

Centre National de Référence des Infections Sexuellement Transmissibles bactériennes



Rapport annuel d'activités 2018

Pr Cécile Bébéar, CHU de Bordeaux

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

Pr 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 3044 échantillons en 2018 (dont 3309 d'origine anorectale) dont la majorité provient d'hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH). Le nombre de cas de LGV en 2018 est de 711, soit une augmentation de 51,6% par rapport à 2017 (469 cas). Les cas de LGV se retrouvent toujours majoritairement à Paris.

En 2018, le nombre de cas d'anorectites à souches non L a augmenté de 89% passant de 1150 cas en 2017 à 2178 cas en 2018. Quatre génotypes dominent dans l'ordre D/Da > G > E > J. Cette augmentation est due à la surveillance accrue des HSH sous PrEP (Prophylaxie Pré-Exposition) situés principalement à Paris, qui représentent 48,4% des anorectites à souches non L chez les sujets VIH-négatif. La surveillance de cette population spécifique VIH-négative asymptomatique au sein du réseau en 2017 et 2018 n'a pas montré plus de cas de LGV dans cette population que chez les sujets VIH négatifs et asymptomatiques ne bénéficiant pas de la PrEP.

Nous avons mené une enquête de surveillance en 2017 et en 2018 pour évaluer la répartition des **génotypes de *C. trachomatis* dans les infections urogénitales dans les régions d'Outre-Mer**, en collaboration avec le laboratoire CERBA et les collègues des DROM. Quatre-cent-quarante-six et 847 échantillons *C. trachomatis*-positif ont été collectés pour génotypage en 2017 et 2018. Une forte prévalence du génotype E est retrouvée avec des disparités suivant les territoires, mais sans différence statistiquement significative.

2. infections à mycoplasmes urogénitaux

Le CNR IST a évalué la **résistance de *Ureaplasma* spp. et *Mycoplasma hominis* à 7 antibiotiques en France en 2018**. Sur les 325 échantillons positifs collectés sur un mois en automne 2018, 131 souches (40%) ont été obtenues en culture. Cinq pour cent des 20 souches de *M. hominis* étaient résistantes à la tétracycline et aucune souche n'était résistante aux fluoroquinolones ou à la clindamycine. Pour les 111 souches de *Ureaplasma* spp., la prévalence de la résistance était de 2,7% pour les tétracyclines et 5,4% pour la lévofloxacine ; aucune souche n'était résistante à la moxifloxacine ou à l'érythromycine. La résistance aux tétracyclines était toujours liée à la présence du gène *tet(M)*.

Nous avons mené une enquête de surveillance, sur un mois en automne 2018, pour évaluer la **résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones**. Trois-cent-trente-neuf échantillons *M. genitalium*-positifs provenant de 335 patients différents ont été envoyés par 20 laboratoires **français métropolitains**. Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **43% (116/270) étaient résistants aux macrolides** avec dans 71,5% des cas les mutations A2058/2059G. **Pour les fluoroquinolones, 17,9% (47/262) des patients étaient résistants** à ces antibiotiques avec une mutation *parC*. La résistance aux macrolides est stable par rapport à 2017, en revanche la résistance aux fluoroquinolones a plus que doublé (7,5% en 2017).

Nous avons également mené la même enquête **dans les DROM** durant 3 mois à l'automne 2018. Deux-cent-quatre-vingt-sept échantillons *M. genitalium*-positifs provenant de 287 patients différents ont été envoyés par 6 laboratoires de 5 territoires. Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, seulement **5,9% (14/235) étaient résistants aux macrolides**. On note **une différence significative** entre le taux de résistance en France métropolitaine (43%) et celui des territoires d'Outre-Mer. La résistance aux fluoroquinolones est en cours d'investigation.

Le CNR a participé à l'étude des **infections à *M. genitalium* chez les HSH sous PrEP de l'essai ANRS IPERGAY**. Une forte prévalence de l'infection à *M. genitalium* était observée dans cette population (10,5%), les sites urinaires et anaux étant les plus infectés. Les souches de *M. genitalium* chez ces HSH sous PrEP étaient résistantes à l'azithromycine dans 69,6% des cas et à la moxifloxacine dans 14,8%. La prophylaxie post-exposition par doxycycline n'avait pas d'impact sur l'incidence des infections à *M. genitalium* dans notre étude.

Laboratoire APHP Saint-Louis

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 inclus parmi les 12 bactéries prioritaires à surveiller d'après les recommandations de l'OMS. Dans le cadre du réseau de surveillance communautaire Renago et de l'enquête Ngon 2018, le CNR IST bactérienne a évalué la résistance de 467 souches de gonocoques à 6 antibiotiques. Par ailleurs, en l'absence de souches suffisamment disponibles pour les DROM, nous avons exploré les prélèvements cliniques.

En France métropolitaine, la résistance aux C3G est faible (0,3% au céfixime) et aucune souche résistante à la ceftriaxone n'a été observée. Cependant, les résistances du gonocoque augmentent aux fluoroquinolones (47% à 55%) et à l'azithromycine (6,5% à 17,3%) par rapport aux chiffres de 2017 qui étaient de 37% et 5,5%, respectivement. La résistance aux tétracyclines diminue (47,3% à 63,8%) vs 65% en 2017, ce qui pourrait correspondre à une diminution des souches de bas niveau de résistance car les souches de haut niveau de résistance sont plus nombreuses qu'en 2017. Ces résultats préliminaires restent à consolider par l'étude des CMI lors de l'enquête Ngon2018 en cours. Parmi cette population, 101 souches ont été explorées pour leur clonalité par l'extraction du NG-MAST *in silico* par séquençage haut débit des souches. Le ST2 était le plus prévalent en 2018 (6,4%), suivi du ST5793 et ST11461 (4,5%), puis le ST5441 et ST13113 (3,6%). Le ST1407 n'était pas retrouvé et une quantité importante de ST restaient non répertoriés dans les bases de données (23,6%). Contrairement à 2017, on observe une diversification importante des souches sur le territoire et l'absence d'un ST prédominant dans le réseau étudié.

En collaboration avec Pasteur Cerba et les collègues des DROM, une **prévalence des infections à gonocoque dans les DROM** a été évaluée à partir données provenant des isolats positifs en PCR par rapport aux isolats reçus pour le diagnostic d'infections à gonocoque. On note une prévalence de à 6,4% avec un intervalle variant de 3,2% à 8,8%. Les études moléculaires à partir des prélèvements mettent en évidence une résistance aux fluoroquinolones qui varie de 0 à 41% dans les DROM [0% Polynésie Française, 24% en Guadeloupe et 41% en Guyane] et l'existence de souches de sensibilité diminuée aux C3G en Guyane (5,8%), Guadeloupe (11%) et surtout en Martinique (55,5%). Une étude plus importante sur les souches cliniques est nécessaire afin de confirmer ces résultats et d'analyser les clones circulants.

En collaboration avec Santé Publique France, **l'analyse de 180 souches de gonocoques résistants aux céphalosporines de 3^{ème} génération par séquençage haut débit** couplée aux données cliniques met en évidence un changement dans la structure des populations de gonocoques de sensibilité diminuée en France sur la période 2008-2016. On observe une diminution du génogroupe G1407 et MLST1901 associé à une population masculine (clade I). La diminution du clade I et l'apparition d'un nouveau clade II est observée à partir de 2014 et ce clade II est lié au MLST7363. Les souches de ce clade présentent des CMI à l'azithromycine et à la ceftriaxone plus basses ($p < 0.001$) avec une association à une population plus mixte homme/femme.

L'année 2018 a permis la consolidation de l'analyse du génome du gonocoque est maintenant standardisée avec un **pipeline stocké sur la plateforme Galaxie de l'APHP**.

Laboratoire APHP Cochlin

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 pour la 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

- **883 demandes d'expertises correspondant à 1594 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 2018.
- **38 prélèvements provenant de 138 patients suspectés de syphilis dans le cadre de l'étude GENOSYPH** ont été répertoriés et analysés.
- **86,4% des souches de *T. pallidum* en provenance de France présentent la mutation A2058G** sur le gène de l'ARNr 23S pour la résistance aux macrolides.

- **100% des souches de *T. pallidum* en provenance de la Réunion présentent la mutation A2058G** sur le gène de l'ARNr 23S pour la résistance aux macrolides.
- **76 prélèvements périnataux analysés**, 9 étaient positifs en nPCR.
- **Evaluation de 6 tests tréponémiques sérologiques** (Elisa, CLIA, CMIA).
- **Evaluation d'une trousse PCR multiplexe pour les ulcérations génitales.**

2. Alerte

- **333 LCR ont été analysés**, 30 étaient positifs par nPCR et/ou VDRL.
- **9 alertes syphilis congénitale ont été déclenchées auprès de l'ANSP.**

Summary

Laboratory from Bordeaux University Hospital

1. *Chlamydia trachomatis* infections

Among the **Lymphogranuloma venereum (LGV) surveillance network**, 3344 samples including 3309 rectal samples were received and typed by the CNR in 2018. Most of them were obtained from men who have sex with men (MSM). There were 711 LGV episodes in 2018 with a significant increase of 51.6% in comparison to the number of LGV cases reported in 2017 (469). Most of the LGV cases were described in Paris, France.

A total of 2178 **non-LGV anorectal infections** were reported in 2018, with a sharp increase of 89% between 2017 and 2018. 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); 48.4% of non-LGV anorectal infections in HIV-negative subjects were in PrEP patients. The monitoring of this HIV-negative and asymptomatic population under PrEP did not reveal more LGV cases than the HIV-negative and asymptomatic population without PrEP.

To evaluate the genovar repartition of ***C. trachomatis* among urogenital infections in overseas departments and territories**, 446 and 847 *C. trachomatis*-positive specimens were collected for genotyping in 2017 and 2018, respectively. Data showed a high prevalence of genovar E, with different genovar repartition according to the territory, but without any statistically significant difference.

2. Urogenital mycoplasmal infections

The CNR investigated the **susceptibility of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* to tetracyclines and fluoroquinolones in France in 2018**. Among 325 *Ureaplasma* spp. and/or *M. hominis*-positive specimens collected during one month, 131 strains (40%) were re-grown at the CNR. Five percent of the 20 *M. hominis* isolates, were tetracycline-resistant and none strain was resistant to fluoroquinolones or clindamycin. For the 111 *Ureaplasma* isolates, resistance rates were 2.7% for tetracycline and 5.4% for levofloxacin; none strain was resistant to moxifloxacin or erythromycin. The *tet(M)* gene was found in all tetracycline-resistant isolates.

A **national prevalence survey** was conducted during one month in fall 2018, to evaluate **macrolide and fluoroquinolone resistance in *M. genitalium***. 339 *M. genitalium*-positive samples obtained from 335 patients were collected from 20 laboratories from continental France. Among patients for which amplification was obtained, **43% (116/270) harbored a macrolide-resistant *M. genitalium*** (mutations A2059/2058G in 71.5% cases). **For fluoroquinolones, 17.9% (47/262) patients harbored a resistant *parC*-mutated *M. genitalium***. The macrolide resistance was stable in comparison to 2017, however the fluoroquinolone resistance was significantly higher than in 2017 (7.5%).

We also conducted a similar survey on *M. genitalium* antibiotic resistance in overseas departments and territories during 3 months in fall 2018. 287 *M. genitalium*-positive samples obtained from 287 patients were collected from 6 laboratories from 5 overseas departments or territories. Among patients for which amplification was obtained, **only 5.9% (14/235) harbored a macrolide-resistant *M. genitalium***, highlighting the significant difference between the macrolide resistant rates in continental France vs in overseas departments and territories. Analysis for fluoroquinolone resistance is ongoing.

The CNR participated to the study of ***M. genitalium* infections in MSM enrolled in the open-label phase of the ANRS IPERGAY trial** with on demand TDF/FTC for HIV prevention. A high prevalence of *M. genitalium* infection among MSM on PrEP was observed (10.5%), with infection mainly observed in urine or anus, as previously reported. *M. genitalium* isolates found in MSM on PrEP were highly resistant to azithromycin (69.6%) and to moxifloxacin (14.8%). Post-exposure prophylaxis with doxycycline had no impact on the incidence of *M. genitalium* infections in our study.

Laboratory from APHP Saint-Louis

Monitoring of gonococcal resistance to 3rd generation cephalosporins (C3G) is essential because C3G- and fluoroquinolone-resistant gonococci have been included among the 12 priority bacteria to be monitored based on recommendations of WHO. As part of the Renago community monitoring network and the Ngon 2018 survey, the bacterial National Reference Center for STI evaluated the resistance of 467 gonococcal strains to 6 antibiotics. In addition, in the absence of sufficient strains available for **overseas departments and territories**, we explored clinical samples.

In continental France, resistance to C3G was low [0.3% in cefixime] and no ceftriaxone-resistant strain was observed. However, resistance to fluoroquinolones (47% to 55%) and to azithromycin (6.5% to 17.3%) increased in comparison to the 2017 rates, 37% and 5.5%, respectively. Resistance to tetracycline decreased (47.3% to 63.8%) vs 65% in 2017, which may be a decrease in low-resistance strains because high-resistance strains were more frequent than in 2017. These preliminary results remain to be with the MIC data that will be explored by the current Ngon2018 survey. Of this population, 101 strains were explored for their clonality by the extraction of NG-MAST *in silico* by high-throughput sequencing of the strain genomes. Sequence Type (ST) ST2 was the most prevalent in 2018 (6.4%), followed by ST5793 and ST11461 (4.5%), then ST5441 and ST13113 (3.6%). ST1407 was not found and a significant amount of ST remained unlisted in the databases (23.6%). In contrast to 2017, a significant diversity of isolates was observed in the territory with the lack of a predominant ST in the study network.

In collaboration with Pasteur Cerba and colleagues in the DROM, the **prevalence of gonococcal infections in DROM** was evaluated from data from positive PCR isolates compared with isolates received for diagnosis of gonococcal infections. There was a prevalence of 6.4% with an interval ranging from 3.2% to 8.8%. Molecular studies on samples showed resistance to fluoroquinolones, which ranged from 0 to 41% in DROM (0% French Polynesia, 24% in Guadeloupe and 41% in Guyana) and the presence of strains with decreased susceptibility to C3G in Guyana (5.8%), Guadeloupe (11%) and especially in Martinique (55.5%). A more extensive study of clinical strains is required to confirm these results and to analyze circulating clones.

In collaboration with Public Health France, the **analysis of 180 strains of gonococcus resistant to C3G explored by high-throughput sequencing** coupled with clinical data highlights a change in the structure of populations of decreased sensitivity gonococci in France over the period 2008-2016. A decrease in the genogroup G1407 and MLST1901 associated with a male population (clade I) was observed. The decrease in clade I and the emergence of a new clade, clade II, has been observed from 2014 and is related to MLST7363. Clade II strains present lower MICs to azithromycin and to ceftriaxone ($p < 0.001$) with an association with a more mixed male/female population.

The year 2018 has allowed the consolidation of exploration of gonococci genomes that is now standardized with a **pipeline stored on the Galaxy Platform of the APHP**.

Laboratory from APHP Cochon

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 *Treponema pallidum* and serology as part of a diagnostic aid.

1. Expertise

- **883 requests for expertise corresponding to 1594 analyzes** of samples of patients consulting in the CeGGID and STI services of Metropolitan France and DOMs were listed and analyzed.
- **138 samples from 138 patients suspected of syphilis in the context of the GENOSYPH study** were identified and analyzed.
- **86.4% of *T. pallidum* strains in La Réunion have the A2058G mutation** on the 23S rRNA gene for macrolide resistance.
- **100% of *T. pallidum* strains in La Réunion have the A2058G mutation** on the 23S rRNA gene for macrolide resistance.
- **76 perinatal samples analyzed**, 9 were positive in nPCR.
- **Evaluation of a qPCR multiplex kit for genital ulcerations.**
- **Evaluation of 6 serological kits** (Elisa, CLIA, CMIA).

2. Alert

- **333 LCR were analyzed**, 30 were positive by nPCR and / or VDRL.
- **9 congenital syphilis alerts were triggered to ANSP.**

1 Missions et organisation du CNR

Cf annexes.

2 Activités d'expertise

Laboratoire CHU de Bordeaux : éléments clefs 2018

- Evaluation de 2 trousse diagnostiques pour la détection de *M. genitalium* et la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques.
- 3776 échantillons biologiques positifs à *C. trachomatis*, 759 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium*, 77 souches de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* et 50 souches de *C. trachomatis* envoyés au centre de ressources biologiques (CRB) Bordeaux Biothèque Santé (BBS) du CHU de Bordeaux en 2018.
- *C. trachomatis* : 4623 échantillons typés.
- Mycoplasmes urogénitaux : 269 échantillons ou souches expertisées.

Laboratoire APHP Saint-Louis : éléments clefs 2018

- Bio-informatique : création d'un pipeline d'analyse du génome du gonocoque, stocké sur la plateforme Galaxie de l'APHP.
- 558 souches reçues pour détermination des CMI dont 10 pour le contrôle EEQ européen.
- 355 souches séquencées.
- 3723 échantillons biologiques analysés à la recherche de CT/NG pour Remind-mémodépistages (ANRS).
- 552 prélèvements expertisés.

Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs 2018

- 883 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise moléculaire, dont 49 ont été positifs pour TPA.
- 1027 échantillons analysés dans le cadre de l'expertise sérologique, dont 504 ont été positifs pour la syphilis.
- 138 échantillons analysés dans le cadre du protocole génosyph, dont 37 ont été positifs pour TPA.
- 71 échantillons expertisés dans le cadre de l'étude IPERGAY dont 6 ont été positifs pour TPA.
- 18 échantillons provenant d'ulcérations génitales à La Réunion analysés pour la présence du marqueur génétique de résistance à l'azithromycine : 100% des échantillons mutés dans l'ARNr 23S.

2.1 Évolutions des techniques

Lister ici les nouvelles techniques développées ou en développement.

2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Aucune nouvelle technique n'a été développée.

2.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

- Détection des gènes *penA* mosaïques directement à partir des prélèvements : amplification et séquençage avec une prédiction de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G).
- Pipeline d'analyse bioinformatique de génome déployée sur la plateforme Galaxie de l'APHP.

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

L'évaluation des performances en termes de faisabilité, sensibilité, spécificité ainsi que les valeurs prédictives positive et négative pour la détection de l'ADN de *T. pallidum* du test Allplex™ STI Genital ulcer Assay Multiplex real-time PCR System (Seegene) est réalisée conjointement à l'hôpital Cochin à Paris pour la syphilis et au CHU de Bordeaux pour *C. trachomatis* sérovar L.

Le test de détection génomique et un test de PCR multiplex qui permet la détection simultanée des ADN correspondant à Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), à Herpes simplex virus type 2 (HSV-2), à *Haemophilus ducreyi* (HD), à *Cytomegalovirus* (CMV), à *Chlamydia trachomatis* Sérovar L (LGV), à *Treponema pallidum* (TP), et à Varicella-zoster virus (VZV).

MATERIEL ET METHODES

Réactifs :

Le kit d'extraction d'ADN InnuPREP Bloog DNA Mini kit et le kit de PCR multiplex Allplex™ Genital ulcer Assay ont été achetés à la société EuroBio qui commercialise les kits de la gamme Seegene.

