2018, Santé publique France a lancé, avec le soutien financier de l'ANRS, une intervention visant à évaluer un programme **d'incitation au dépistage répété du VIH et des autres IST auprès des HSH** sous la coordination de Delphine Rahib. Plus précisément, il s'agira (1) d'évaluer l'efficacité d'un programme d'incitation au dépistage trimestriel du VIH basé sur la construction d'une solution personnalisée, adaptable dans le temps et s'appuyant sur l'ensemble de l'offre de dépistage et les préférences des HSH ; (2) d'évaluer l'acceptabilité et la faisabilité d'un dépistage combiné du VIH, des hépatites B et C, de la syphilis, de l'infection à *Chlamydia* et l'infection à gonocoque par auto-prélèvement à domicile.

Béatrice Berçot est impliquée dans ce projet et son laboratoire centralisera les dépistages de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* pour l'Île de France. Ce travail pourra faire l'objet d'une collection explorable en travail ancillaire par le CNR des IST bactériennes. Il est déjà prévu que les échantillons positifs à *C. trachomatis* soient envoyés à Bordeaux pour typage L/non L et déterminer ainsi la prévalence des souches L versus non L dans une population tout venant d'HSH.

8.3 Laboratoire CHU de Bordeaux

8.3.1. Mycoplasmes urogénitaux

- Une étude démarrée en mars 2018 au CHU de Bordeaux, issue d'une collaboration entre le CNR des IST et le service de Maladies Infectieuses et Tropicales, vise à **comparer l'efficacité d'un traitement séquentiel associant doxycycline puis azithromycine à un traitement par azithromycine seule dans le traitement des infections rectales asymptomatiques à *M. genitalium* chez les HSH**. La prévalence de la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones dans cette population sera aussi évaluée ainsi que la caractérisation des mécanismes de résistance. Cette étude vise à inclure 120 patients HSH de plus de 18 ans présentant une infection rectale asymptomatique à *M. genitalium*. Les patients présentant un *M. genitalium* sensible aux macrolides seront répartis en deux bras de traitement (doxycycline puis azithromycine ou azithromycine seule), tandis que les patients présentant un *M. genitalium* résistant aux macrolides seront traités par moxifloxacin selon les recommandations européennes en vigueur.

- Renouvellement de la collecte nationale d'échantillons pour l'étude de la **prévalence de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones**, en élargissant la période de recueil à deux semaines pour augmenter le nombre d'échantillons reçus et la puissance statistique.

- Recueil national de souches d'*Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* pour évaluer la **prévalence de la résistance aux trois familles d'antibiotiques actives sur ces espèces**, macrolides, tétracyclines et fluoroquinolones, par

détermination des CMI. Les mécanismes de résistance des souches présentant des CMI élevées seront aussi caractérisés. Une collecte de 100 à 200 souches sera organisée en octobre 2018.

- - **Evaluation de la prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* au Togo**

Dans le cadre de cette collaboration avec Diane Descamps (APHP Bichat), la résistance aux macrolides sera recherchée sur 50 échantillons (36 écouvillons cervicaux et 34 anaux) provenant de travailleuses du sexe et 51 écouvillons rectaux d'HSH positifs à *M. genitalium*, au Togo.

B. Berçot doit également collecter les échantillons positifs à gonocoque au sein de cette collection.

- **Evaluation de la détection de *M. genitalium*, *C. trachomatis*, et *N. gonorrhoeae* dans le sperme** par la technique de transcription-mediated amplification (TMA) Aptima (Laboratoires Hologic). Cette étude vise à évaluer, pour cette technique moléculaire, les limites de détection de ces trois pathogènes urogénitaux dans le sperme et les éventuels taux d'inhibition du sperme. Cette étude devrait commencer au 2^{ème} trimestre 2018.

- Des **trousses de détection de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides** par techniques moléculaires étant actuellement en développement dans l'industrie pharmaceutique, nous espérons pouvoir évaluer leur performance en 2018 ou 2019.

8.3.2 Enquête de surveillance des infections urogénitales et étude de la sensibilité aux antibiotiques de *C. trachomatis*

- Renouvellement de la collecte nationale d'échantillons pour la **surveillance des géovars de *C. trachomatis* des infections urogénitales**.