Panel Syphilis

Il est constitué d'un total de **354 écouvillons obtenus à partir d'ulcérations génitales, anales, buccales et cutanées documentées cliniquement et sérologiquement dans le cadre de l'Etude GENOSYPH** (CPP S.C. 3005, CNIL n°1208504) engagée par le CNR Syphilis en 2010 (panel «syphilis PCR écouvillon n°1» du CNR). Il s'agit d'échantillons anonymisés, provenant des CeGGID des hôpitaux Cochin, Saint Louis à Paris, de Metz-Thionville, de Nancy, de Valenciennes et des CeGGID de Marseille, d'Aix-en-Provence obtenus à partir de patients consultants pour des IST, ayant une suspicion de syphilis récente.

Le panel est constitué de 125 syphilis primaires, 12 syphilis primo-secondaires, 64 syphilis secondaires, et 153 patients non infectés par *T. pallidum* (PCR et sérologie négatives) présentant une ulcération.

Protocole d'évaluation

Il se décompose en deux parties, extraction de l'ADN à partir des échantillons puis l'amplification génique.

La mise en place de la réaction de PCR a été réalisée en suivant les recommandations du fabricant avec 5 ul d'ADN et les contrôles recommandés avec l'appareil BioRad CFX96 Real-Time PCR System. Pour chaque échantillon testé, un contrôle interne d'amplification a été réalisé, permettant de valider la réaction de PCR.

RESULTATS

Praticabilité technique

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

Patients

L'ensemble des écouvillons utilisés pour cette étude a été répertorié entre octobre 2010 et décembre 2016. Ils proviennent de 327 patients homme et de 27 patients femmes avec un âge moyen de 37,8 ans dont 22,5 % sont positifs pour le VIH (tableau ci-dessous).

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

Patient caractéristique	Patient avec syphilis			Patient sans Syphilis
	Primaire	Primo-secondaire	Secondaire	Ulcération documentée
Nombre total	125	12	64	153
Population				
Homme	123	11	64	129
Femme	2	1	0	24
Age				
Médian	38,1	39,5	41,3	35,9
Ecart	21 - 71	24 - 60	21 - 69	18 - 71
Orientation				
Homo	98	9	51	61
Hétéro	21	1	6	85
Non rens.	6	2	7	7
Infection				
HIV	35	3	30	12

État d'avancement

L'ensemble des 354 échantillons a été testé. Quinze échantillons ont été invalidés car le contrôle interne d'amplification n'a pas fonctionné et vont être re-testés. Cinq échantillons ont été positifs pour *C. trachomatis* sérovar L et vont être contrôlés au CNR IST à Bordeaux. Soixante-dix-huit échantillons ont été positifs pour HSV-1 ou HSV-2. Ils seront validés par le CNR des herpès virus à La Pitié Salpêtrière à Paris. Six échantillons ont été positifs pour le CMV et seront validés au laboratoire de Virologie à l'hôpital Cochin. Aucun échantillon n'a été trouvé positif pour le VZV et pour *H. ducreyi*.

Parallèlement à l'expertise syphilis sur cette trousse, le laboratoire du CHU de Bordeaux va également évaluer la trousse Allplex genital ulcer assay de Seegene revendue par Eurobio ainsi que les trousse multiplex *Treponema pallidum* + *Haemophilus ducreyi* / *Chlamydia trachomatis* L serovar et simplex *Chlamydia trachomatis* L serovar de Progenie revendue par Orgentec (cf projet 8.1.1). Les échantillons trouvés positifs pour *T. pallidum* seront envoyés au laboratoire du CNR des IST à Cochin pour validation.

2.2.2 Evaluation des performances des trousse Aptima Combo 2 for CT/NG and Mycoplasma genitalium d'Hologic pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* dans le sperme et le milieu de transport eSwab

Les tests Aptima (Hologic, USA) sont des techniques d'amplification de l'ARN basées sur la transcription-mediated amplification (TMA) utilisées pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*. Ces tests n'ont jamais été évalués dans le sperme et dans les échantillons recueillis sur eSwab.

L'objectif de l'étude était de **déterminer la limite de détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* avec les kits Aptima Combo 2 CT/NG et Aptima Mycoplasma genitalium dans différents volumes de sperme et de milieu eSwab**. Les conditions de stockage de ces trois bactéries dans le milieu eSwab ont aussi été évaluées selon les modalités recommandées par le fournisseur.

Méthode

Des pools de spermes anonymes ont été recueillis dans le service de Biologie de la Reproduction du CHU de Bordeaux. Des dilutions de 10 en 10 de cultures quantifiées de souches de référence de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* ont été ajoutées à du sperme, du milieu eSwab et du milieu 2SP (0,2 M sucrose, 15 mM K₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄). Des volumes de 400, 200 et 100 µl de milieu eSwab et des volumes de 100, 50 et 25 µl de sperme ainsi obtenus ont ensuite été transférés dans des tubes de transfert Aptima avant analyse sur l'automate Panther (Hologic). Pour chaque bactérie, les deux conditions de stockage recommandées par le fournisseur, cinq jours à température ambiante et sept jours à 4°C, ont été testées.

Résultat

Les limites de détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* étaient équivalentes dans le milieu eSwab et le milieu 2SP, varient entre 1 et 10 UFI/ml ou UFC/ml, quel que soit le volume ajouté dans le tube de transfert Aptima (400, 200 ou 100 µl). Comme des volumes de 200 µl sont habituellement utilisés pour les tests de biologie moléculaire, les conditions de stockage ont été évaluées avec ce volume. Quelles que soient les conditions de stockage, les limites de détection de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* étaient identiques à 10 UFI ou UFC/ml. Pour *M. genitalium*, la limite de détection a augmenté de 1 log après cinq jours à température ambiante ou après sept jours à 4°C mais est restée basse à 10² UFC/ml.

La comparaison des limites de détection dans le sperme et le 2SP a montré que le sperme était une source d'inhibition d'amplification, essentiellement pour *C. trachomatis* et *M. genitalium* (tableau ci-dessous). Cependant, en ajoutant un volume de 50 µl de sperme dans le tube de transfert Aptima, les limites de détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* restent faibles à respectivement 10³ UFI/ML, 10 et 10² UFC/ml. Un volume de 50 µl de sperme peut donc être utilisé pour la détection de ces trois bactéries dans le sperme avec les tests Aptima.

En conclusion, 50 µl de sperme ou des échantillons collectés dans le milieu de transport eSwab peuvent être utilisés pour détecter *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* avec la technique Aptima, Hologic.

Tableau. Limite de détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* dans le 2SP et le sperme selon le volume ajouté dans le tube de transfert Aptima.

	Volume ajouté dans le tube de transfert Aptima (µL)	Limite de détection dans le 2SP ^a	Limite de détection dans le sperme ^a	Différence en nombre de log
<i>C. trachomatis</i>				
	100	10	10 ³	2
	50	10 ²	10 ³	1
	25	10 ³	10 ⁴	1
<i>N. gonorrhoeae</i>				
	100	1	10	1
	50	10	10	0
	25	10	10	0
<i>M. genitalium</i>				
	100	0,6	10 ²	>2
	50	6	10 ²	>1
	25	60	10 ²	<1

^a Les limites de détection sont exprimées comme la médiane de trois déterminations indépendantes en UFI/ml pour *C. trachomatis* and en UFC/ml pour *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium*.

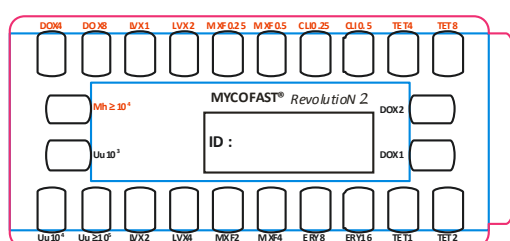
Ce travail a été soumis pour publication dans J. Microbiol. Immunol. and Infection et sera présenté sous forme de communication affichée STI and HIV 2019 world congress, Vancouver, 14-17 juillet 2019.

2.2.3 Trousses évaluant la résistance aux antibiotiques chez les mycoplasmes et le gonocoque

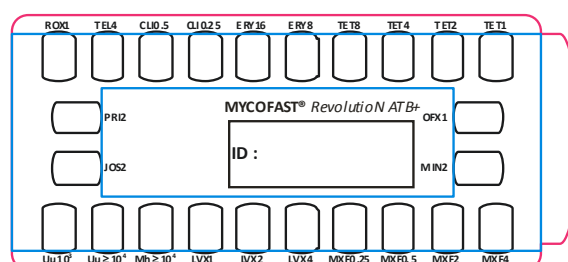
2.2.3.1 Trousses ELitech évaluant la sensibilité de *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. aux antibiotiques

Les galeries MYCOFAST RevolutionN 2 et MYCOFAST RevolutionN ATB+, développées par le laboratoire ELITECH MICROBIO, sont dédiées au diagnostic des mycoplasmes urogénitaux, *M. hominis*, *U. urealyticum* et *U. parvum* à partir d'échantillons cliniques. Elles comportent trois parties : détection, numération et sensibilité aux antibiotiques.

- La galerie RevolutionN 2 (ci-dessous) dérive de la galerie RevolutionN actuelle mais les antibiotiques doxycycline et tétracycline ont été ajoutés. De plus, une partie de la galerie est réservée à *M. hominis*, l'autre aux *Ureaplasma* spp.



- La galerie RevolutionN ATB+ (ci-dessous), réservée à certains marchés (Europe de l'Est), correspond à la galerie RevolutionN actuelle à laquelle ont été ajoutés les antibiotiques doxycycline, tétracycline, josamycine, roxythromycine, ofloxacine, pristinamycine et minocycline.



Ces galeries utilisent une méthode biochimique basée sur l'aptitude de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* à métaboliser respectivement l'urée et l'arginine. La croissance des mycoplasmes en milieu liquide est visualisée par le virage d'un indicateur coloré, le rouge de phénol, du jaune-orangé au rose framboise qui traduit l'alcalinisation. L'étude de la sensibilité de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* aux antibiotiques est basée sur le principe d'inhibition métabolique de la croissance des mycoplasmes en présence d'antibiotiques.

L'étude a consisté en l'évaluation clinique de la partie sensibilité aux antibiotiques de ces deux galeries à l'aide de souches de référence et de souches cliniques de *U. parvum*, *U. urealyticum* et *M. hominis*. L'objectif était de comparer les résultats des galeries avec ceux de la méthode de référence de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide, selon les recommandations du Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

Méthodes

Trente-cinq souches ont été utilisées, trois souches de référence ATCC et 32 souches cliniques (11 *U. parvum*, 8 *U. urealyticum*, 16 *M. hominis*) isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Deux mélanges de souches (*U. parvum* + *M. hominis* et *U. urealyticum* + *M. hominis*) ont aussi été testés.

L'ensemble des souches a été testé sur les deux galeries à deux ou trois concentrations (10^3 , 10^4 et 10^5 UCC/ml) selon l'espèce avec lecture systématique à 24h et 48h. Les déterminations de CMI ont été réalisées par dilution en milieu liquide, selon les recommandations du CLSI, pour 12 antibiotiques (érythromycine, roxythromycine, josamycine, clindamycine, pristinamycine, tétracycline, doxycycline, minocycline, ofloxacin, lévofloxacin et moxifloxacin).

Résultat

Un total de 1068 CMI a été déterminé et 95 galeries MYCOFAST Revolution 2 et 95 galeries MYCOFAST Revolution ATB+ ont été testées. Les résultats ont été consignés sur des tableaux Excel et les cas de discordance dans la catégorisation Sensible ou Résistant ont été analysés.

Trois cas de fausse sensibilité et 22 cas de fausse résistance ont été mis en évidence. Les deux galeries surestiment un peu la résistance à la tétracycline, essentiellement pour l'inoculum à 10^5 UCC/ml.

Il a aussi été montré que de fausses résistances peuvent apparaître après 48h d'incubation. En conséquence, la lecture ne doit absolument pas être faite au-delà de 24h, sauf si les cupules témoins n'ont pas poussé. Si les cupules témoins n'ont pas ou mal poussé à 24h, le résultat s'est quelquefois avéré faussement sensible. Une incubation de quelques heures supplémentaires a été requise dans ce cas.

Pour la galerie ATB+, il a été souligné une absence de concentrations critiques adaptées aux mycoplasmes pour les antibiotiques roxythromycine et ofloxacin, générant des incertitudes de catégorisation.

Enfin, **des recommandations** ont été émises pour la rédaction de la notice d'utilisation, notamment :

- Fournir un tableau d'interprétation pour faciliter la catégorisation.
- Ne pas lire les galeries au-delà de 24h, sauf si les cupules témoin « $Uu10^3$ » pour les uréaplasmes ou « $Mh \geq 10^4$ » pour *M. hominis* n'ont pas poussé.
- Préciser la conduite à tenir en cas de pousse partielle des témoins : réincuber quelques heures de plus jusqu'à atteindre une coloration rose. Cependant, les uréaplasmes ayant une croissance rapide, il est fondamental de veiller à lire la galerie dès l'obtention de la couleur rose. Si la lecture est retardée, de fausses résistances sont possibles.
- L'ensemencement à 10^3 UCC/ml peut engendrer un virage aléatoire des cupules. La notice d'utilisation actuelle évoquait un « prélèvement faiblement chargé en mycoplasmes ($<10^3$ UCC/ml) », nous avons suggéré d'élargir la recommandation à « $\leq 10^3$ UCC/ml ».
- Enfin, la technique de culture ne permettant pas de distinguer *U. urealyticum* et *U. parvum*, ces deux espèces doivent être mentionnées sous le nom *Ureaplasma* spp. ou uréaplasmes dans la notice d'utilisation pour éviter les confusions. Ainsi, le sigle « *Uu* » doit être remplacé par « *U* » ou « *Ur* ».

2.2.3.2 Résistance de *N. gonorrhoeae* aux fluoroquinolones

Le kit ResistancePlus GC assay (SpeedX, Australia) est le seul test de PCR en temps réel marqué CE-IVD qui permet de détecter simultanément la présence de *N. gonorrhoeae* et d'une mutation du gène *gyrA* codant la résistance aux fluoroquinolones. La PCR détecte la présence de *N. gonorrhoeae* sur 2 cibles, la cible multicopie *opa* et la cible *porA* et de la mutation S91F). Le kit possède un contrôle interne dans chaque réaction.

Le test ResistancePlus GC assay Speedx (Australia) a été testé sur les 248 échantillons recueillis pour l'étude Ngon2017 (voir annexe). Les échantillons cliniques de NGON 2017 ont été extraits avec l'automate m2000sp (Abbott). Les résultats ont permis d'observer 2 tests invalidés par l'absence d'amplification du contrôle interne, 14 échantillons pour lesquels une des cibles d'identification de *N. gonorrhoeae* est restée négative (*opa* et/ou *porA* négatif) et 12 échantillons où les deux cibles de *N. gonorrhoeae* étaient détectées mais le gène *gyrA* restait non détecté.

Pour les 220 échantillons cliniques analysables, 135 échantillons (61,4%) et 85 (38,6%) avaient respectivement un gène *gyrA* sauvage et muté. Le taux de résistance aux fluoroquinolones détecté par biologie moléculaire (38,6%) est très proche de celui observé sur les souches isolées en 2017.

2.2.4 Trousses de diagnostic sérologique de la syphilis

L'évaluation des performances en termes de sensibilité et spécificité de **6 tests tréponémiques**, réactif Syphilis TP Architect par Chimiluminescence (CMIA, Abbott), réactif LIAISON Treponema Assay par chimiluminescence (CLIA, Diasorin), réactif Syphilis Ab One par immuno-enzymologie, ELISA (DIA.PRO distribué par Launch, Arlington Scientific.Inc), réactif Enzygnost Syphilis par immuno-enzymologie, ELISA (Siemens), réactif Syphilis Total Ab par immuno-enzymologie, ELISA (Bio-Rad), réactif Syphilis Screen Recombinant par ELISA (Diasorin distribué par InGen), a été réalisée au laboratoire associé syphilis de l'hôpital Cochin.

MATERIEL ET METHODES

Réactifs

Les trousse ont été fournies par les différentes sociétés Abbott, Diasorin, Biorad, Siemens, Launch et InGen.

Panel

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

La syphilis récente inclut la syphilis primaire, une ou plusieurs ulcérations de type syphilitique (chancre) avec mise en évidence de *T. pallidum* dans les prélèvements par un examen au fond noir ou par PCR ; la syphilis secondaire, lésions cutanéomuqueuses et une sérologie non tréponémique (VDRL ou RPR) positive associée à une sérologie tréponémique (TPHA ou ELISA) positive ; la syphilis latente précoce, stade clinique silencieux d'une syphilis datant de moins d'un an. Le panel est constitué de **44 syphilis primaires, 7 syphilis secondaires, 4 syphilis latentes précoces** (cf tableau ci-dessous).

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

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

Protocole d'évaluation

Les tests ont été réalisés sur les automates Architect (Abbott), Liaison XL (Diasorin) et Evolis (Biorad) selon leur protocole.

RESULTATS

Praticabilité technique

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

Patients

L'ensemble des sérums utilisés pour cette étude 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 contrôles de qualité internes ont été corrects validant les résultats. Ceux-ci sont présentés et comparés au test tréponémique utilisé en routine (tableau ci-dessous).

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

TEST	Panel	Syphilis primaire	Syphilis secondaire	Syphilis précoce	latente
Référence CNRa CMA, Abbott Architect	Sensibilité (%)	93	100	100	
CLIA, Diasorin	Sensibilité (%)	91	100	100	
Liaison XL	Sensibilité (%)	70	100	75	
Elisa Syphilis Ab One	Sensibilité (%)	93	100	100	
Dia.pro Launch	Sensibilité (%)	93	100	100	
Elisa Syphilis	Sensibilité (%)	93	100	100	
Enzygnost Siemens	Sensibilité (%)	91	100	100	
Elisa Syphilis Total Ab	Sensibilité (%)	93	100	100	
Biorad	Sensibilité (%)	93	100	100	
Elisa Syphilis Screen	Sensibilité (%)	93	100	100	
Diesse,Ingen	Sensibilité (%)	93	100	100	

Référence CNRa : les sérums ont été testés en parallèle avec le réactif Syphilis TP Architect par Chimiluminescence (CMA, Abbott)

Conclusion

La sensibilité varie de 70 à 93% dans les syphilis primaires, est de 100% dans les syphilis secondaires et varie de 75 à 100% dans les syphilis latentes précoces. La syphilis primaire correspond à une période de séroconversion de la syphilis reflétée par une sensibilité plus faible du test Elisa Syphilis Ab One Dia.Pro distribué par Launch.

Les tests tréponémiques, Syphilis TP Architect (Abbott), Treponema Assay (CLIA, Diasorin), Enzygnost Syphilis par Immuno-enzymologie, ELISA (Siemens), Syphilis Total Ab par Immuno-enzymologie, Elisa (Biorad), réactif Syphilis Screen Recombinant (Diesse distribué par InGen) présentent une bonne sensibilité quel que soit le stade de la syphilis.

La spécificité varie de 90 à 98% (figure ci-dessous).



Sensibilité /Spécificité des tests Elisa sur les 55 sérums du panel «syphilis n°1»

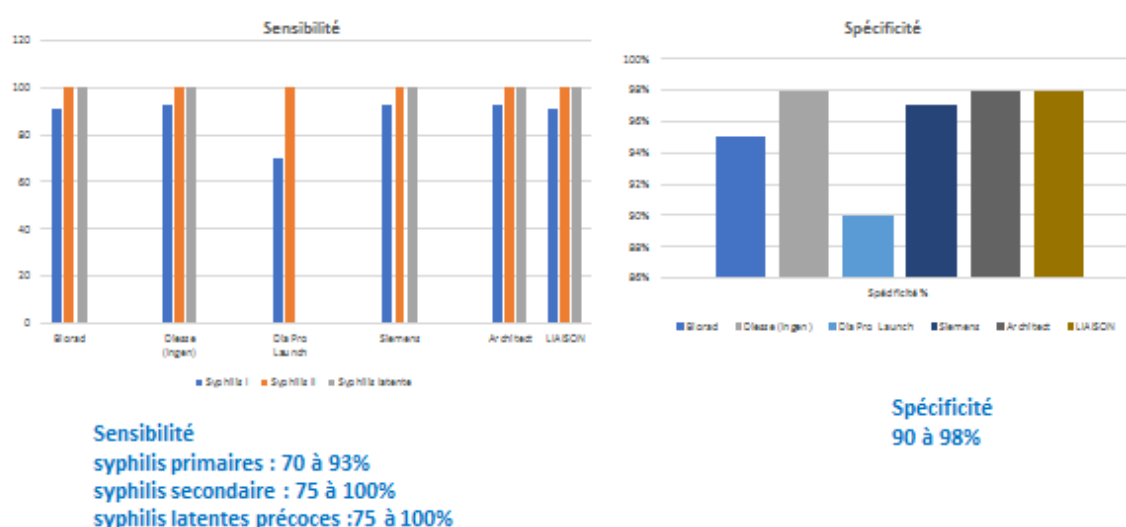


Figure. Récapitulatif des sensibilités et spécificités sur les trousse sérologiques testées.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Lister ici les techniques transférées et vers quels laboratoires elles l'ont été.

2.3.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Aucune technique n'a été transférée.

2.3.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

La technique de typage moléculaire NG-MAST a été transférée au CH de La réunion, Dr Belmonte et Rocquebert dans le cadre d'un travail collaboratif avec les DROM.

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} janvier 2018 et le 31 décembre 2018 :

- 759 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* dont 40 issus de l'enquête de surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2017), 71 souches de *Ureaplasma* spp. et 6 souches de *M. hominis*.
- 3344 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV.
- 432 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre de l'enquête de prévalence des infections urogénitales dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2017).
- 50 souches de *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux.

2.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

- 317 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2018.
- 205 souches collectées dans le cadre de l'étude Ngon 2018.
- 71 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* reçus des DROM en 2017
- 223 échantillons positifs à *N. gonorrhoeae* (protocole Remind, ANRS, 2018).
- Collection biologique reçue à l'hôpital St Louis de souches de gonocoques en provenance de l'Institut Alfred Fournier :
 - 15 boîtes de congélation en cryotubes correspondants aux souches de sensibilité diminuée isolées dans le cadre du réseau Renago
 - 116 boîtes de congélation en cryotubes correspondant à la collection Renago
- 8 souches de gonocoques et 70 prélèvements cliniques recueillis dans l'étude ancillaire ANRS menée par le Pr Molina (étude IPERGAY).

2.4.3 Laboratoire APHP Cochin

Matériel biologique envoyé au GH Cochin entre le 1^{er} avril 2017 et le 31 décembre 2018 :

- 1632 prélèvements cliniques recueillis dans le cadre de l'expertise dont 88 positifs pour TPA.
- 247 prélèvements cliniques recueillis dans le cadre du protocole GENOSYPH dont 74 positifs pour TPA.
- 18 prélèvements cliniques recueillis dans le cadre de l'étude de résistance de TPA aux macrolides à La Réunion dont 15 positifs pour TPA.
- 71 prélèvements cliniques recueillis dans le cadre de l'étude IPERGAY dont 6 positifs pour TPA.

2.5 Activités d'expertise

2.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

En 2018, le CNR a reçu et typé 3344 échantillons (dont 3309 d'origine anorectale). Cette activité est en très forte augmentation par rapport à 2017 comme le montre la figure ci-dessous.

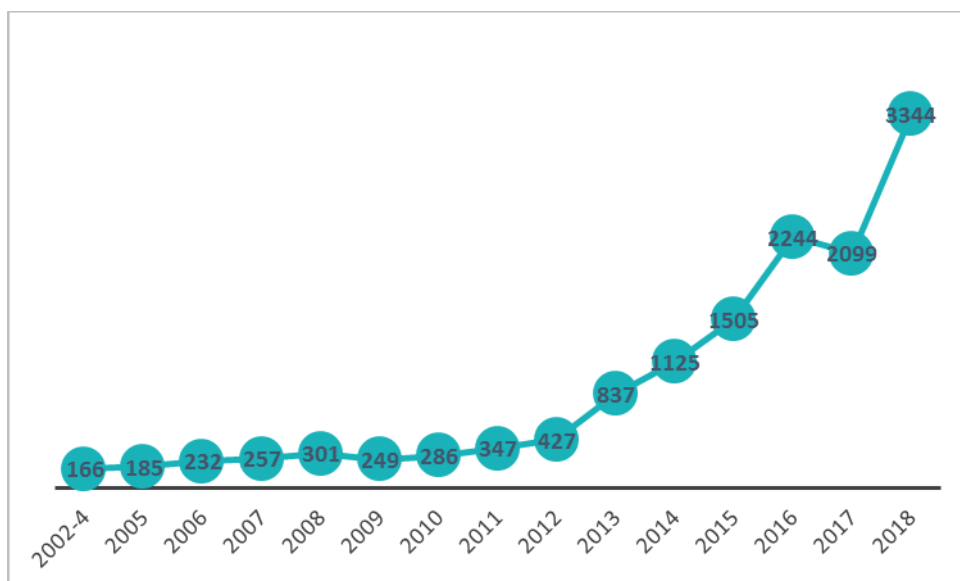


Figure. Évolution du nombre d'échantillons reçus au CNR depuis 2002.

Les 35 échantillons non rectaux se répartissent en 9 échantillons pharyngés, 5 adénopathies, 10 urines, 8 ulcérations génitales, 1 écouvillon vaginal, 1 écouvillon conjonctival et 1 liquide articulaire. Les résultats du typage sont donnés dans le tableau suivant :

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

Nature de l'échantillon	Souche L	Souche non L
Pharyngé	1	8
Adénopathie	3	2
Urine	1	9
Conjonctival	0	1
Liquide articulaire	0	1
Ulcération génitale	6	2
Vaginal	0	1

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

L'activité d'expertise concernant les mycoplasmes urogénitaux est aussi en très forte hausse avec par exemple 200 recherches de mutations associées à la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* en 2018 contre 34 en 2017. L'origine des échantillons est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau. Activité d'expertises, mycoplasmes urogénitaux, 2018.

Expertise	Nombre d'échantillons
Culture, antibiogrammes et CMI de <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i>	
Hôpital Croix St Simon, Paris	2
CHU Cavale Blanche, Brest	2
CHU Rennes	1
CHRU Tours	1
Total	6
PCR <i>Ureaplasma</i> spp. et <i>M. hominis</i>	
APHP, hôpital Jean Verdier	6
CHU Pontchaillou Rennes	6
Fondation Adolphe-de-Rothschild	4

Hôpital Croix St Simon, Paris	3
APHP Salpêtrière	1
CH Le Mans	1
CH Robert Ballanger	1
CHU Angers	1
CHU Cavale Blanche, Brest	1
CHU Dijon	1
CHU Hopital Archet, Nice	1
CHU Tours	1
Hôpital Foch, Suresnes	1
LABO Medilys, Lons Le Saunier	1
Total	29
Mutations associées à la résistance aux macrolides de <i>M. genitalium</i>	
Cerballiance Paris	74
APHP Louis Mourier	19
APHP Saint Antoine	12
LABM Biorylis, La Roche / Yon	12
CHT Gaston Bourret	10
LABM Exalab Bordeaux Caudéran	10
APHP Pitié Salpêtrière	9
CHU Nantes	8
APHP Saint Antoine	6
APHP Antoine Béclère, Clamart	6
Institut Alfred Fournier, Paris	6
CH André Grégoire, Montreuil	5
CHU Limoges	5
CH Bayonne	4
CH Lens	4
CH Félix Guyon, La Réunion	3
CHG Niort	3
LABM Gérard Noet, Paris	3
CH Ales	2
CH Tourcoing	2
APHP Bichat	1
LABM Biooffice, Bordeaux	1
CH Ajaccio	1
CH Libourne	1
CH Victor Dupouy, Argenteuil	1
CHR Metz-Thionville	1
CHRU Montpellier	1
CHRU Nancy Brabois	1
CHU Angers	1
CHU Montpellier	1
CHU Réunion GHSR	1
CHU Toulouse Purpan	1
HIA Begin, Saint Mandé	1
APHP Cochin	1
LABM Ronchin	1
LAM Vialles, Bastia	1
Clinique Tivoli, Bordeaux	1
Total	220
Mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones de <i>M. genitalium</i> (gène <i>parC</i>)	
APHP Pitié Salpêtrière	5
Cerballiance Paris	3
Institut Alfred Fournier, Paris	2
CH Bayonne	2
APHP Cochin	1

	APHP Saint Antoine	1
Total		14
Total général		269

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

2.5.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Expertise	Nombre d'échantillons
Culture, antibiogrammes et CMI de <i>N. gonorrhoeae</i>	
Réseau Renago (n=317):	
Département 03 (Allier)	14
Département 06 (Alpes Maritimes)	9
Département 17 (Charente Maritime)	2
Département 18 (Cher)	29
Département 24 (Dordogne)	10
Département 25 (Doubs)	35
Département 28 (Eure-et-Loir)	12
Département 49 (Maine-et-Loire)	4
Département 51 (Marne)	26
Département 56 (Morbihan)	12
Département 58 (Nièvre)	1
Département 59 (Nord)	36
Département 67 (Bas Rhin)	35
Département 69 (Rhône)	2
Département 71 (Saône-et-Loire)	16
Département 77 (Ile-de-France)	1
Département 80 (Somme)	4
Département 84 (Vaucluse)	6
Département 85 (Vendée)	27
Département 87 (Haute Vienne)	3
Département 92 (Ile de France)	4
Département 94 (Ile de France)	6
Non renseigné	23
Enquête Ngon2018 (n=205)	
Hôpital Foch, Suresnes 92	2
Groupe Hospitalier Nord Lyon, 69	10
Hôpital Louis Mourier,	10
Hôpital Henri Mondor, APHP	8
Hôpital Antoine Bécclère	3
EXALAB, Le Haillan	23
CHU Angers	4
BIOEXCEL, Saint Doulchard	5
LAM SCHUH, Strasbourg	10
CHU Reims	7
BioArd'Aisne, Reithel	10
CHU, Bordeaux	10
CHU Lens	7
CHU Brest	2
CHU Toulouse	12

	ABO+, Chambray-lès-Tours	17
	CHU Montpellier	10
	CH Aix-en-Provence	7
	Hôpital Saint Joseph	22
	CHU Limoges	2
	Hôpital André Mignot, Versailles	4
	Hotel-Dieu, Institut Cochin	10
	CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre	3
	CHU Grenoble Alpes	2
	CHU Rennes	4
Contrôle qualité	Européen EAQ	10
Total		532
Expertise sur prélèvements cliniques		
PCR identification - Confirmation de PCR positive		
	LAM Nice Labazur	39
	CHR Orleans	1
Recherche de résistance aux fluoroquinolones et ceftriaxone		
	Etude ANRS (Remind)	223
	Etude Ngon 2017	248
	Laboratoire Cerba (DROM, 2017-2018)	71
Total		582

2.5.3 Laboratoire APHP Cochin

Année 2018		
<i>Dans le cadre de l'expertise :</i>		
- Nombre des centres participants :	130	90% laboratoires hospitaliers
- Nombre total d'expertises :	1594	36% PCR et 64% sérologies
- Nombre total d'échantillons :	883	
LCR	333	3,9% positifs par nPCR et/ou sérologie
Placenta, liq. amniotique, cordon	76	5,4% positifs par nPCR
Ecouvillon	126	19% positifs par nPCR
Biopsie	26	23% positifs par nPCR
Sérum	372	49% positifs par nPCR et/ou sérologie
Sang total	31	0% positifs par nPCR
Autre	20	3,5% positifs par nPCR

Le délai moyen de restitution des résultats est de 5,1 jours pour la PCR et de 5,7 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 2018. 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

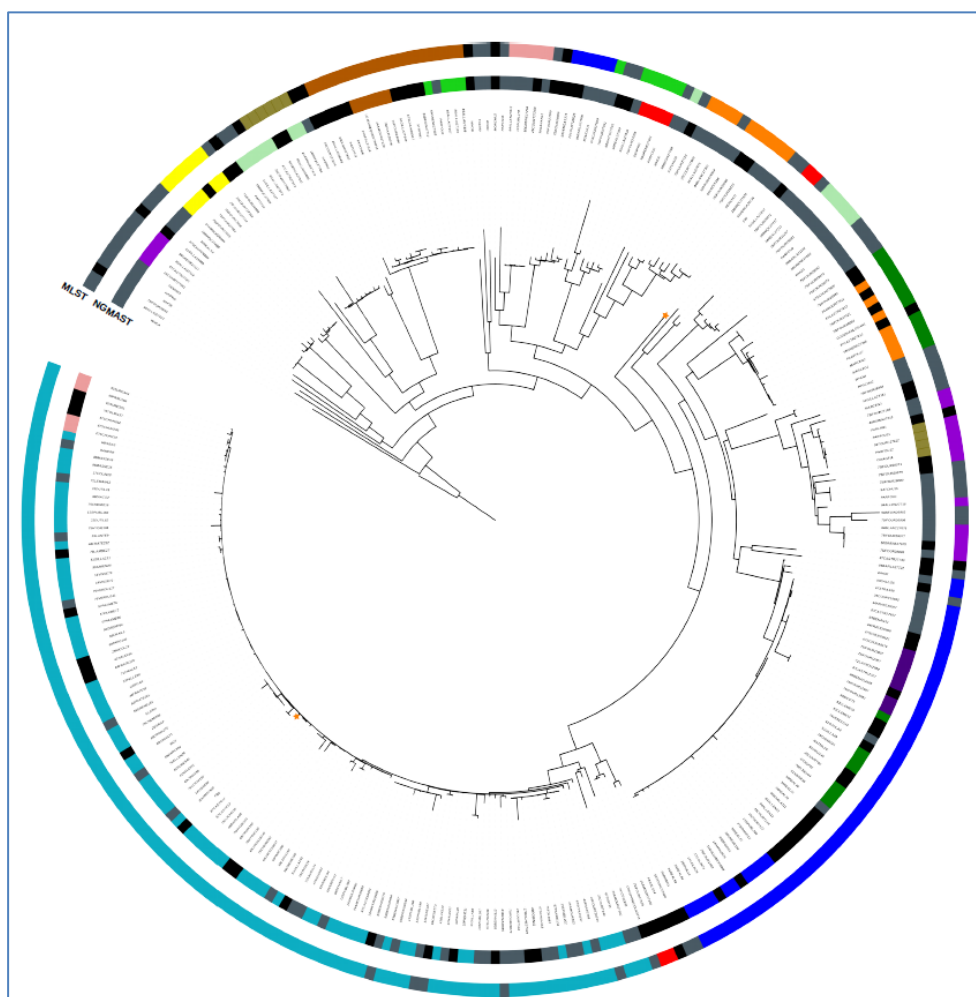
En 2018, le NGS a été de plus en plus utilisé pour le suivi épidémiologique des souches de *N. gonorrhoeae*. Il permet une analyse fine avec l'extraction *in silico* des gènes utiles au typage moléculaire pour déterminer le NG-MAST, MLST, le NG-NSTAR et les déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques. Le séquençage depuis l'extraction jusqu'à l'analyse bio-informatique est réalisé à St Louis pour les souches de gonocoque mais la technique n'est pas déployée sur les échantillons cliniques.

Le tableau ci-dessous rapporte les 355 souches reçues pour séquençage NGS entre 2017-2019. A ce stade, 328 ont vu leurs génomes séquencés. Les résultats des séquençages sont décrits dans les chapitres surveillance et recherche.

Séquençage des souches de gonocoques

Haiti (Port au Prince)	25
Souches Renago 2017 pour l'ECDC	110
Souches Ngon 2017	25
Souches cefixime ≥ 0.125 mg/L (2008-2016)	160
Souches contrôle de qualité EAQ 2018 (en cours)	10
Souches Prepeurs (cohorte de Bordeaux) (en cours)	25
Total	355

La figure ci-dessous représente une analyse core-génome de 315 souches séquencées avec l'extraction *in silico* du NG-MAST (couronne intérieure) et MLST (couronne extérieure).



Les fichiers fasta et assemblés des génomes séquencés sont situés sur 2 plateformes. La plateforme Galaxie de l'APHP héberge 328 génomes séquencés en 2017-2018. Les fichiers fasta de 2 nouveaux génomes multirésistants à

la ceftriaxone et azithromycine ayant fait l'objet d'une alerte dans Euro Surveillence [Eyre DW, et al, Euro Surveill. 2019;24(10)] viennent d'y être intégrés. La plateforme mage Microscope (Genoscope, Evry) héberge des génomes de référence qui ont été ré-annotés.

Le pipeline pour l'analyse des données de séquençage à haut débit pour *N. gonorrhoeae* a été créé par Manel Merimèche, bioinformaticienne au CNR et est localisé sur la plateforme bio-informatique Galaxie de l'APHP. Le process bioinformatique est schématisé ci-dessous. 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.