- **Enquête rétrospective sur la distribution des géovars des infections à *C. trachomatis* en 2017 dans les DOM-TOM** (la Réunion, la Guyane, la Polynésie Française, la Martinique et la Guadeloupe).

Cette collaboration avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert) nous permettra de collecter et typer environ 400 échantillons urogénitaux, pharyngés ou anaux positifs pour *C. trachomatis*. Cette étude devrait nous permettre d'avoir une idée de la distribution des géovars de *C. trachomatis* dans les infections urogénitales et rectales dans les DOM-TOM.

B. Berçot doit également collecter les échantillons positifs à gonocoque au sein de cette collection.

- **Enquête sur la distribution des géovars des infections à *C. trachomatis* au Togo**

Dans le cadre de cette collaboration avec Diane Descamps (APHP Bichat), 50 échantillons (36 écouvillons cervicaux et 34 anaux) provenant de travailleuses du sexe et 51 écouvillons rectaux d'HSH positifs à *C. trachomatis* au Togo seront typés.

B. Berçot doit également collecter les échantillons positifs à gonocoque au sein de cette collection.

- **Etude nationale de la sensibilité aux antibiotiques de *C. trachomatis***

En nous appuyant sur les réseaux LGV et Renachla existants et sur le réseau des CHU/CH à créer, nous envisageons d'étudier au niveau national la sensibilité de *C. trachomatis* aux molécules les plus utilisées comme les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones. Le premier écueil auquel nous nous heurtons est l'absence d'isolats car notre laboratoire est un des seuls à maintenir encore en France la culture cellulaire pour l'isolement de souches. Nous envisageons de recueillir des souches en demandant à des médecins des réseaux IST répartis nationalement de prélever une personne identifiée positive par PCR et de recueillir l'échantillon en milieu de transport permettant la survie de la bactérie et de nous l'envoyer à -20°C par transporteur agréé. Vingt-cinq souches pourraient être obtenues et les CMI de la doxycycline, azithromycine et ofloxacine déterminées. Les mécanismes de résistance des souches présentant un phénotype de sensibilité diminuée aux antibiotiques pourront être étudiés grâce aux techniques de biologie moléculaire détenues au laboratoire. Par ailleurs, ces souches seront des candidates pour le séquençage du génome complet par technique NGS dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance.

- **Etude des supports génétiques de la résistance à la doxycycline *in vitro* chez *C. trachomatis***

A l'heure actuelle, la résistance aux cyclines chez *C. trachomatis* n'a pas été décrite *in vivo*. Une étude clinique portant sur la PEP par doxycycline pour prévenir les IST chez les HSH séronégatifs pour le VIH prenant un traitement antirétroviral préventif (PreP) est actuellement en cours. La prise de cette PEP par doxycycline pourrait conduire à la sélection de souches résistantes à cette classe d'antibiotiques.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à la doxycycline seront étudiés sur des mutants résistants

sélectionnés in vitro par culture cellulaire de la souche de référence L2 mise en présence de concentrations subinhibitrices de doxycycline. La caractérisation génétique des mécanismes associés à la résistance sera réalisée par PCR puis séquençage de l'ARNr 16S, cible des tétracyclines.

Cette étude fait l'objet en 2018 du projet de recherche du Master 2 de Justine Garraud.

8.3.3 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, 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 permettra de tester 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. Deux mille cinq cent 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 laboratoire en tant que principal co-investigateur réalise les tests diagnostiques CT/NG et participe à l'analyse des résultats. Les inclusions ont commencé en janvier 2016. A ce jour, 577 étudiantes ont été incluses, 291 dans le bras intervention et 286 dans le bras témoin.

8.3.2. 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 : projet Chlazidoxy

Le projet a été retenu dans le cadre du PHRC national 2016. Il s'agit d'un essai clinique randomisé ouvert, multicentrique (CHU de Bordeaux, Tours, Lille, Nantes, Marseille et Paris (APHP hôtel Dieu) coordonné par Bertille de Barbeyrac au sein du CNR IST. 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. Nous venons de recevoir l'avis favorable du CPP et de l'ANSM. Quatre cent soixante femmes 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, seront incluses, 230 dans chaque bras (bras expérimental azithromycine *versus* bras contrôle doxycycline). 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.

8.4 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

8.4.1 Evaluation de la trousse (SpeeDx, Australie) pour la détection de la résistance du gonocoque à la ciprofloxacine en 2018

- **Dans le cadre d'une enquête rétrospective sur les infections à *N. gonorrhoeae* entre mai 2017-mai 2018 dans les DOM-TOM** (la Réunion, la Guyane, la Polynésie Française, la Martinique et la Guadeloupe). Cette collaboration avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert) nous permettra de collecter 100 échantillons urogénitaux, pharyngés ou anaux positifs pour *N. gonorrhoeae*. Les échantillons seront testés pour la résistance aux quinolones par le kit SpeeDx car la prévalence de cette résistance reste inconnue pour une partie des DOMTOM. A noter que le laboratoire du CHU de Bordeaux va également typer les échantillons positifs à *C. trachomatis* en 2017 dans le même cadre.

- **Dans le cadre de l'enquête prospective Remind pour la détection de la résistance à ciprofloxacine**
Cette étude nous permettra de collecter 300 échantillons urogénitaux, pharyngés ou anaux positifs pour *N. gonorrhoeae*. Les échantillons seront testés pour la résistance aux quinolones par le kit SpeedX.
- **Dans le cadre d'une enquête sur les infections à *N. gonorrhoeae* au Togo**
Collaboration avec le Pr Diane Descamps, 50 échantillons positifs par amplification d'acides nucléiques pour la détection de l'ADN de gonocoque provenant de travailleurs du sexe au Togo seront testés pour la résistance à la ciprofloxacine avec le kit SpeedX car la prévalence de cette résistance reste inconnue au Togo. C. Bébéar doit également collecter les échantillons positifs à *C. trachomatis* et *M. genitalium* au sein de cette collection.

8.4.2 Evaluation des génotypes des souches qui circulent en Polynésie française en 2018

En 2018, nous effectuerons la caractérisation des souches de gonocoques isolées en Polynésie Française en collaboration avec Sabine Trombert et Stéphane Lastère avec une détermination des génotypes des souches par le séquençage haut débit.

8.4.3 CRC en attente de financement Etude de la clairance spontanée du portage pharyngé de *N. gonorrhoeae* chez les HSH (2019)

Il s'agit d'une étude prospective, longitudinale portant sur des HSH suivi à l'hôpital Saint Louis, Service de Maladies Infectieuses ou au CeGGID. C'est une collaboration avec Dr Pintado, infectiologie St Louis.

Aucune d'étude clinique, prospective, longitudinale n'a décrit l'histoire naturelle des infections pharyngées à gonocoque chez l'homme et en particulier chez les HSH particulièrement exposés à une contamination fréquente. Devant ce manque de donnée de la littérature et une moins bonne efficacité des antibiotiques pour les IST pharyngées liée aux résistances du gonocoque et à la diffusion des molécules, nous souhaiterions évaluer le taux de clairance spontanée et les facteurs associés à la clairance d'une infection pharyngée à gonocoques chez des patients HSH asymptomatiques. Les inclusions seront effectuées au CeGGID de St Louis et 30 patients HSH présentant un gonocoque strictement au niveau du pharynx seront suivit pendant un mois. Dans le cadre de notre CNR, les souches de gonocoques seront analysées par séquençage haut débit avec étude de leur clonalité, de leur contenu en déterminant de résistance aux antibiotiques et éventuellement leur virulence.

8.4.4 Etude de surveillance nationale : Analyse des souches de gonocoques isolées dans les réseaux communautaires, CEGGID en France métropolitaine & DOM-TOM en 2018

Sur la mandature 2017-2022, le projet est d'effectuer une comparaison et une surveillance de la clonalité et du résistome des souches de gonocoques isolées dans les réseaux communautaires, dans le réseau des CeGGID ainsi que dans l'île de La Réunion chez les patients HSH ou hétérosexuels.

En 2017, nous avons coordonné en concertation avec le laboratoire du CHU de Bordeaux une 1^{ère} étude de surveillance nationale des infections à gonocoques avec nos collègues de la collégiale de Bactériologie qui ont participé massivement (70 centres). Les résultats sont en cours d'analyse mais rapportent un large screening par amplification d'acides nucléiques et peu de souches isolées en culture.

Dans le cadre de ce réseau, nous souhaitons investiguer 20 souches consécutives de gonocoque par séquençage haut débit isolés en 2018 dans les différents centres participants à ce réseau ainsi que dans les DOM-TOM afin d'avoir une couverture nationale des clones circulants en France.