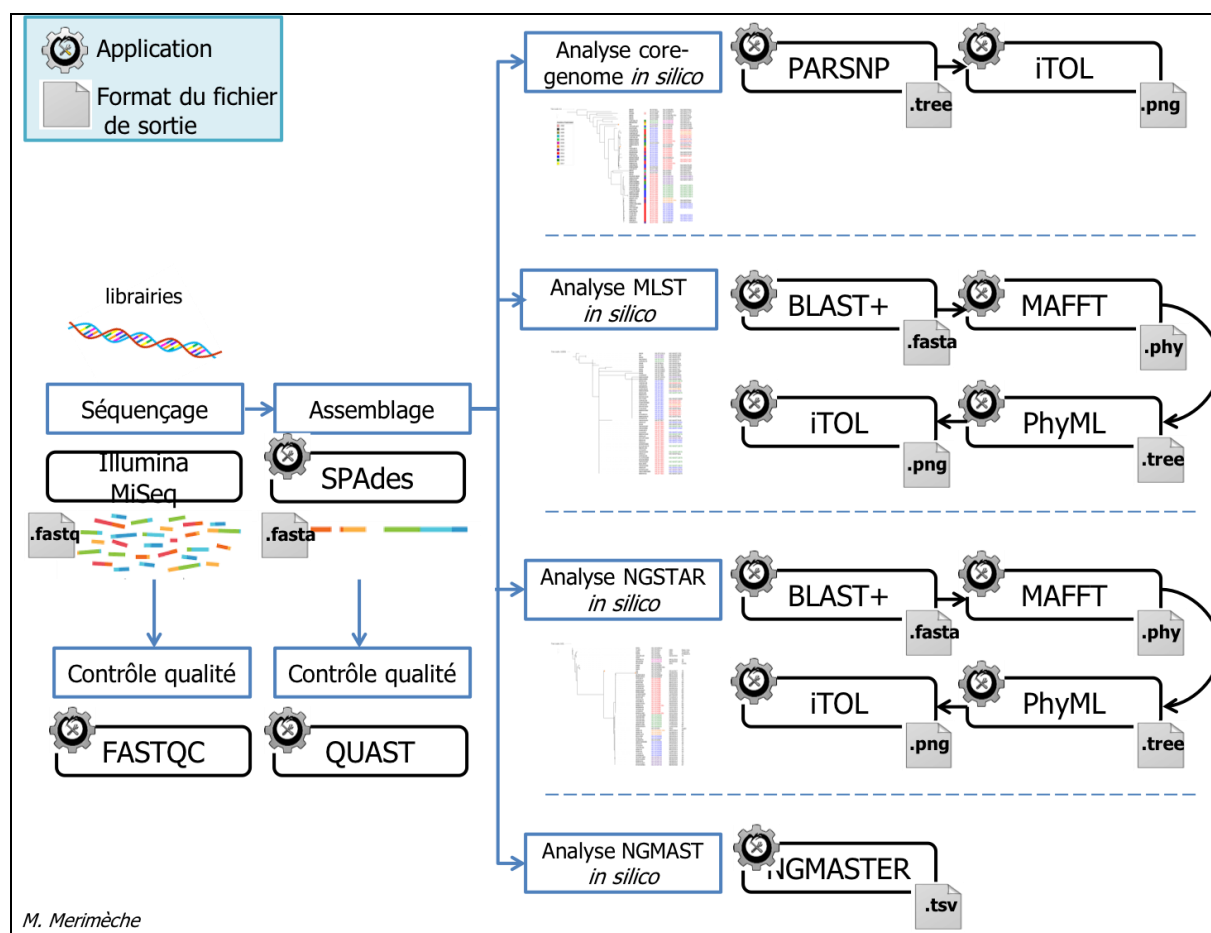


Figure. Schématisation du pipeline d'analyse des génomes de gonocoque, plateforme Galaxie, APHP.

L'accréditation et l'automatisation complète du process sera effectuée courant 2019.

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 2018

La surveillance des infections à *C. trachomatis* en 2018 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 augmente en 2018 de 51,6% par rapport à 2017.
- Un nombre de cas non LGV toujours en augmentation (+89%) par rapport à 2017, lié à l'introduction dans le réseau d'une population d'HSB VIH-négatif sous PrEP.
- Un nombre de cas de LGV de 19,4% parmi ces patients sous PrEP.

Les points marquants dans la surveillance des génovars circulants dans **les infections urogénitales en Outre-Mer** sont :

- Une bonne implication des laboratoires qui permet de couvrir la majorité de la zone géographique des Départements, Régions et Collectivités d'Outre-Mer.
- La prévalence prépondérante de la souche E en global, mais avec des disparités suivant les territoires.

Laboratoire GH Saint-Louis : éléments clefs

La résistance aux C3G est faible [0,3% au céfixime) en France métropolitaine mais les résistances du gonocoque augmentent dans les réseaux observés pour les fluoroquinolones [47% à 55%] et l'azithromycine [6,9% à 17,3%]. Ces résultats sont à solidifier par une augmentation des extractions de données de CMI.

Un changement est noté dans la **structure des populations de gonocoques de sensibilité diminuée en France sur la période 2008-2016** avec la diminution du génogroupe G1407, MLST1901 associé à une population masculine (clade I) et l'apparition du clone de MLST7363 présentant des CMI à l'azithromycine et à la ceftriaxone plus basses et qui semble associée à une population plus mixte homme/femme (clade II).

La prévalence des infections à gonocoque dans les régions Outre-Mer est évaluée à 5,9% [3.2%-8.3%]. La résistance aux fluoroquinolones y varie de 0 à 41% [0% Polynésie Française, 24% en Guadeloupe et 41% en Guyane]. Les études moléculaires sur prélèvements mettent en évidence l'existence de souches de sensibilité diminuée aux C3G en Guyane (5,8%), Guadeloupe (11%) et surtout en Martinique (55,5%). Une étude plus importante sur les souches cliniques est nécessaire afin de confirmer ces résultats et d'analyser les clones circulants.

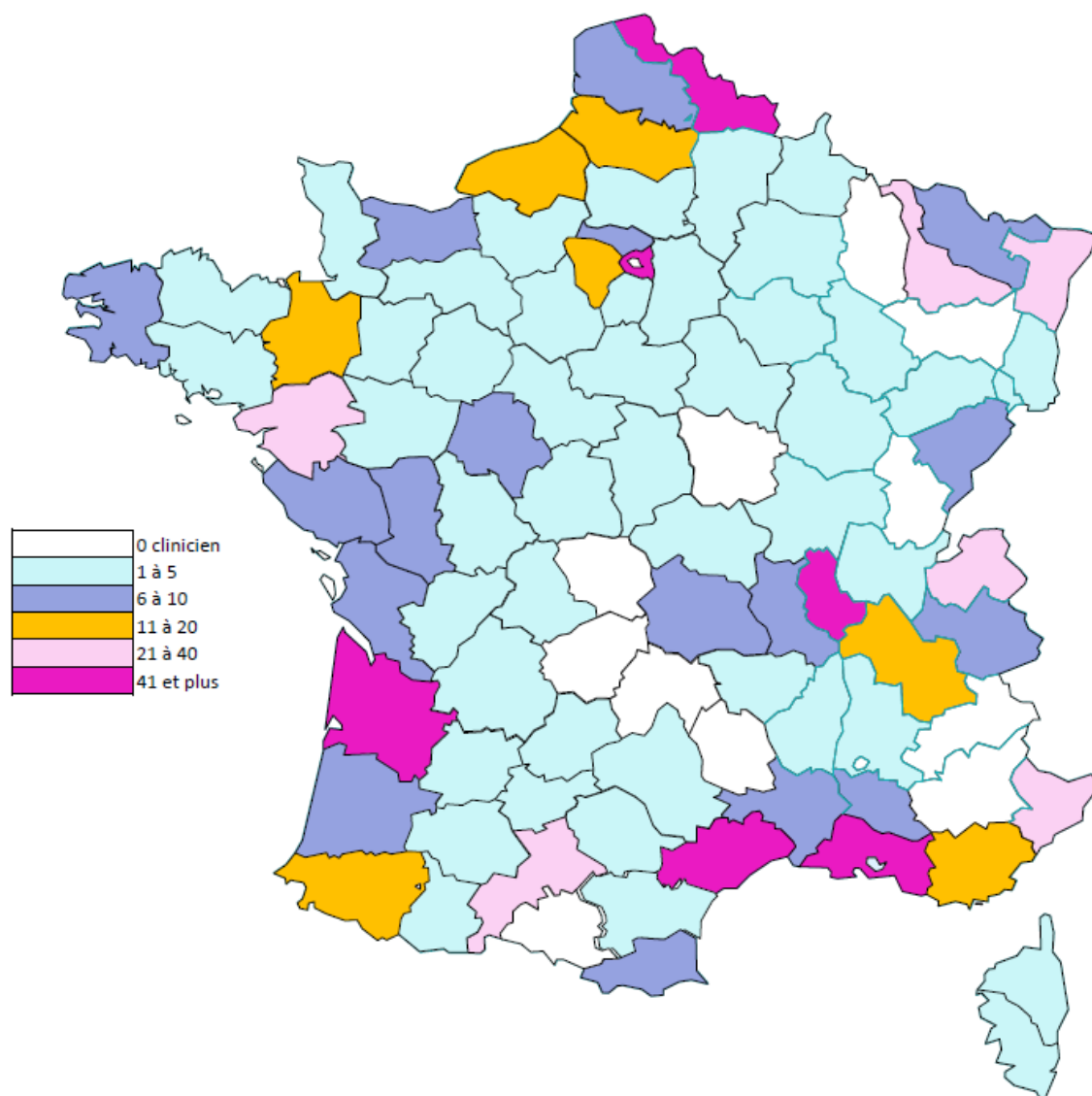
Laboratoire APHP Cochin : éléments clefs

- 100 % des souches de *T. pallidum pallidum* de La Réunion sont **résistantes à l'azithromycine**.
- 30 alertes de **neurosyphilis**.
- 9 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 de densité géographique de nos correspondants cliniciens.



Le nombre de correspondants augmente tous les ans comme le montre la figure ci-dessous. Le réseau comporte 1459 médecins correspondants ayant participé au moins une fois. En 2018, 632 médecins ont participé au réseau dont 278 nouveaux. Depuis 2010, 325 laboratoires ont participé au réseau et en 2018, ce sont 128 laboratoires qui ont envoyé des échantillons dont 57 nouveaux. Il faut noter que 10 laboratoires participent de manière pérenne et envoient 46,7% des échantillons.

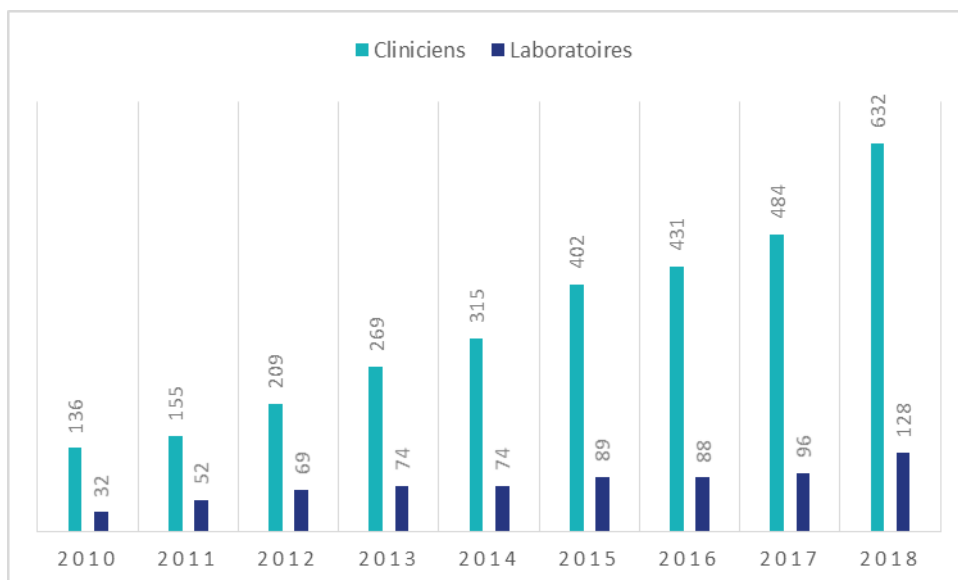


Figure. Évolution du nombre de correspondants actifs du réseau.

Les trois modes d'exercice, ville, hôpital et CeGIDD sont représentés dans la figure ci-dessous. On peut voir que la participation des médecins de CeGIDD et des centres hospitaliers est toujours en hausse (respectivement + 25,5% et +33,2% par rapport à 2017). De même, la participation des médecins de ville connaît une augmentation de 29,6% entre 2017 et 2018.

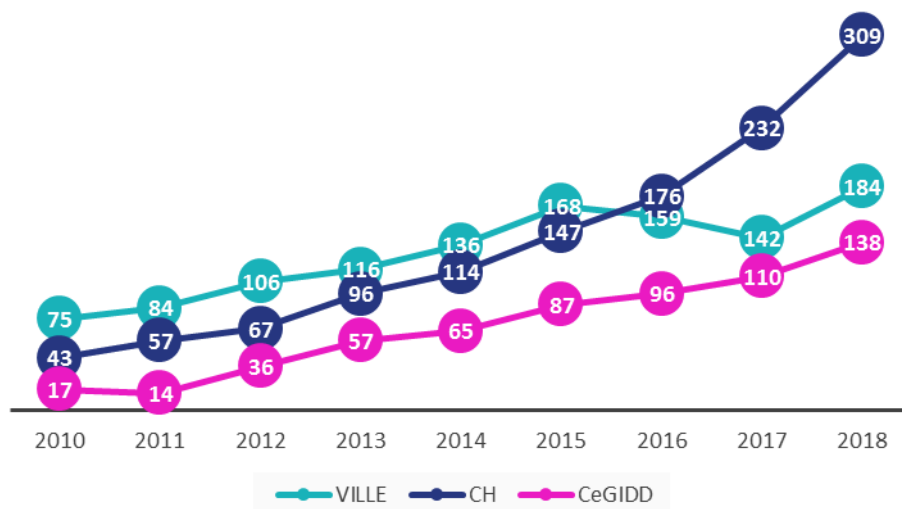


Figure. Évolution du nombre de cliniciens du réseau par mode d'exercice : ville, Centre Hospitalier (CH) et CeGIDD.

L'année 2018 se caractérise par une augmentation d'activité dans les centres hospitaliers, probablement liée à la prise en charge des patients sous PrEP.

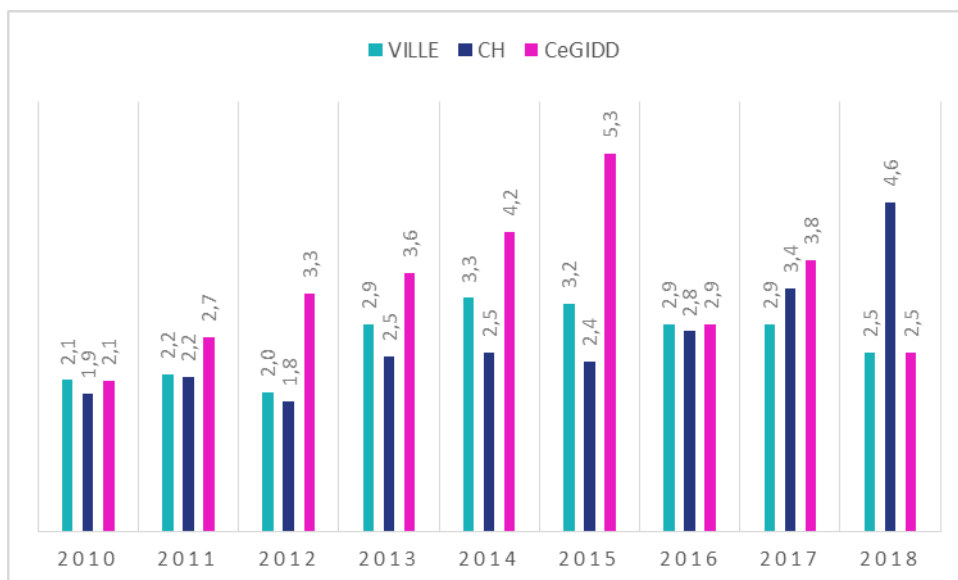


Figure. Évolution du nombre moyen d'échantillons/médecin/an en fonction du mode d'exercice.

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

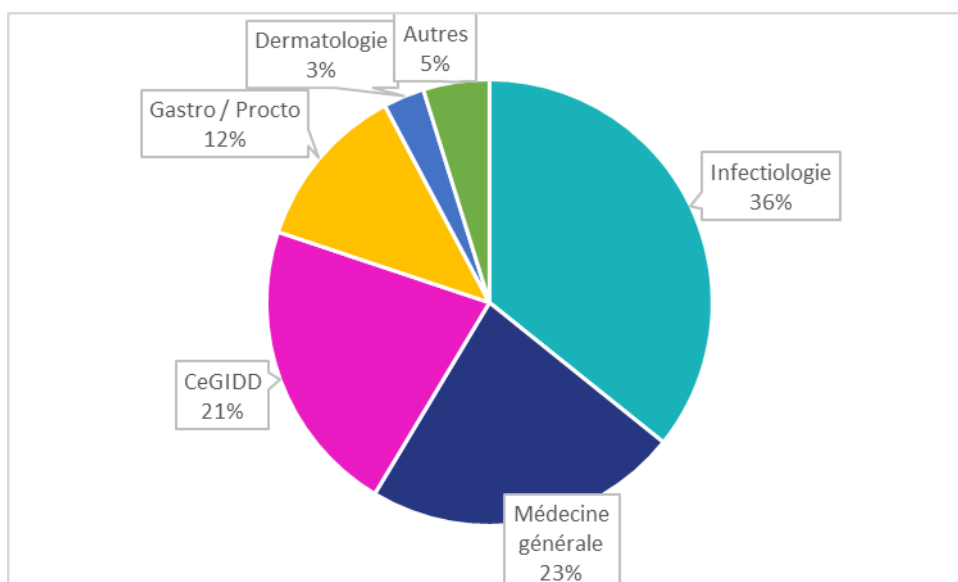


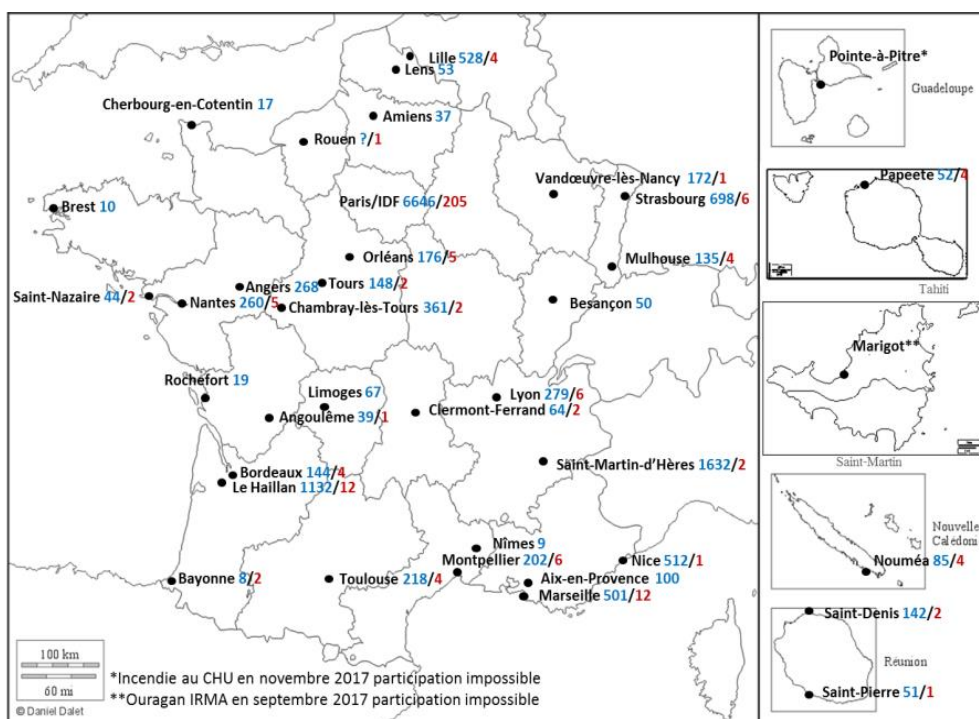
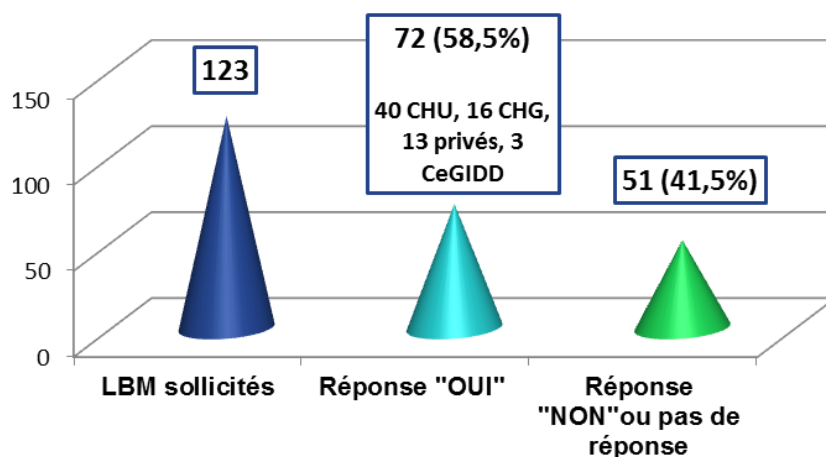
Figure. Répartition des médecins du réseau par spécialité.