8.4.5 Analyse par séquençage haut débit afin d'appréhender la résistance et clonalité des souches circulantes

Dans les réseaux

- 400 souches dans le réseau communautaire (Renago)
- 400 souches dans le réseau CHU & DOM-TOM
- 110 souches choisies par Santé Publique France pour la surveillance Européenne ECDC (TESSy)

Chez les patients HSH

- 300 souches patients sous PrEP en France (Prevenir, ANRS, soumis)
- Souches de patients HSH et travailleuses du sexe au Togo
- Etude de la clearance spontanée du portage du gonocoque dans la gorge
- Impact de la vaccination méningocoque universel Bexsero sur la réduction des infections à gonocoques

8.5 Laboratoire APHP Cochin

- Dans le cadre de "l'Etude GENOSYPH", poursuite de la récupération d'échantillons sanguins et d'écouvillonnages sur la région parisienne et d'écouvillonnages seulement sur l'ensemble du territoire français.
- Poursuite de la collecte des LCR et tests par amplification et VDRL.
- Evaluation des différentes techniques de diagnostic microbiologique, sérologiques et morphologiques dans le cadre de la syphilis congénitale.
- Investigation des cas de syphilis congénitale reçus au CNR, évaluation de la place de la PCR couplée à l'IHC pour l'aide au diagnostic.
- Poursuite de l'analyse systématique des échantillons en PCR-RFLP ARNr 23S pour la détection de la résistance à l'azithromycine.
- Mise en place de tests moléculaires pour l'identification de marqueurs génétiques de la résistance à la doxycycline. Dans le cadre de l'étude d'efficacité d'une prophylaxie post-exposition (PEP) à la doxycycline mise en place par le Pr. Molina à Saint-Louis, nous allons élaborer les tests moléculaires pour la surveillance des mutations génétiques responsables d'une résistance. A cet effet, le laboratoire associé syphilis recrutera un stagiaire M2 dédié à cette évaluation.
- Evaluation du test de PCR multiplex Allplex Genital ulcer Assay (Seegene) commercialisé par Eurobio qui amplifie simultanément HSV-1 et 2, *H. ducreyi*, CMV, LGV, *T. pallidum*, VZV.
- Poursuite de la démarche d'accréditation.

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^{er} 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. 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.

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.

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.

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, monitrice d'études.....ETP 1*

- Elodie Ladevèze.....ETP 1*

- Marie Gardette, ingénieur CHU.....ETP 0,25

- Nadège Hémin, technicien UBx.....ETP 0,5

- Angélique Alonso, technicien projet i-PREDICT.....ETP 1

- Brigitte Couderc, secrétaire UBx.....ETP 0,1

*Personnel rémunéré par la subvention ANSP

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 et IAF, laboratoire associé

Département des Agents Infectieux

GH Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (GH SLS-LRB-FW)

Site Hôpital St Louis

Dr Béatrice Berçot, responsable de l'UF de Bactériologie Site St Louis

1, avenue Claude Velfaux

Tél : 01.42.38.56.09

Secrétariat : 01.42.49.94.93

Fax : 01.42.49.92.00

Responsable scientifique : Dr Béatrice Berçot

Tél : 33.1.42.38 56 09 - Fax : 01.42.49.92.00

email : beatrice.bercot@aphp.fr

Le laboratoire associé « gonocoques » est hébergé par le GH SLS-LRB-FW et une convention de travail est signée entre les directions du GH SLS-LRB-FW et l'Institut Fournier.

Convention avec l'Institut Alfred Fournier, Docteur Agathe Goubard

Laboratoire de Bactériologie

25 bd Saint Jacques

75014 Paris

Tél.: 01.40.78.26.00 (standard)

Tél.: 01.40.78.26.12 (secrétariat)

Fax : 01.40.88.33.28

Responsable administratif : Florent Bousquié

Directeur de l'hôpital St Louis

Assisté de Madame Juliette de Corbiere

Direction des Finances et du Contrôle de Gestion

Tél : 01.42.38.51.20

Mail : juliette.decorbiere@aphp.fr

Organigramme du laboratoire associé « gonocoques »

Département des Agents Infectieux, GH SLS-LRB-FW-Institut Fournier

IAME équipe 2-UMR 1137 INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord

Sorbonne Paris Cité

Béatrice Berçot (MCU-PH) – Directrice du laboratoire associé au CNR des ISTs bactériennes pour l'expertise gonocoqueETP 0,35

- Agathe Goubard (Biologiste) – Directrice associée – Institut Fournier
CMI, réseau Rénaço.....ETP 0,25
- Hervé Jacquier (MCU-PH)
Phylogénétique, traitement des données de bioinformatiques.....ETP 0,15
- Francois Camelena (PHC).....ETP 0,30
- Myriem Agsous (PHC).....ETP 0,10

Ingénieurs, techniciens et personnels administratifs

- Aymeric Braille, ingénieur junior.....ETP 1 *
- Clotilde Monin, technicienne.....ETP 1 *

- Manel Merimèche, bioinformaticienne	ETP 1 *
- Nathalie Schnepf, ingénieur qualité.....	ETP 0,3 *
- Aurore Damiot, technicienne.....	ETP 0.2
- Catherine Sevin, technicienne.....	ETP 0.2
- Patricia Fernandes, technicienne.....	ETP 0.2
- Cedric Moreau, technicienne.....	ETP 0.2
- Thibaut Poncin, étudiant en master 2, stagiaire gratifié.....	ETP 0.5 *
- Caroline Cazaux, secrétaire.....	ETP 0,10

*Personnel rémunéré par la subvention SPF & MIGAG

1.2.3 Laboratoire APHP Cochin, laboratoire associé

U1016, Laboratoire de Dermatologie

Groupe Hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca (APHP)

Bâtiment Gustave Roussy

Etage 4, porte 405

27, rue du Faubourg Saint-Jacques

75014 Paris

Tél. : +33 (0) 1 44 41 25 60 (laboratoire)

Fax : +33 (0) 1 58 41 29 83 (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 Nadjat Benhaddou

Tél. : +33 (0) 1 58 41 27 88

Fax : +33 (0) 1 58 41 15 48

Email : nadjat.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
Nadjat 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 candidat concernant *C. trachomatis* et les mycoplasmes urogénitaux pour le CNR IST bactériennes seront 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 (cf organigramme ci-dessus).

Le laboratoire candidat bénéficiera 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 m² avec 1 poste de sécurité microbiologique (PSM) classe 2, 1 étuve à CO₂, 1 réfrigérateur-congélateur, 1 centrifugeuse thermostatée pour la culture cellulaire de *C. trachomatis*, 1 microscope inversé et 1 pièce de 15,25 m² pour la culture des mycoplasmes avec 2 PSM classe 2, 2 étuves à CO₂, 2 réfrigérateurs-congélateurs à -20°C
- Laverie-stérilisation du plateau Microbiologie-Immunologie du CHU de Bordeaux : 30,5 m²
- 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 : Panther (Hologic) pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* d'Hologic.
- Amplificateur Light Cycler 1.5, format capillaire, Roche
- 3 Amplificateurs Light Cycler 480, version 96, Roche
- Smart cyclor (Cepheid)
- Extracteurs d'acides nucléiques MagNaPure 96 (Roche), Compac (Roche)
- Automate de sérologie pour Elisa, Eti-Max (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
- 1 spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) (*M. hominis* et *Ureaplasma* spp.)

Locaux (560 m²) 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 électroporteur (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 (Getinge), 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 CO₂ (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'Eurofins pour séquençage Sanger et analyse MLVA

1.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

Fin 2017, le CNR a été transféré sur le site de St 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 du GH SLS-LRB-FW à Paris X (plateaux techniques Microbiologie et Biologie Moléculaire, GH SLS-LRB-FW) et dans ceux de l'Institut Fournier, Paris XIV. 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 candidat bénéficie du matériel bureautique (téléphones, fax, ordinateurs, photocopieurs, scanners, réseau internet) des infrastructures du GH SLS-LRB-FW, de l'Université et de l'Institut Fournier qui l'hébergent.

Locaux hospitaliers site Saint Louis et principaux équipements

Techniques culturales en Bactériologie :

L'ensemble des locaux du laboratoire de Microbiologie du GH SLS-LRB-FW est situé au 1^{er} étage du bâtiment principal de l'hôpital St Louis (surface d'environ 1000 m²).