3.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

En septembre 2018, Santé Publique France (Florence Lot, Ndeindo Ndeikoundam, Delphine Viriot, Nelly Fournet) annonçait le remplacement du recueil de données en continu *via* le réseau Renago par des enquêtes ponctuelles pluriannuelles « LaboST ». L'intérêt d'une telle approche est de pouvoir estimer le nombre total de diagnostics au niveau national et régional.

En parallèle, le réseau de recueil des souches Rénago par l'Institut Fournier s'est arrêté et a été remplacé par des enquêtes ponctuelles appelées Ngon. Dans ce cadre, un ensemble de laboratoires publics des CHU et CHG et de laboratoires privés a été constitué et reste ouvert aux participants qui souhaitent nous rejoindre.

En 2017, l'enquête NGON2017 a permis le recueil de 248 prélèvements positifs et 25 souches sur une semaine, du 4 au 8 décembre 2017, avec les données cliniques (voir annexe).



En 2018, l'enquête NGON2018 ciblait une période plus longue allant de septembre à décembre 2018. Le recueil ne concernait que les souches consécutives limitées à 10 souches en France métropolitaine et à 20 souches pour les départements et territoires Outre-Mer. Le recueil est en cours et le laboratoire de l'Hôpital Saint Louis a reçu les prélèvements provenant de 25 centres, un total de 205 informations cliniques et 177 souches dont 150 congelées (cf. 3.2.2.1).

3.1.3 Laboratoire APHP Cochin

3.1.3.1 Dans le cadre du protocole GENOSYPH

L'étude GENOSYPH 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.

Pour l'année 2018, le laboratoire associé syphilis a reçu un total de 138 échantillons (sérum + écouvillons) provenant des centres collecteurs de l'étude GENOSYPH (Services de Dermatologie-MST des hôpitaux Cochin, CeGGiD de

Besançon, de Marseille, de Thionville, de Chalon s/ Saône). Les échantillons proviennent principalement d'Ile-de-France et de Marseille (figure ci-dessous).



Figure. Répartition géographique des prélèvements GENOSYPH reçus en 2018.

Les centres collecteurs sont répartis sur le territoire français comme indiqué ci-dessous. La participation des autres CeGGiD parisiens hors AH-HP est compromise du fait des contraintes du protocole pré-analytique car il n'existe pas de procédures adaptées à l'acheminement des prélèvements.

Le CNR fournit les écouvillons dans un kit de transport pour matière biologique de catégorie B, norme UN 3373. Le retour du kit à température ambiante reste à la charge du centre préleveur par voie postale ou par transporteur agréé. 23 centres ont été contactés pour participer à l'étude GENOSYPH en plus des centres Parisiens. Il faut noter la forte participation des centres de Marseille-Aix.

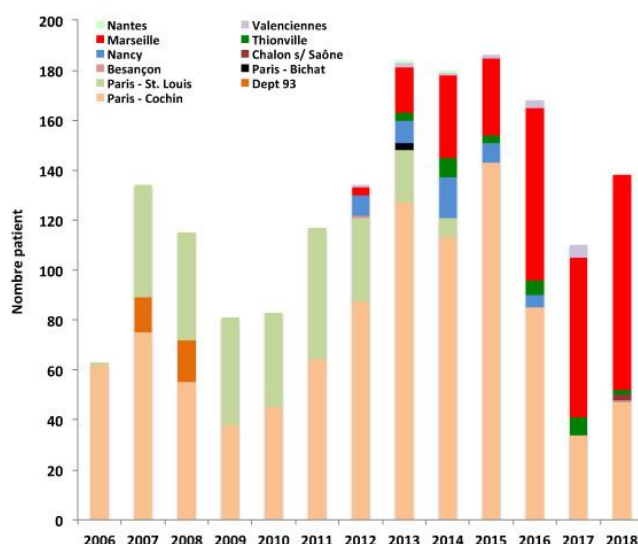


Figure. Nombre de patients recrutés par les centres préleveurs participant à GENOSYPH en 2006-2018.

3.1.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2018, le laboratoire associé syphilis a reçu 883 échantillons correspondant à 784 patients répartis sur 130 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 2018 (figure ci-dessous).



Figure. Nombre et provenance des échantillon envoyés pour expertise pour l'année 2018.

A partir de l'année 2011, le nombres de centres envoyant des échantillons pour expertise n'a cessé d'augmenter graduellement pour atteindre 130 en 2018 (tableau ci-dessous).

Tableau. Evolution du nombre de centres depuis 2011.

Année	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nb de Centre	39	37	65	92	91	86	100	130

Sur la période 2006-2018, les envois proviennent de l'ensemble des régions (figure ci-dessous) avec une forte représentativité de la région parisienne, des Hauts de France, de la Nouvelle Aquitaine, du Grand Est et de la région PACA.



Figure. Provenance des échantillons reçus par le CNR syphilis pour expertise en 2006-2018.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Anorectites à *C. trachomatis*

3.2.1.1 Anorectites à souches L

Le nombre de cas de LGV en 2018 est de 711, soit une augmentation de 51,6% par rapport à 2017 (469 cas). La baisse observée en 2017 ne s'est pas confirmée en 2018. La courbe épidémiologique est toujours en hausse. Au total sur la période 2010-2018, le nombre de cas de LGV s'élève à 3496 (figure ci-dessous).

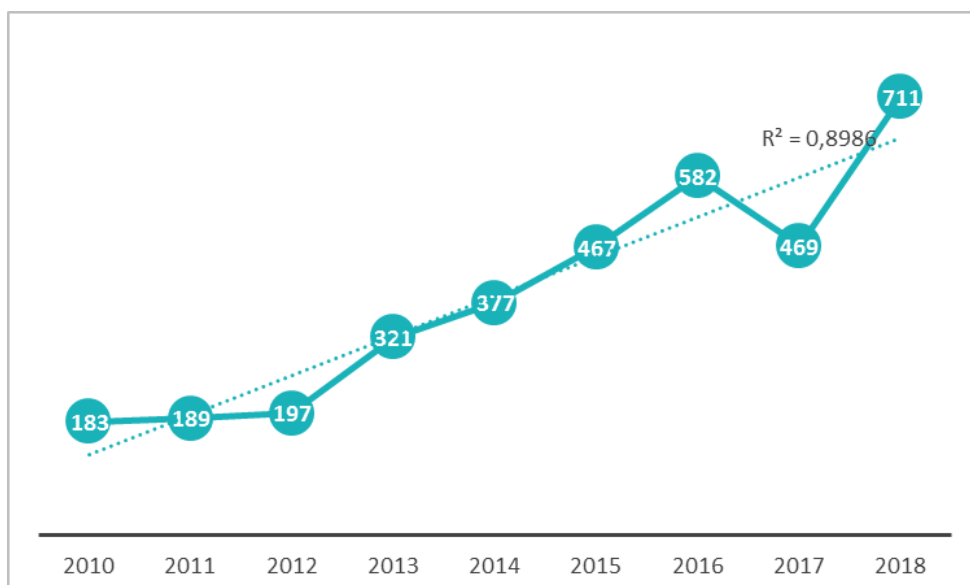


Figure. Evolution des cas de LGV en France 2010-2018.

Cette augmentation des cas en 2018 s'observe également dans les laboratoires qui sont pérennes depuis 2010. Entre 2017 et 2018, on observe une hausse de 51,6% sur l'ensemble du territoire tandis que celle des laboratoires constants est de 58,7 % (figure ci-dessous).

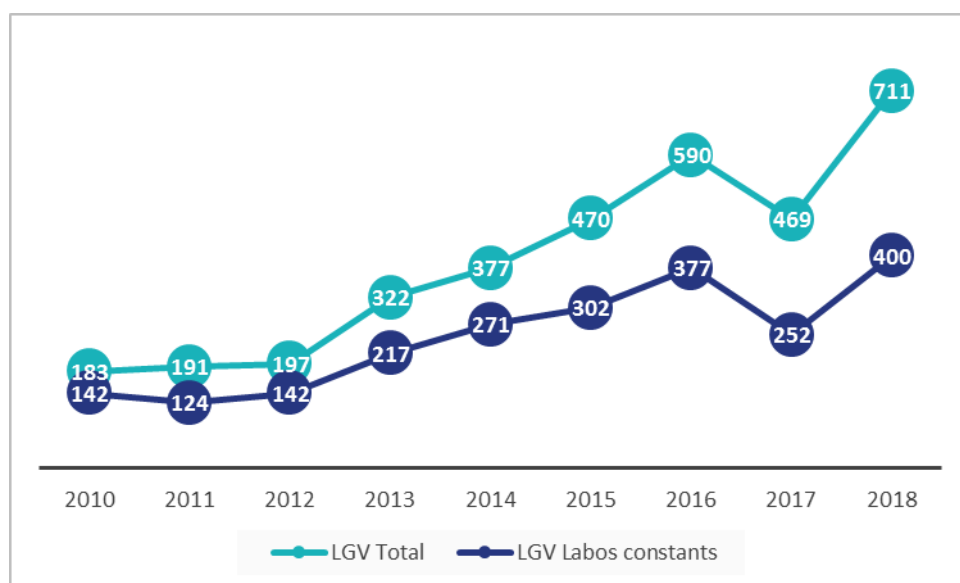


Figure. Évolution du nombre de cas de LGV sur l'ensemble du réseau et sur les laboratoires constants depuis 2010.

3.2.1.2 Anorectites à souches non L

En 2018, le nombre de cas d'anorectites à souches non L a presque doublé (+ 89 %), passant de 1152 cas en 2017 à 2178 cas en 2018. Cette très nette augmentation est due à la surveillance accrue des HSH sous PrEP qui font partie de la population VIH-négative asymptomatique. Dans cette population HIV- ayant une anorectite à souche non L, 48,4% sont des patients sous PrEP. Les caractéristiques des patients sous PrEP dont les échantillons ont été envoyés au réseau en 2017 ont fait l'objet d'une communication orale aux Journées Nationales d'Infectiologie en 2018 et d'une publication soumise à Emerg Infect Dis.

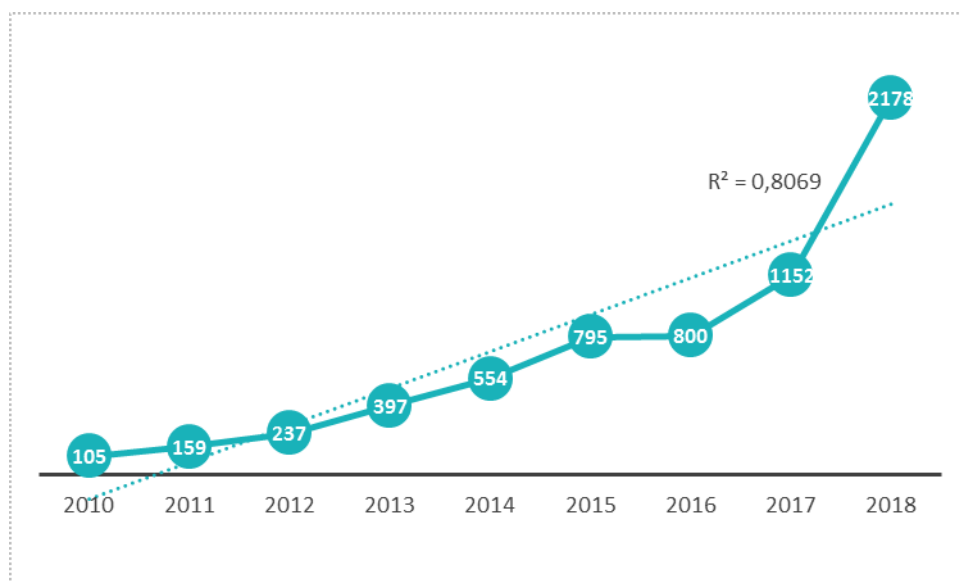


Figure. Évolution des cas d'anorectites non LGV en France 2010-2018.

Notre activité de typage de souches non L continue d'augmenter. Cette hausse s'explique aussi par l'accroissement de la taille de notre réseau de correspondants ; en effet, l'augmentation de 89 % sur l'ensemble de la population est supérieure à celle de nos 10 laboratoires pérennes (+ 57 %).

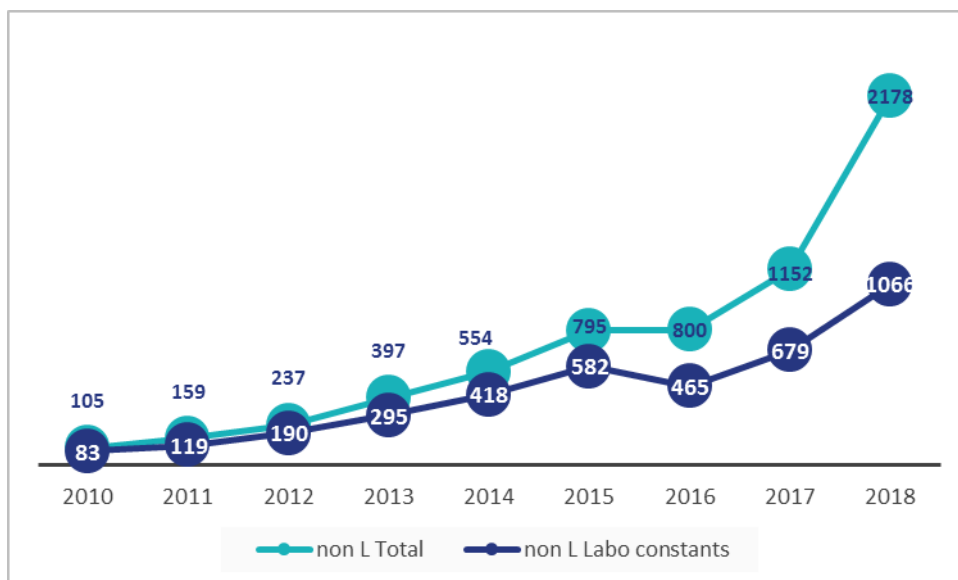


Figure. Évolution du nombre de cas d'anorectites non LGV sur le réseau et sur les laboratoires constants.

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/Ja. Cependant, en 2018, le génovar G est le génovar prédominant comme le montre la figure ci-dessous. De plus, nous avons identifié 16 souches de génovar B (5 en 2017 et 11 en 2018), habituellement décrit 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.

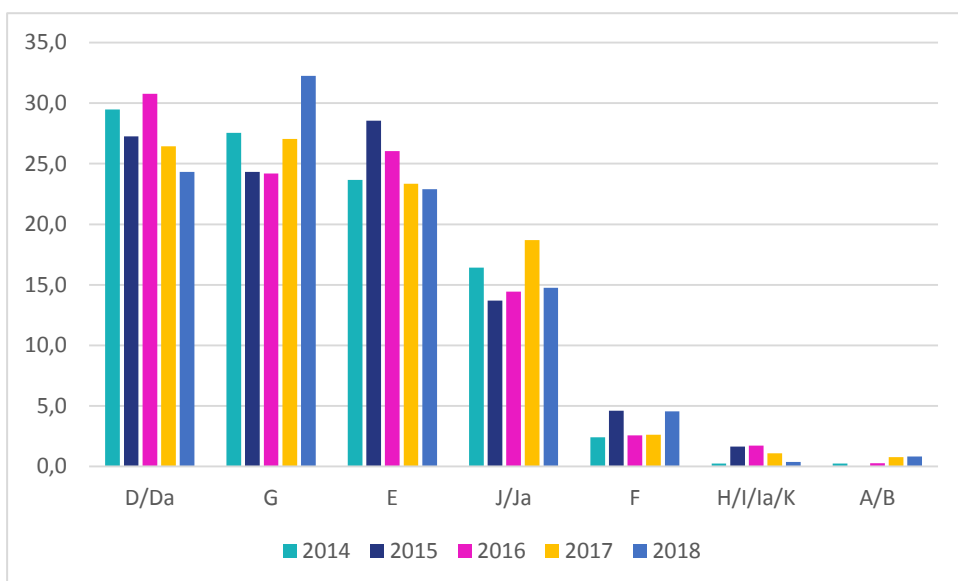


Figure. Génovars retrouvés dans les anorectites non L, 2014-2018.

3.2.1.3 Répartition géographique des anorectites

Les cas de LGV restent de manière prédominante localisés à Paris (2928 cas) comme montré dans les figures ci-dessous. En province, l'ordre de fréquence est le suivant : Lyon (241 cas), Lille-Tourcoing (204 cas), Montpellier (132 cas), Bordeaux (106 cas), Marseille (88 cas) et Strasbourg (50 cas).

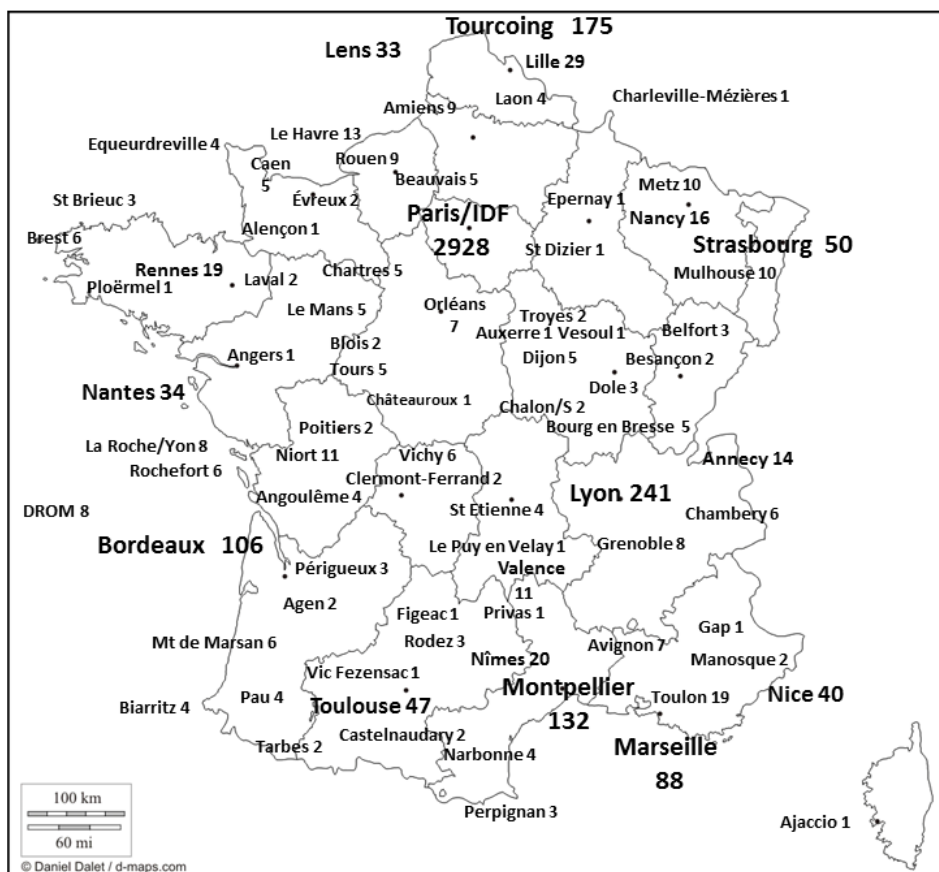


Figure. Répartition géographique des cas de LGV 2010-2018.

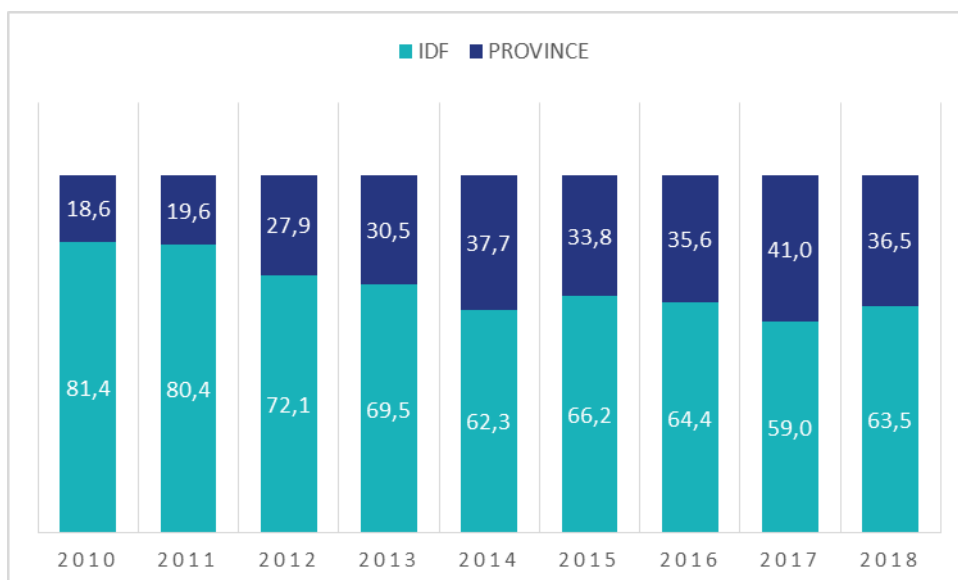


Figure. Répartition des cas de LGV entre Paris et la province.

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 et 2018, (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.

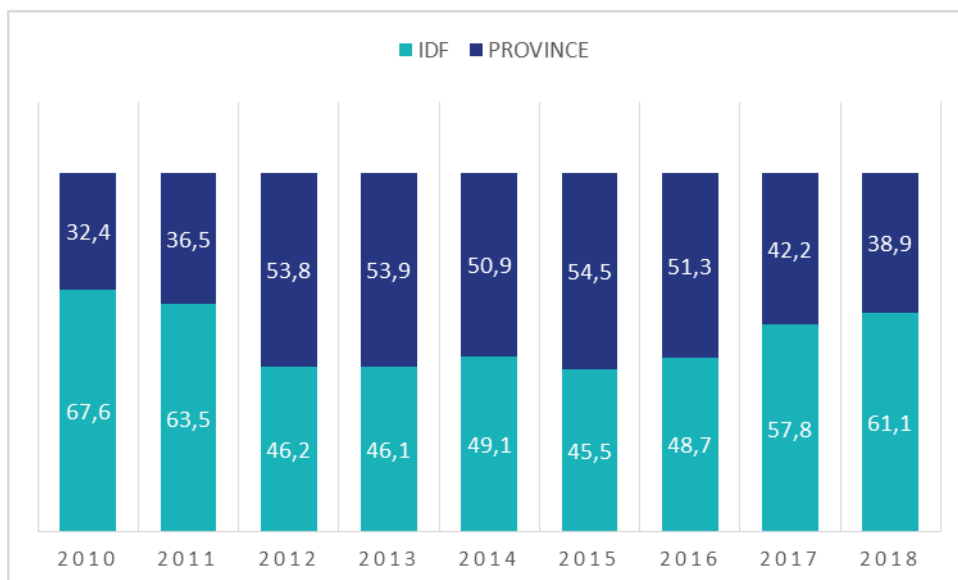


Figure. Répartition des cas d'anorectites non LGV entre Paris et la province.

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

Pour 2018 comme les années précédentes, les infections anorectales touchent majoritairement les hommes qui sont pour la plupart des HSH. Il faut noter 119 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 et 24 en 2018), un seul cas à souche L ayant été publié en 2011 par le CNR.

Les données de l'année 2018 n'étant pas recueillies en totalité, l'analyse des données biologiques, cliniques et comportementales ne sera effectuée qu'en mai 2019 et transmises aux membres du réseau sous la forme d'un poster, comme les années précédentes. Le poster pour l'année 2017 est fourni en annexe.

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+.

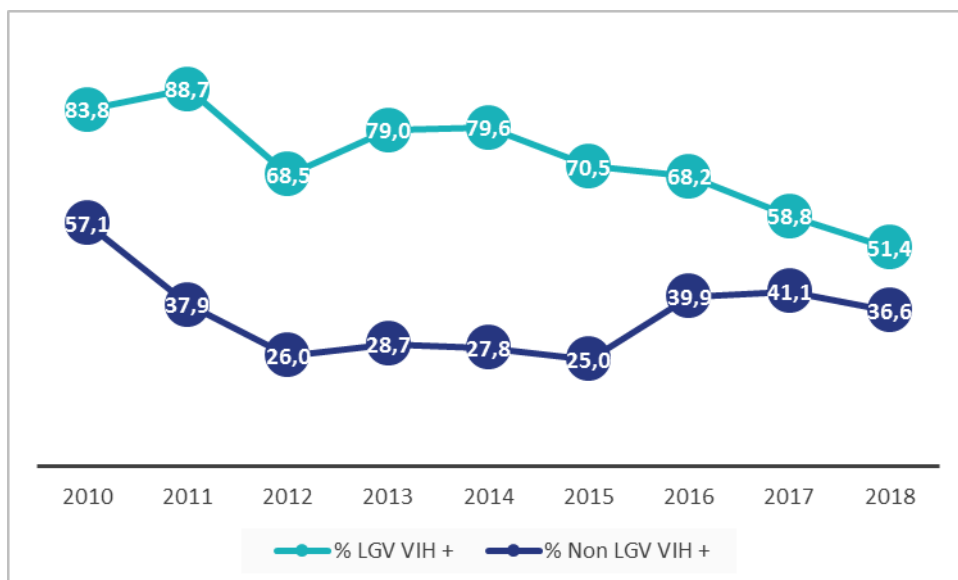


Figure. Nombre de cas de LGV et d'anorectites non LGV parmi les patients séropositifs pour le VIH, 2010-2018.

Le nombre de ces infections étant en augmentation, le CNR en accord avec Santé Publique France souhaite faire évoluer cette surveillance dans un objectif d'efficience et se recentrer sur l'étude des cas de LGV rectale. **L'étude des données cliniques et comportementales sera donc faite à partir de 2019 pour les patients infectés par une souche L.**

Dans le cadre du réseau de surveillance de la LGV à partir de 2019, nous limiterons la surveillance :

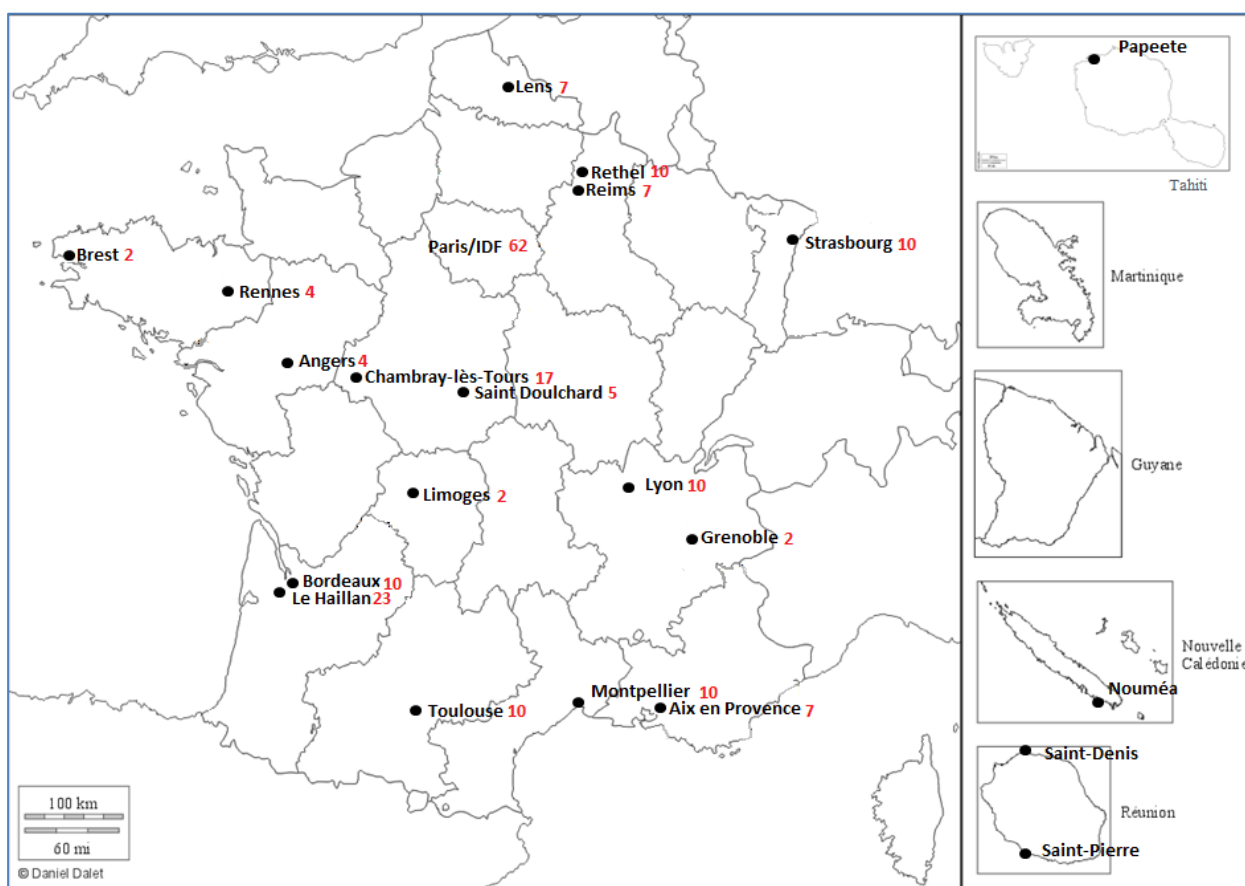
- à tous les patients séropositifs pour le VIH, symptomatiques ou non,
- et aux patients séronégatifs pour le VIH, uniquement symptomatiques.

La surveillance des PRePeurs ne sera plus prise en charge par ce réseau mais pourra faire l'objet d'enquêtes ponctuelles. La surveillance de cette population spécifique de patients VIH négatifs et asymptomatiques au sein du réseau en 2017 et 2018 n'a pas montré plus de cas de LGV dans cette population que chez les sujets VIH négatifs et asymptomatiques ne bénéficiant pas de la PrEP.

3.2.2 Infections à gonocoque

3.2.2.1 Cas d'infections recensées dans l'enquête Ngon2018

Cette enquête avait pour but le recueil de souches de gonocoque dans les différents centres sollicités avec un recueil de 10 souches consécutives en France métropolitaine et 20 souches dans les régions Outre-Mer entre le 1 septembre 2018 et le 31 décembre 2018. A ce jour, le laboratoire de l'Hôpital Saint Louis a reçu les prélèvements provenant de 25 centres, un total de 205 informations cliniques et 177 souches dont 150 congelées à -80° (cf carte ci-dessous).



Sur les 205 échantillons, 45 proviennent de femmes (22%), 151 d'hommes (73,7%) et 9 sont d'origine inconnue (4,4%). Selon les informations cliniques reçues, 18 patients ont un comportement hétérosexuel (8,8%), 31 patients ont un comportement homosexuel (15,1%), 1 seul patient rapporte un comportement bisexuel (0,5%). Enfin, dans 155 cas, les habitudes sexuelles n'ont pas été mentionnées (75,6%). La figure ci-dessous rapporte les cas en fonction de l'âge et du sexe.

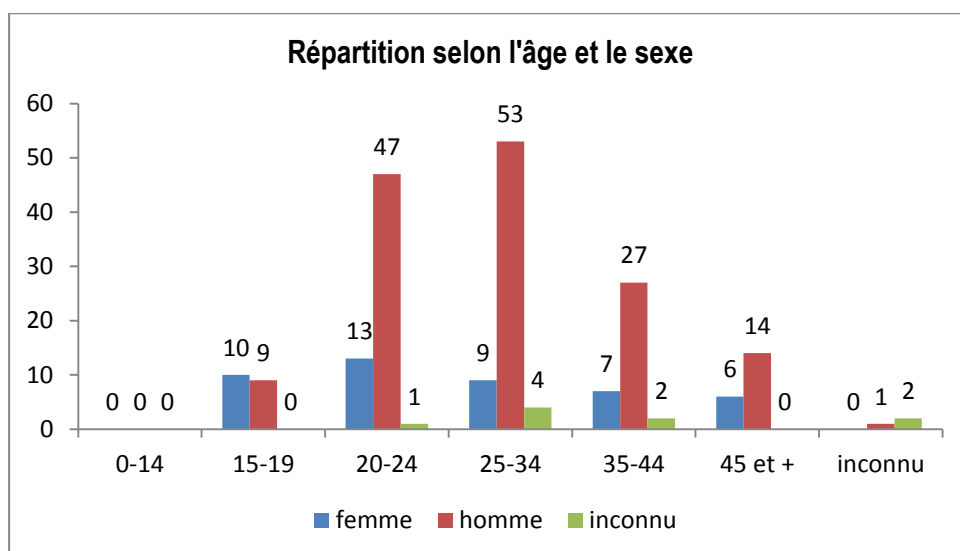


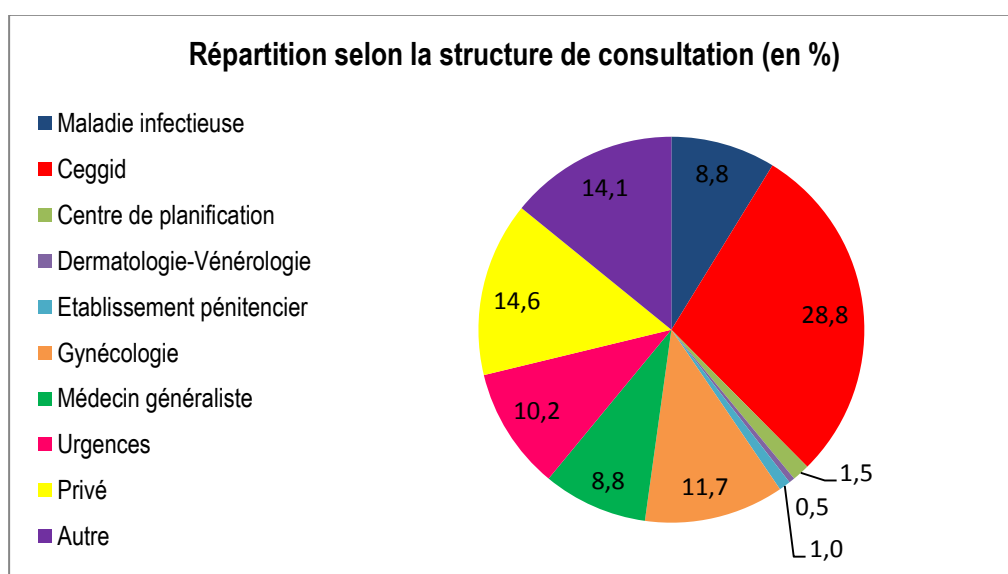
Figure. Répartition des 205 patients de Ngon2018 en fonction de la tranche d'âge et du sexe.

Parmi les prélèvements répertoriés, 154/205 (75,1%) sont issus d'un prélèvement urogénital (41 prélèvements vaginaux, 12 urines, 94 urèthes, 7 autres) et 50/205 (24,3%) sont issus d'un prélèvement extragénital (48 rectaux, 2 pharyngés), 1 seul est d'origine inconnue (0,5%).

Dans cette enquête ciblant uniquement le recueil des souches, les patients étaient symptomatiques dans 50,2% (103/205) des cas avec un point d'appel génital dans 90 % des cas, 16,7% (28/205) venaient pour un dépistage et 34,2% (74/205) des cas étaient non renseignés.

Dans la majeure partie des cas d'infections à gonocoque, il n'y a pas été observé de coinfection avec une autre IST bactérienne (122/205 cas rapportés soit 59,5%). La coinfection la plus fréquente a été observée avec *C. trachomatis* (19%).

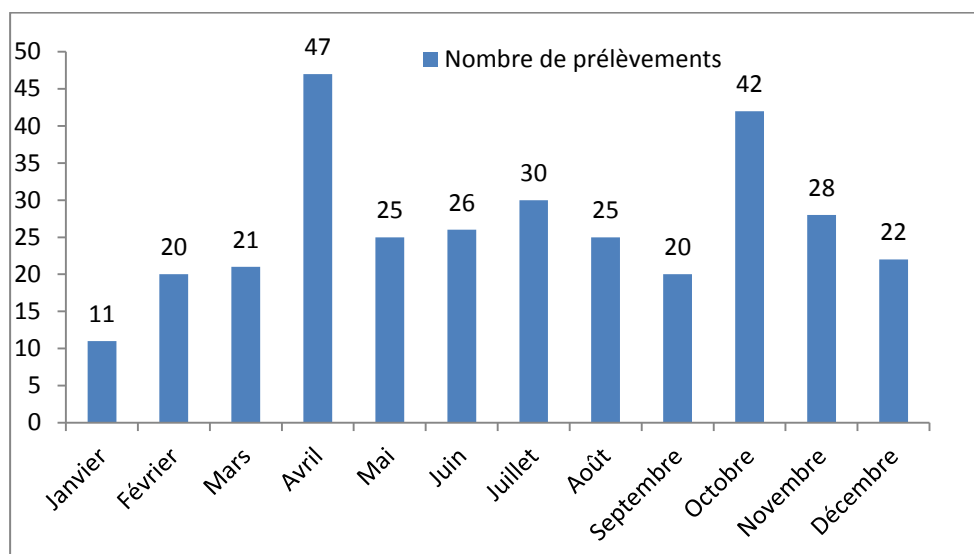
La répartition en fonction de la structure de consultation et du type de prescripteur est visualisée dans la figure ci-dessous.



3.2.2.2 Cas d'infections recensées dans le recueil Renago

Le réseau Renago a recueilli 359 souches issues de toute la France métropolitaine dont 317 ont pu être étudiées. Ces 317 souches ont été isolées entre le 3 janvier 2018 et le 28 décembre 2018 mais la répartition géographique est légèrement biaisée étant donné que 48,3% des souches proviennent du Nord-Est de la France (cf tableau, chapitre 2.5.2). La répartition des prélèvements réalisés chez les patients de Renago a été représentée dans le graphique ci-

dessous



Les souches ont été prélevées chez 256/317 hommes (80,8%), 55/317 femmes (17,3%) et 6 non renseigné (1,9%). La date de naissance des patients était renseignée pour 233/317 patients (73,5%). L'âge moyen des patients était de 32 ans et l'âge médian était de 28 ans. Nous n'avons pas de différence d'âge entre les hommes et les femmes, avec une moyenne respectivement de 32 ans vs 32,1 ans. La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe des 25-34 ans (19,6%). Les différentes tranches d'âge ont été retranscrites dans la figure ci-dessous.