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 CO₂
- Équipement complet de Bactériologie : centrifugeuses, colorateurs, microscopes
- Identification par spectrométrie de masse Vitek MS (Biomérieux)
- Équipement 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)
- 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 (site St Louis)

Locaux

- Une pièce de 10 m² est consacrée aux extractions manuelles pour le séquençage haut débit
- Une pièce de 12 m² contenant 2 réfrigérateurs-congélateurs est consacrée aux préparations des mix de PCR
- Une pièce de 12 m² contenant 2 réfrigérateurs-congélateurs est consacrée aux dépôts des acides nucléiques
- Une pièce de 25 m² accueille l'automate d'extraction m2000 (Abbott)
- Une pièce de 20 m² accueille l'automate d'extraction et amplification intégré Cobas 6800 (Roche)
- Une pièce de 30 m² 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 (Cepheid) 16 places, 1 Cobas 6800 (Roche)

Autres automates : un eplex 12 places, un torch 10 places (Biomérieux), un Filmarray (Biomérieux)

Extraction :

- Beat beaters
- Extracteurs automatiques d'acide nucléique ARN/ADN : 3 Qiasymphony RGQ (Qiagen), 1 esayMag (Biomérieux), 3 m2000sp (Abbott), 1 Magnapure (Roche Diagnostic), 1 Nordiag (Diasorin), Acquisition de 2 Emag (Biomérieux) (fin 2018)
- 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 électroporteur 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 situé sur le site de St Louis

Analyse de séquence :

- Accès plateforme Mage et Galaxie
- Les outils utilisés pour l'analyse après assemblage des séquences sont les logiciels installés sur la plateforme Galaxie : Velvet, Spade, ParSNP, Mafft (alignement core SNPs avec MUSCLE + calcul arbre avec FASTTTREE en maximum likelihood) visualisé avec iTOL, RAxML

Locaux Institut Alfred Fournier et principaux équipements

Les locaux de l'IAF sont répartis sur environ 300 m², hors salles de prélèvements, incluant un espace dédié au CNR situé dans le laboratoire de microbiologie de l'IAF. Le laboratoire comprend :

- des PSM, incubateurs (30 et 37°C) et CO₂
- l'équipement complet de Bactériologie : centrifugeuses, colorateurs, microscopes,
- lecture antibiogrammes en milieu solide avec lecteur automatisé d'antibiogrammes en diffusion de type SIRSCAN (i2A)
- 1 spectromètre de masse (Microflex® Bruker)
- 2 congélateurs à très basse température (-80°C), (conservation en double des souches de gonocoques)
- Matériel informatique (dont 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...)
- 1 plateforme (extracteur automatisé et amplification en PCR temps réel) pour la détection *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (Panther® Hologic)
- 2 pièces confinées pour la biologie moléculaire, un local pour la réception et l'enregistrement des souches et une laverie pour la stérilisation du matériel non jetable

Sont aussi utilisés par le CNR deux pièces confinées pour la biologie moléculaire, un local pour la réception et l'enregistrement des souches et une laverie pour la stérilisation du matériel non jetable.

1.3.3 Laboratoire Cochin

Le laboratoire de Dermatologie qui fait partie de l'U1016 de l'équipe du Pr. Batteux « Stress oxydant, inflammation et prolifération cellulaire » sur le site de l'hôpital Cochin au 4^{ème} étage dans le Pavillon Gustave Roussy héberge le CNR syphilis.

Ces locaux représentent environ 70 m² de surface de travail avec la mise en service d'un laboratoire de niveau 2 et pouvant être utilisé par le CNR syphilis (voir schéma plan ci-dessous).

Le laboratoire de Dermatologie qui héberge le CNR est divisé en 4 modules :

Equipements propre au laboratoire de Dermatologie

Le module L2 qui fait partie de la zone de pré-amplification, contient 2 hottes à flux laminaire avec niveau de protection L2 (PSM) dont un est dédiée pour le CNR syphilis et identifiée comme telle ; 2 incubateurs CO₂, réfrigérateur-congélateur, un microscope inversé, des centrifugeuses haute et faible vitesse, un bain marie. C'est dans ce module que les échantillons pour le CNR syphilis sont réceptionnés, identifiés, aliquotés et traités pour l'extraction de l'ADN.

Un module biochimie / biologie moléculaire qui fait partie de la zone de pré-amplification avec réfrigérateurs et congélateurs (-20°C), appareils d'électrophorèse et de transferts (Hoeffer system, Pharmacia) ; système IPGphore d'isoélectrophorèse pour 1^{ère} dimension (Pharmacia); appareil de chromatographie pression atmosphérique (Bio-Rad) et FPLC (Pharmacia); un lecteur pour plaques 96 puits (MR5000 Dynatech), et de nombreux appareils d'utilisation courante dans un laboratoire.

Dans cette pièce nous avons individualisé une zone 1 dite « propre » de préparation des tubes (numérotation, disposition sur rack), une zone 2 de préparation du mix avec pipettes dédiées et une zone 3, avec une mini hotte PCR et petit matériel dédié, où le mélange du mix de PCR avec l'ADN à amplifier est effectué.

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). Il possède des congélateurs et réfrigérateurs (-20°C, -80°C) dont certains sont dédié pour le CNR et identifiés comme tel. 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) 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).
- Spectrofluorimètre Fusion (PackardBell, Paris, France) pour la mesure du stress oxydatif
- Animalerie pour la mise en place du modèle animal pour la production de *T. pallidum*
- Laboratoire de niveau de protection 2 pour la réception et le traitement des échantillons.

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^{er} 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^{er} avril 2017 et le 31 décembre 2017 :

- 498 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* dont 79 issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance réalisée semaine 46 en 2017.
- 113 souches d'*Ureaplasma* spp. et 14 souches de *M. hominis*.
- 2099 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV.
- 1014 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre de l'enquête nationale de prévalence des infections urogénitales, réalisée semaine 46 en 2017.
- 66 souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux.

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 Mycoplasmaology (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 et IAF

Matériel biologique stocké au sein du GH St Louis -Lariboisière-Fernand Widal entre le 1^{er} avril et le 31 décembre 2017 :

- 392 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2017 dont 119 souches pour typage dans le cadre des données transmises à l'ECDC via TESSy.
- 8 souches de gonocoques et 70 prélèvements cliniques recueillis dans l'étude ancillaire ANRS menée par le Pr Molina (étude IPERGAY).
- 25 souches et 268 échantillons biologiques positifs à *N. gonorrhoeae* issus de l'enquête nationale de prévalence de la résistance réalisée semaine 49 en 2017.

Les souches et les souches de référence sont conservées en double exemplaire dans des congélateurs différents au laboratoire de Bactériologie. Les autres souches ou échantillons cliniques ont été conservés au laboratoire de l'IAF.

A partir du 1^{er} avril 2018, les souches isolées dans le cadre du réseau Renago seront transférées par périodes régulières de 3 mois afin de favoriser le séquençage haut débit des souches de manière régulière. En ce qui concerne la collection antérieure, elle sera transférée progressivement avec les fichiers correspondants depuis l'IAF vers l'hôpital St Louis et stockée 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 2006-2017, le CNR IST LA syphilis a reçu 808 échantillons positifs pour l'ADN de souches de *T. pallidum*. Nous disposons également de 440 immun-sérums répertoriés.

Collection souches CNR IST LA Syphilis (2006 - 2017)							
LCR	Placenta	Liq. Am	Cordon	Sg cordon	Ecouvillon	Biopsie	Sg total
67	11	5	6	2	653	42	22

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 depuis un an 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. La plupart des 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.

Nous souhaitons recruter un technicien qualité pour l'activité *C. trachomatis*, mycoplasmes urogénitaux que nous pourrions partager avec le CNR Campylobacter-Helicobacter hébergé dans le même laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux, qui souhaite également en recruter un.

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 CHU de Bordeaux, au contrôle de qualité externe européen (*Quality Control in Molecular Diagnostics* ou QCMD) concernant la détection moléculaire de *C. trachomatis*. Depuis 2014, nous réalisons des échanges inter-laboratoire avec les laboratoires Biomnis pour la détection de *M. genitalium* par PCR en temps réel dans des échantillons cliniques.

1.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

*Accréditation

Site St Louis

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 *m2000* dans le laboratoire. Le transfert de la technologie a été effectué en avril 2018 sur Cobas 6800 avec un travail d'accréditation de la technique de *M. genitalium* en cours.