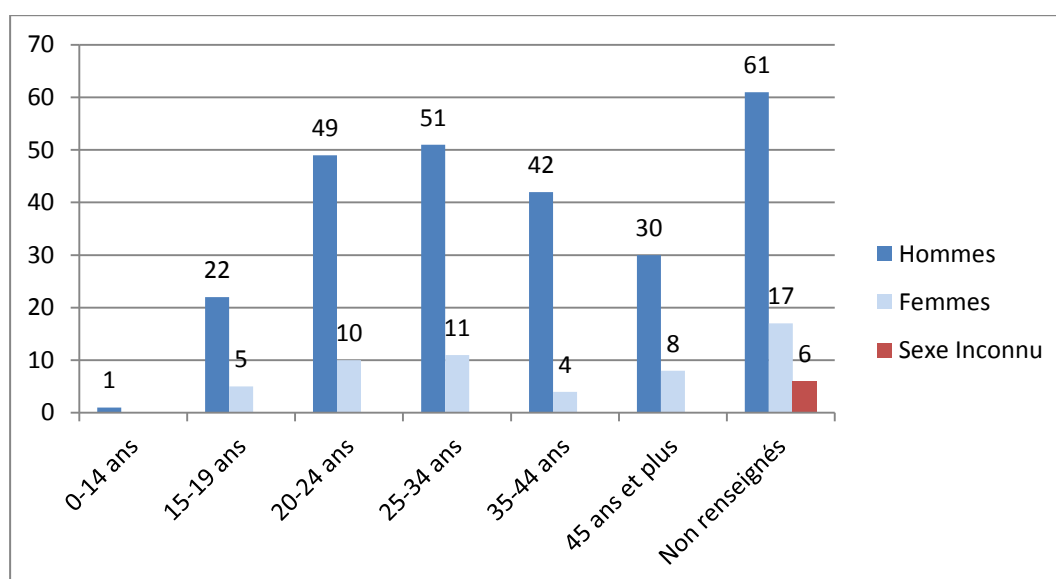


Figure. Répartition des 317 patients de Renago en fonction de la tranche d'âge et du sexe.

3.2.3 Syphilis

3.2.3.1 Dans le cadre du protocole GENOSYPH

Pour l'année 2018, l'ensemble des échantillons a été testé par nPCR. La majorité des prélèvements réceptionnés sont des écouvillons d'origine génitale (53%) et buccale (24%) alors que les écouvillons d'origine anale ou cutanée sont moins représentés à 18 et 5%, respectivement (figure ci-dessous). Seulement 1 sérum a été récolté en 2018. La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR dans l'ensemble des écouvillons est de 26,8% (37/138) se répartissant à 17,4% (24/138) d'échantillons positifs dans les écouvillons génitaux, à 2,9% (4/138) pour les écouvillons anaux, 5,8% (8/138) pour les écouvillons buccaux et 0,7% (1/138) pour les écouvillons cutanés.

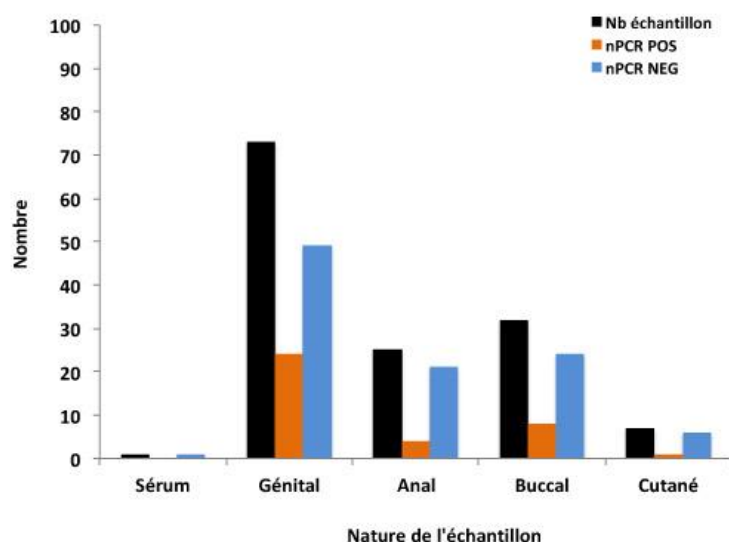


Figure. Répartition de la nature des échantillons et détection du résultat nPCR en 2018.

Pour l'année 2018, le laboratoire associé syphilis a reçu un total de 138 échantillons (sérum + écouvillons) provenant de 138 patients (92% d'hommes, d'âge moyen 36,4 ans). La population incluse dans l'étude microbiologique de la syphilis et GENOSYPH est en majorité masculine (figure ci-dessous) avec un total de 1388 hommes (93%) et de 105 femmes (7%). Le sexe ratio H/F est de 13,2:1 (figure ci-dessous).

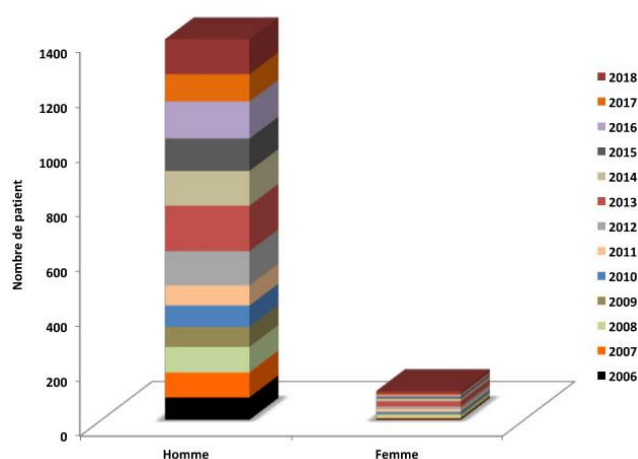


Figure. Répartition du sexe des patients recrutés sur la période 2006-2018.

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.

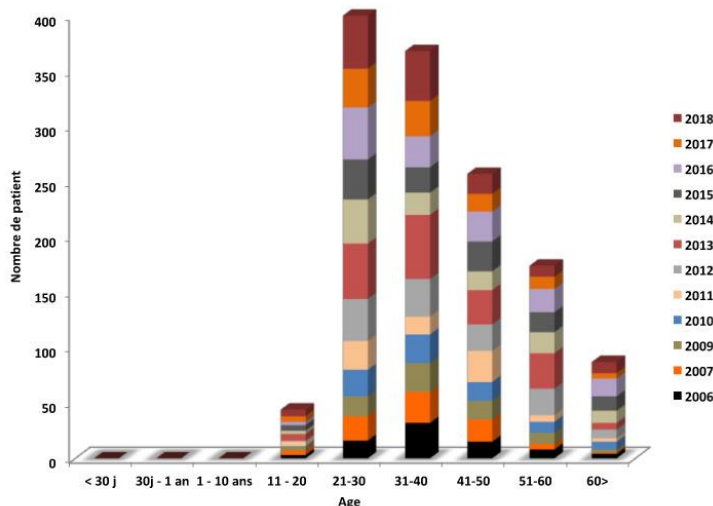


Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2018.

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 laboratoire associé 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 cutanéomuqueuses 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 2013, la proportion d'écouvillons d'origine anale et buccale a progressé pour se stabiliser autour de 20% et 25%, respectivement (figure ci-dessous).

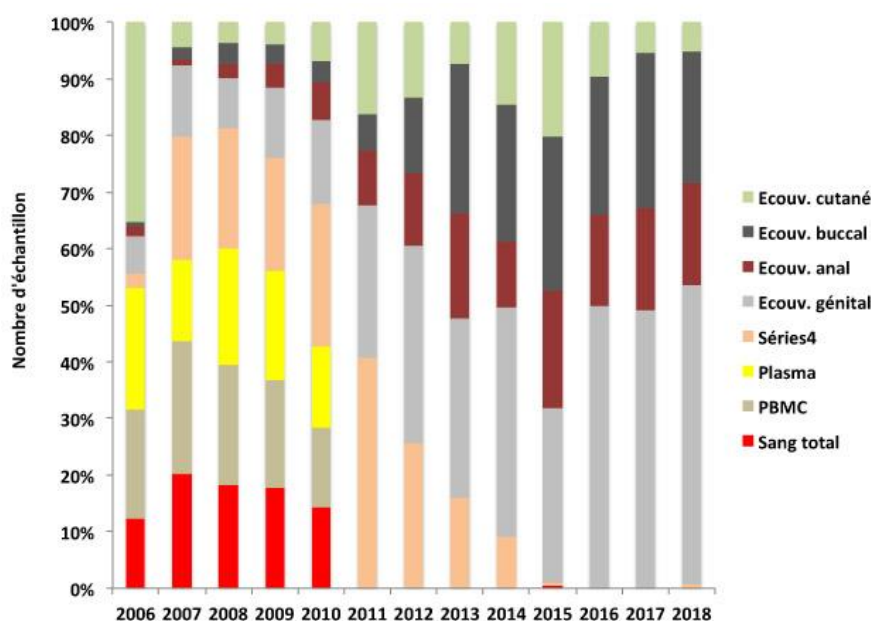


Figure. Répartition du site de prélèvement sur la période 2006-2018.

3.2.3.2 Dans le cadre de l'expertise

Pour l'année 2018, le laboratoire associé syphilis a reçu 883 échantillons correspondant à 784 patients (58,6% d'hommes d'âge moyen 46,9 ans). La détection du génome de *T. pallidum* par nPCR du gène *tpp47* correspond à 567 analyses dont 8,6% de résultats positifs. Les expertises sérologiques représentent 1027 analyses dont 49% de résultats positifs, portant à un total de 1594 analyses réalisées pour expertise par le CNR IST syphilis sur l'année 2018.

Les échantillons reçus pour expertise moléculaire se répartissent comme suit : sérums (1,2%), sang total (5,5%), LCR (49,5%), écouvillons (22%), biopsies (4,6%), liquides amniotiques (1,2%), placentas (6,5%), sang cordon et cordon (5,6%) et autres (3,5%) (figure ci-dessous). Les échantillons « autre » correspondent à : liquide gastrique (1), humeur aqueuse (2), ADN extrait de chambre antérieure (1), sécrétions nasales (3), biopsie osseuse (1), liquide articulaire (2), liquide péritonéal (1), prélèvements cutanés sur plaie (1), urine (1), fragment ostéonécrose (1).

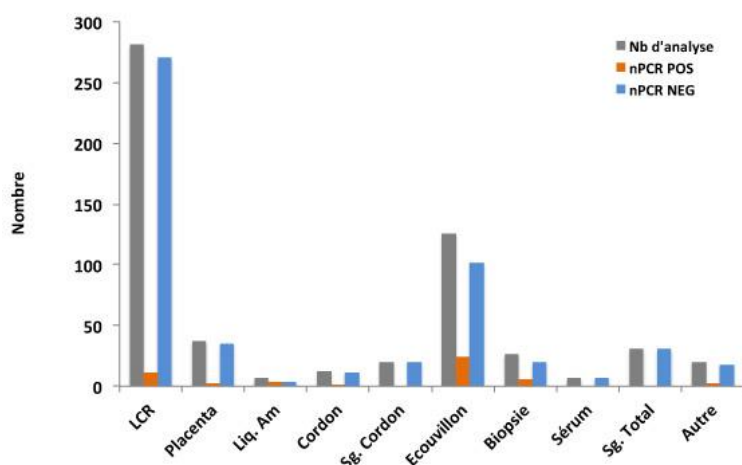


Figure. Répartition de la nature des échantillons analysés par nPCR en 2018.

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. 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 2018, nous avons reçus 598 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 64,4% de l'ensemble des analyses réalisées.

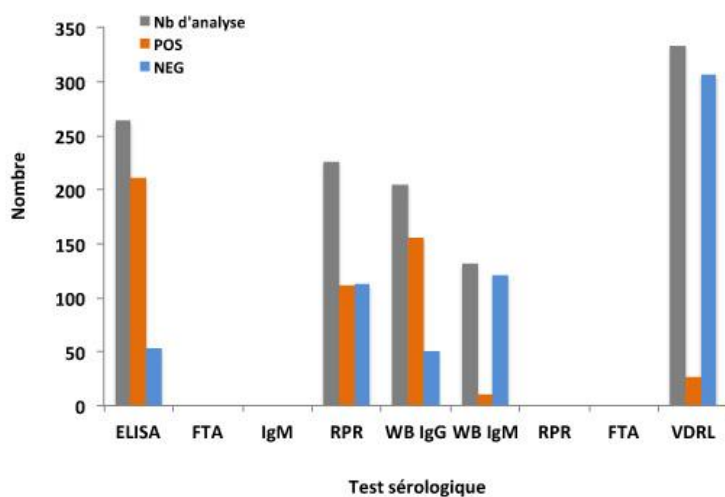


Figure. Répartition de la nature des analyses sérologiques en 2018.

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, de 32% en 2017 et de 22% en 2018 (figure ci-dessous).

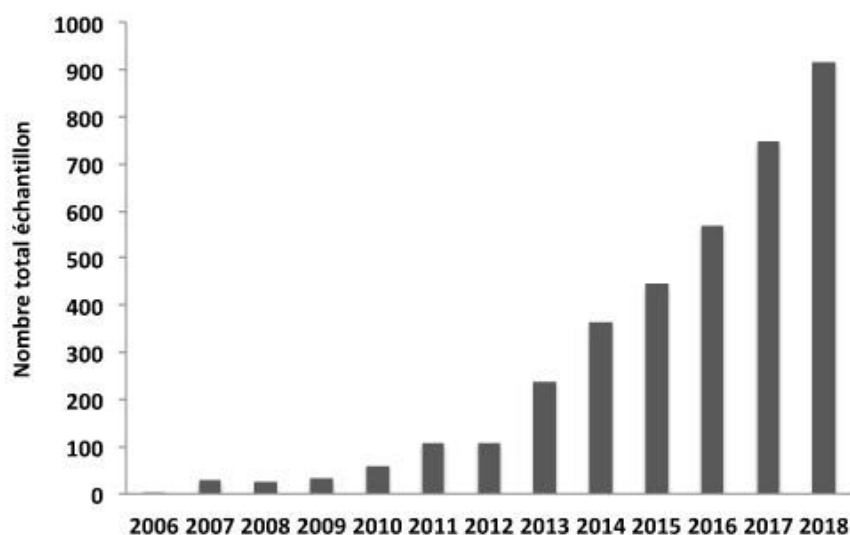


Figure. Echantillons extérieurs répertoriés par le CNR syphilis sur la période 2006-2018.

C'est une population à dominante masculine (figure ci-dessous) avec un total de 1986 hommes (63%) et de 1162 femmes (36,9%). Le ratio sexe ratio H/F est de 1,7 :1. La tranche d'âge 21-50 ans est majoritaire et représente 48% des individus. Les nouveau-nés d'un âge inférieur à 30 j représentent 12,6% de la population analysée alors que la population âgée de 60 ans et plus représente 20% des échantillons envoyés (figure ci-dessous).

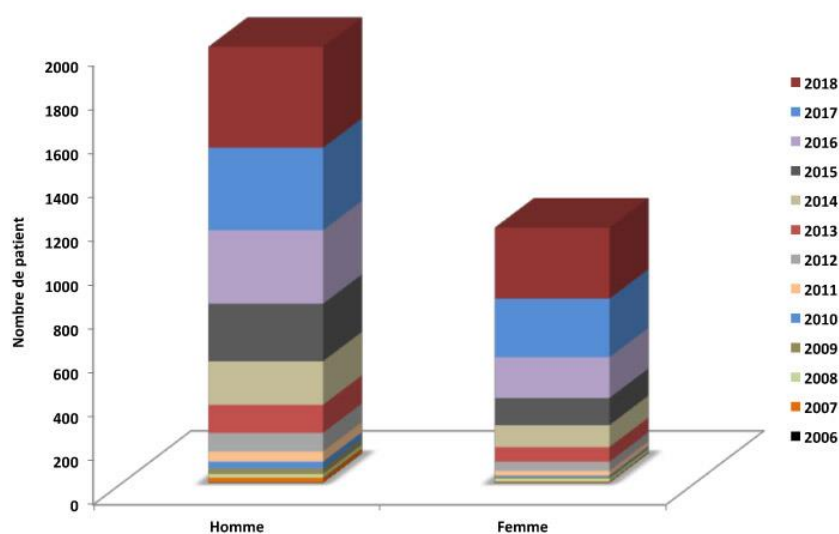


Figure. Répartition du sexe des patients sur la période 2006-2018.

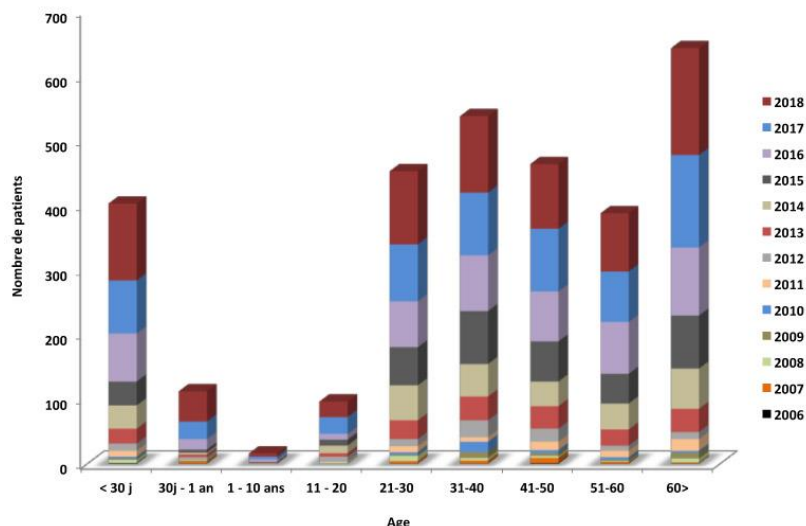


Figure. Répartition en fonction de l'âge des patients sur la période 2006-2018.

Il est intéressant de noter l'évolution de la nature des échantillons reçus par le laboratoire associé syphilis sur la période 2006-2018 (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 12,3% et 29,8% des échantillons. Les biopsies, hors prélèvements périnataux, sont à 13,3%. Les prélèvements périnataux (liquide amniotique, placenta, cordon) représentent 10% des prélèvements. Les LCR représentent 31% des échantillons sur la période 2006-2018.

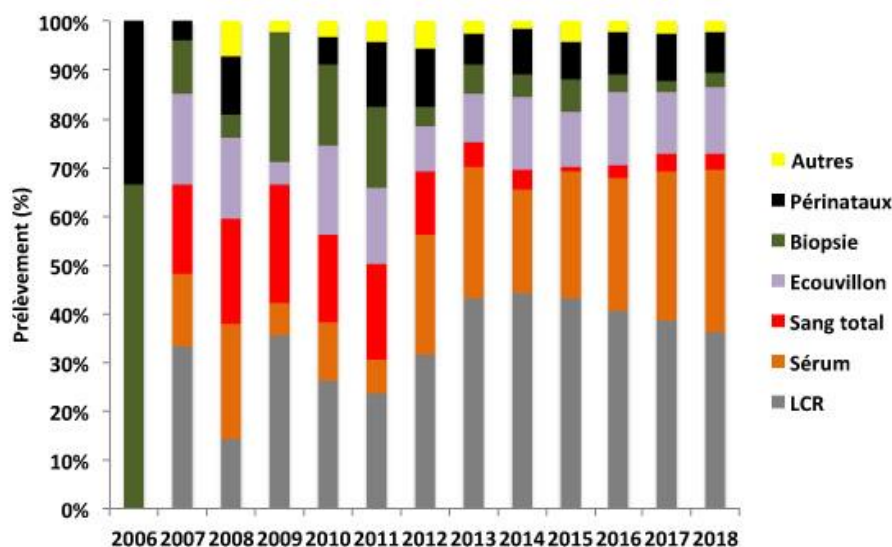


Figure. Répartition de la nature des échantillons reçus par le CNR syphilis sur 2006-2018.