Site IAF

Pour répondre à la norme ISO 15189, le laboratoire de l'IAF est entré dans la démarche d'accréditation en 2010 par la voie Bioqualité. Le laboratoire est accrédité Cofrac à hauteur de 57% des analyses qu'il effectue. Pour augmenter la traçabilité de ses activités, le laboratoire est équipé d'un module de Bactériologie sans papier et d'un module « workflow ». Ces modules, intégrés au système informatique du laboratoire, permettent de tracer précisément toutes les étapes de l'analyse bactériologique, de la réception de l'échantillon au rendu des résultats. Pour chaque prélèvement, y compris les souches de gonocoques, les milieuxensemencés sont prédéfinis et toutes les étapes de l'analyse microbiologique sont préétablies dans le logiciel. Toutes ces étapes sont ainsi tracées et standardisées. Par ailleurs, la traçabilité des lots de réactifs en circulation dans le laboratoire est assurée par une gestion informatisée des stocks dans le logiciel qualité Kalilab et dans le lecteur SirScan.

*Contrôle intra-laboratoire

Site St Louis : 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.

Site IAF : Pour la Microbiologie, le laboratoire a mis en place des contrôles internes de qualité (CQI) avec des souches de gonocoques (ATCC et WHO). Le laboratoire participe au programme d'évaluation Biologie Prospective, qui prévoit 4 contrôles par an et au contrôle qualité annuel de l'ANSM. Ces contrôles permettent de s'assurer de la qualité des résultats de spectrométrie de masse, de la recherche de pénicillinase (par technique chromogénique en disque), des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé (disques et bandelettes E-tests) et de l'amplification génique.

*Contrôles de qualité externes supranationaux

Le laboratoire associé gonocoque participe à un contrôle de qualité externe (CQE) quadri-annuel, 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- *UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (UK NEQAS) for genital pathogens: (4/an)*

Deux échantillons humains prélevés dans un contexte d'IST sont testés pour la recherche de *N. gonorrhoeae*. Les résultats des contrôles sont basés sur :

- la détection et l'identification de *N. gonorrhoeae* dans un échantillon
- l'antibiogramme S/I/R pour un panel d'antibiotiques à tester

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

Cinq 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 biannuelle, les CMI des 8 antibiotiques de référence (ci-dessus) d'une série de 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 toute l'équipe 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 détectant *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* sur l'automate Panther, Hologic (amplification médiée par la transcription ou TMA, kit Aptima Combo 2 for CT/NG).

- Détection de tous les génotypes : 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 génotype 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 génotype 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 Eti-Max (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 génotype 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-génotype 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 TMA est réalisé avec le kit commercialisé Aptima *Mycoplasma genitalium* sur la plateforme Panther (Hologic).
- 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 et IAF

Les deux sites sont équipés 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* sur la plateforme extracteur-amplificateur automatisé m2000sp (Abbott)
 - Kit commercialisé marqué CE-IVD détectant *C. trachomatis* / *N. gonorrhoeae* / *M. genitalium* sur la plateforme extracteur-amplificateur automatisé et Cobas 6800 (Roche) en mai 2018
 - Kit CT/NG Xpert (Cepheid) détectant *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*
 - Kit commercialisé marqué CE-IVD Aptima combo2 détectant *C. trachomatis* / *N. gonorrhoeae* / *M. genitalium* sur la plateforme Panther® Hologic, site Fournier

- Techniques d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

Le CNR pratique sur chaque souche reçue un antibiogramme par diffusion et une étude de 6 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 février 2018 : <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*, *adk*, *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*.

- 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_{TEM}*
- 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*
- Pyrosequençage 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 TAAN 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 (de Curraize C, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(11):6962-6964)

- Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles

Les laboratoires du GH St Louis et de l'IAF disposent de 10 souches de gonocoque de référence de l'OMS (WHO A → Q). 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. Le laboratoire de l'IAF conserve toutes les souches du réseau Rénago reçues par le CNG depuis 1986 et qui ont pu être remises en culture. Ces souches sont conservées en microbilles à -80°C en duplicate, dans deux congélateurs distincts.

2.1.3 Laboratoire APHP Cochin

- Tous les tests sérologiques utilisés dans le cadre du diagnostic de la syphilis :

Test non tréponémiques : VDRL, RPR (BioRad)	Accrédité
Test tréponémiques : TPHA (BioRad)	Accrédité
ELISA Ig totaux (Architect)	Accrédité
Immunoblot (IgG/IgM Ingen)	Accrédité

- Détection du génome de *T. pallidum* par 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).