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 Etude IPERGAY

Le CNR des IST bactériennes (B. Berçot et C. Bébéar) a évalué la **prévalence et l'incidence des infections à *M. genitalium* et la résistance des infections à *M. genitalium* et *N. gonorrhoeae* chez les HSH PrePeurs prenant ou pas de la doxycycline en prophylaxie post-exposition (PEP)**, inclus dans l'essai ANRS ouvert IPERGAY coordonné par J.-M. Molina.

M. genitalium chez les PrePeurs dans la cohorte Ipergay

Une PCR en temps réel *M. genitalium* a été réalisée à l'inclusion et au bout de 6 mois dans les urines de tous les sujets et les résultats ont été transmis aux cliniciens. Les 2 autres sites, pharyngés et anaux, ont été screenés rétrospectivement à la fin de l'étude à partir des échantillons congelés. La détection de *M. genitalium* a été réalisée avec le kit C. trachomatis/Ureaplasma/*M. genitalium* Real-TM (Sacace, Biotechnologies) à partir des urines et avec le kit *M. genitalium*/T. vaginalis sur le Cobas 6800 (Roche diagnostics) à partir des écouvillons anaux et pharyngés. La résistance à l'azithromycine et aux fluoroquinolones ont été recherchées rétrospectivement par la détection des mutations de l'ARNr 23S (ResistancePlusTM MG test, SpeeDx, Australia) et du gène *parC* (PCR et séquençage).

De juillet 2015 à janvier 2016, 210/232 (90,5%) participants ont été testés. La prévalence de l'infection à *M. genitalium* à l'inclusion était de 10,5% tous sites confondus (95% CI: 6.6-15.9) et de 6,3%, 4,3% and 0,5% pour les urines, les anus et les gorges. Onze participants ont acquis une infection asymptomatique à *M. genitalium* à 6 mois, 7 dans le bras PEP et 4 dans le bras no PEP, sans différence significative entre les 2 bras.

Le taux global de résistance de *M. genitalium* à l'azithromycine et aux fluoroquinolones était respectivement de 69,6% and 14,8%, sans différence entre les 2 bras ($p=1,00$ pour AZM, $p=0,27$ pour FQ). Les mutations retrouvées étaient : A2058G/T ou A2059G dans l'ARNr 23S et S83I/B, D87Y and A88T dans la QRDR de *ParC*.

Sur les 11 infections urinaires traitées par macrolides, 7 ont été guéries. Les 5 infections avec un *M. genitalium* sauvage ont été guéries par azithromycine alors que seulement 2 des 6 infections à *M. genitalium* résistant l'ont été.

En conclusion, la prévalence de l'infection à *M. genitalium* chez les HSH sous PrEP est élevée avec un fort taux de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones. La PEP par doxycycline n'influence pas l'incidence des infections à *M. genitalium*. Cette étude a fait l'objet d'une présentation affichée à la CROI 2019 et une publication est en préparation.

N. gonorrhoeae chez les PrePeurs dans la cohorte Ipergay

La clonalité et la résistance des infections à *N. gonorrhoeae* a été évaluée chez les HSH PrePeurs prenant ou pas de la doxycycline en PEP de cette même cohorte. Pour cette sous-étude randomisée (1:1) ouverte prospective, tous les sujets ont été testés à la base puis à 2, 4, 6, 8 et 10 mois. La détection de *N. gonorrhoeae* a été effectuée par PCR en temps réel dans les 3 sites (urine, oro-pharyngé et anal). Les échantillons détectés positifs par TAAN ont été centralisés au laboratoire associé du CNR IST et étudiés pour la détection de la résistance aux tétracyclines. L'acquisition du déterminant *tet(M)* ou/et des mutations de la protéine S10 a été recherchée. La clonalité ciblant les deux allèles *porB* et *tbpB* (NG-MAST) a été recherchée par une PCR nichée.

D'août 2015 à juin 2016, 210 patients ont été inclus dans l'étude PEP doxycycline. Au cours de cette période, 56 patients (26,6 %) ont été détectés positifs par PCR. Soixante-dix échantillons détectés positifs étaient 2 urines, 32 anus et 36 gorges provenant de 43 participants. Cinq infections à *N. gonorrhoeae* étaient présentes à l'inclusion et 38 patients ont contracté une infection à *N. gonorrhoeae* au cours de l'étude (19 dans chaque groupe).

Le taux global de résistance de *N. gonorrhoeae* aux tétracyclines était très élevé (31/38, 81,5%) dont 25/38 (65,8%) à bas niveau et 6/38 (15,8%) à haut niveau sans différence entre les bras ($p=0,40$). Quinze profils NG-MAST ont été caractérisés et les profils NG-MAST les plus fréquents étaient les sequence type ST 5624 (21 %), ST 5441 (12,5 %) et ST 5793 (12,5 %). Le génotype multirésistant G1407 n'était pas présent dans ces échantillons.

En conclusion, le taux de résistance du gonocoque aux tétracyclines était très élevé chez les Prepeurs HSH (81,5 %). La PEP à la doxycycline n'a cependant pas augmenté ni l'incidence du gonocoque ni le taux de résistance aux tétracyclines. Il n'a pas été observé de cas clonalement reliés et les génogroupes observés ont déjà été décrits dans

la population HSH. Une étude avec un recueil d'un nombre de souches de gonocoque plus important est prévue pour la continuité de cette exploration lors de l'étude Prévenir (début mi-2019) (cf projet).

3.3.2 Surveillance de la sensibilité de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* aux antibiotiques en France métropolitaine en 2018 (MYCOMET 2018)

Les échantillons cliniques positifs à *Ureaplasma* spp. et/ou *M. hominis* en culture ont été collectés en France métropolitaine du 15 septembre au 15 octobre 2018, conservés à -20°C puis envoyés au CNR via un transporteur mandaté (BioLogistic). Parmi les 325 échantillons collectés, 306 échantillons étaient positifs à *Ureaplasma* spp. et 49 échantillons étaient positifs à *M. hominis* dont 35 avaient une co-infection avec *Ureaplasma* spp.

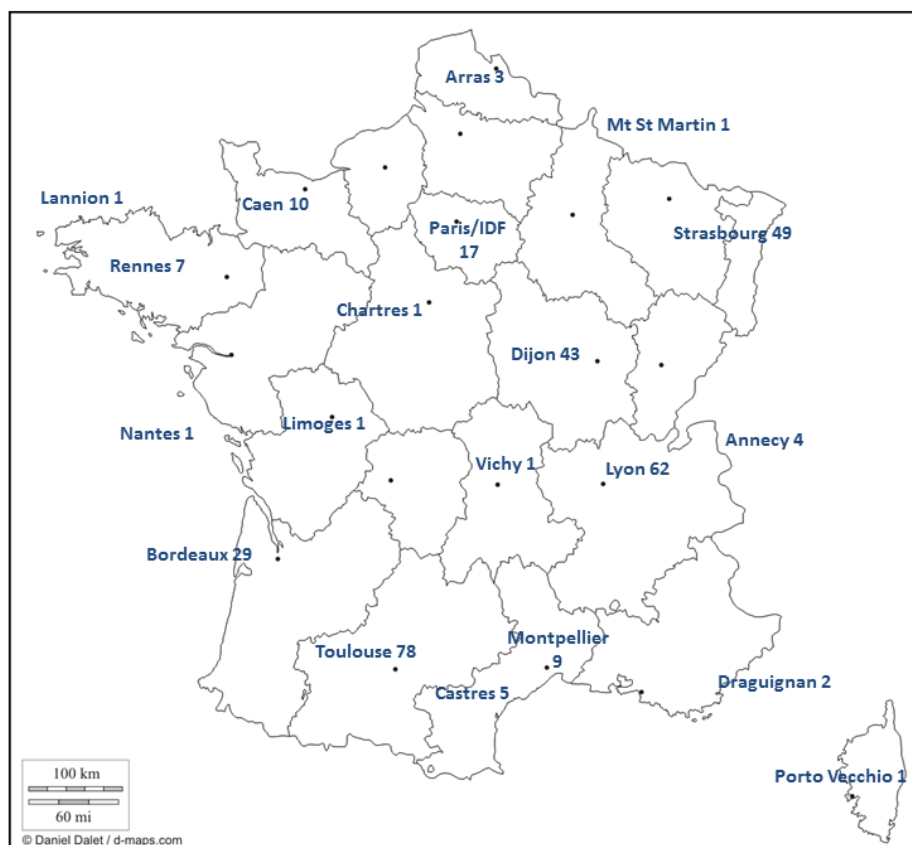


Figure. Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par ville.

Tableau. Répartitions des échantillons de *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. par centre.

Centres participants	Nombre d'échantillons			
	<i>M. hominis</i>		<i>Ureaplasma</i> spp.	
	Reçu	Culture +	Reçu	Culture +
CERBA	11	4	34	15
CH CAEN	2	1	8	5
CHU BORDEAUX	5	5	27	26
CHU DIJON	5	0	42	19
CHU LIMOGES	0	0	1	0
CHU LOUIS MOURIER	0	0	1	0
CHU LYON	7	5	60	19
CHU MONTPELLIER	0	0	4	0
CHU NANTES	1	1	1	1
CHU RENNES	1	1	6	2
CHU TOULOUSE	3	1	39	17

BIO 67 STASBOURG	7	0	48	1
CLINIQUE PASTEUR TOULOUSE	7	2	35	6
Total général	49	20	306	111

Nous avons déterminé les CMI de 7 antibiotiques (tétracycline, doxycycline, lévofloxacine, moxifloxacine, érythromycine, azithromycine et clindamycine) pour les 131 souches qui ont pu être remises en culture au CNR, soit 40% des échantillons positifs envoyés. Les critères de détermination de résistance utilisés sont ceux définis par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les mycoplasmes humains, seuls existants à l'heure actuelle.

Tableau. CMI des souches de *M. hominis* et *Ureaplasma* spp.

Famille antibiotique	Agent antibiotique	<i>M. hominis</i> (20)		<i>Ureaplasma</i> spp. (111)	
		CMI 50	CMI 90	CMI 50	CMI 90
Tétracyclines	Tétracycline	0,25	0,5	0,25	1
	Doxycycline	0,06	0,125	0,125	0,25
Fluoroquinolones	Lévofloxacine	0,25	0,5	0,5	1
	Moxifloxacine	0,06	0,06	0,25	0,5
Macrolides		ND	ND	0,5	1
	Azithromycine	ND	ND	0,5	0,5
	Clindamycine	0,06	0,125	ND	ND

ND : non déterminé.

Parmi les 20 souches de *M. hominis* analysées, nous avons observé 5 % (1/20) de résistance à la tétracycline et aucune résistance aux fluoroquinolones ou à la clindamycine. Sur les 111 échantillons à *Ureaplasma* qui ont repoussé, 74 sont positifs à *U. parvum*, 30 à *U. urealyticum* et 7 aux 2 espèces. Parmi les 111 souches de *Ureaplasma* spp., nous avons observé 2,7 % de résistance à la tétracycline (3/111, 1 *U. parvum*, 2 *U. urealyticum*), 5,4 % de résistance à la lévofloxacine (6/111) et aucune résistance à la moxifloxacine et à l'érythromycine. Concernant *Ureaplasma* spp., nous n'avons pas observé de différence homme/femme pour la résistance aux tétracyclines ou aux fluoroquinolones ($p=0,5$; test exact de Fisher). La prévalence de la résistance aux tétracyclines est plus faible que celle décrite à Bordeaux sur la période 2010-2015 (15 % pour *M. hominis*, 7,5 % pour *Ureaplasma* spp.). En revanche, la résistance de *Ureaplasma* spp. à la lévofloxacine est plus haute que celle décrite à Bordeaux entre 2010 et 2015 (1,2 %).

Toutes les souches résistantes à la tétracycline possèdent le gène *tet(M)*. Les 6 souches de *Ureaplasma* spp. (4 *U. parvum*, 2 *U. urealyticum*) résistantes à la lévofloxacine sont mutées au niveau du gène *parC* (Ser83(80)Leu, numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèse) sans autre mutation dans les QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) *gyrA*, *gyrB* et *parE*.

3.3.3 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine et en Outre-Mer en 2017 et en 2018

3.3.3.1 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et fluoroquinolones en Outre-Mer en 2017

Une collaboration avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert) nous a permis de collecter et typer 446 échantillons urogénitaux, pharyngés ou anaux positifs pour *C. trachomatis*, provenant de la Guyane, la Martinique et la Guadeloupe. Nous avons réalisé une recherche de *M. genitalium* par qPCR sur ces 432 de ces échantillons et avons trouvé 40 échantillons positifs ; ils provenaient de 40 patients (80% de femmes et 20% d'hommes). Soixante pour cent des échantillons venaient de la Guyane Française. La prévalence de co-infection par *C. trachomatis* et *M. genitalium* était de 9,25%.

Tableau. Répartition des échantillons par territoire et par sexe.

	F n (%)	H n (%)	TOTAL	%
Guyane	22 (91,6)	2 (8,4)	24	60
Guadeloupe	4 (66,7)	2 (33,3)	6	15
Martinique	6 (60)	4 (40)	10	25
Total	32	8	40	100

L'âge moyen des patients était de 21,5 ans et l'âge médian était de 20 ans (avec une amplitude de 13 ans à 36 ans). Nous n'avons pas différence d'âge entre les hommes et les femmes, avec une moyenne respectivement de 22 ans vs 21,4 ans ($p < 0,05$; test de Student). La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe inférieure à 20 ans (47,5 %) ; 53,1 % des femmes avaient moins de 20 ans et 62,5 % des hommes étaient âgés de 20 à 24 ans. Parmi les échantillons féminins, 62,5% (20/32) étaient des écouillons cervico-vaginaux, 34,4% (11/32) des premiers jets d'urine et 3,1% (1/32) des prélèvements anaux. Les échantillons masculins provenaient exclusivement d'urine de premier jet (8/8).

La résistance aux macrolides a été recherchée par une PCR en temps réel « maison » de type FRET ou par une PCR multiplex commercialisée en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET (kit ResistancePlus™ MG, SpeedX). Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature précise de la mutation.

Trois échantillons ont été détectés mutés pour l'ARNr 23S mais la position exacte de la position n'a pas pu être déterminée par séquençage. Les 3 patients présentant des mutations étaient 1 femme de 18 ans de la Martinique, 1 femme de 20 ans de la Guyane française et 1 homme de 18 ans de la Guadeloupe. La prévalence de la résistance aux macrolides était de 9,3% (3/32). Ce faible pourcentage a été confirmé par l'étude de plus grande ampleur menée en 2018 et contraste avec la prévalence de la résistance décrite en métropole (cf paragraphes suivants).

Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR du gène *parC*, codant la topoisomérase IV, cible de ces antibiotiques. Nous n'avons pas détecté d'échantillons présentant une résistance aux fluoroquinolones dans cette étude.

3.3.3.2 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et fluoroquinolones à Bordeaux en 2018

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 2018 la valeur de **33%** (figure ci-dessous).

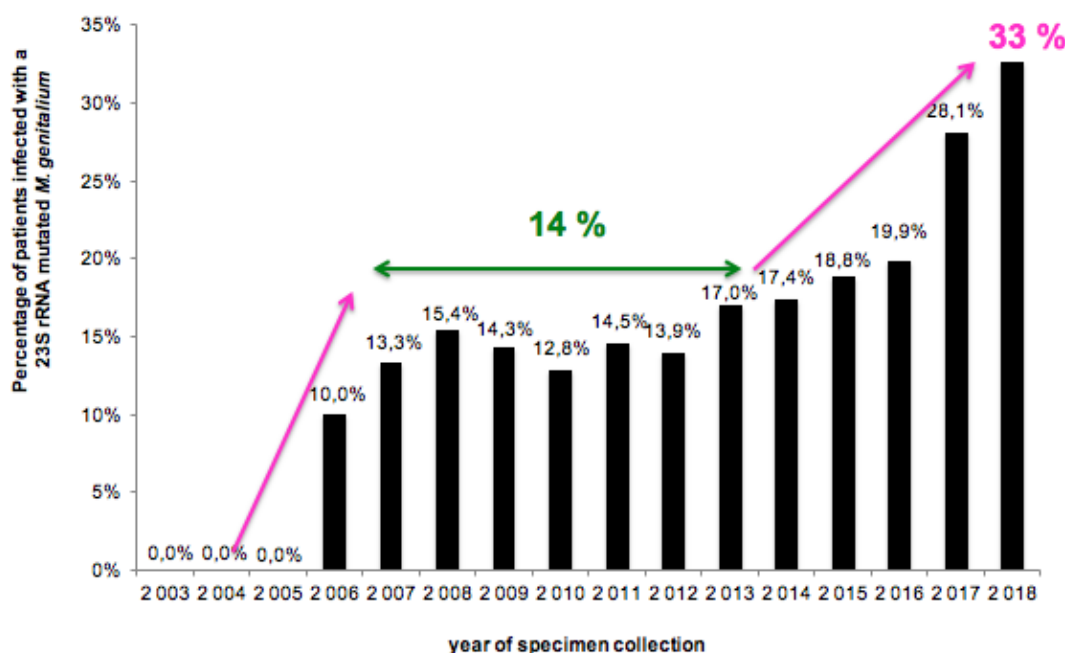


Figure. Evolution de la résistance aux macrolides de *M. genitalium* au CHU de Bordeaux entre 2003 et 2018.

Pour l'année 2018, la résistance aux **fluoroquinolones** a été étudiée chez les patients bordelais positifs à *M. genitalium* par PCR et séquençage de la QRDR *parC*. Pour les patients pour lesquels une amplification et un séquençage de la QRDR ont été obtenus (320), la prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était de **1,9%** (6/320). Il s'agissait de 3 mutations Asp87(84)Tyr, 1 mutation Asp87(84)His, 1 mutation Ser83(80)Ile et 1 mutation Asp82(79)Asn, numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèse. Aucun patient bordelais ne présentait une double résistance, à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones.

3.3.3.3 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones en France métropolitaine (MYCOMET 2018)

L'objectif de cette enquête a été de déterminer la résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones pour **évaluer la prévalence nationale de cette résistance**.

Dans les centres participants, pendant un mois du 15 septembre au 15 octobre 2018, tous les échantillons positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge) ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier 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. La résistance aux macrolides a été recherchée par une PCR en temps réel « maison » de type FRET ou par une PCR multiplex commercialisée en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET (kit ResistancePlus™ MG, SpeedX). Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature précise de la mutation. Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR du gène *parC*. Un total de **339 échantillons positifs à *M. genitalium* ont été reçus de 20 centres** en France métropolitaine.

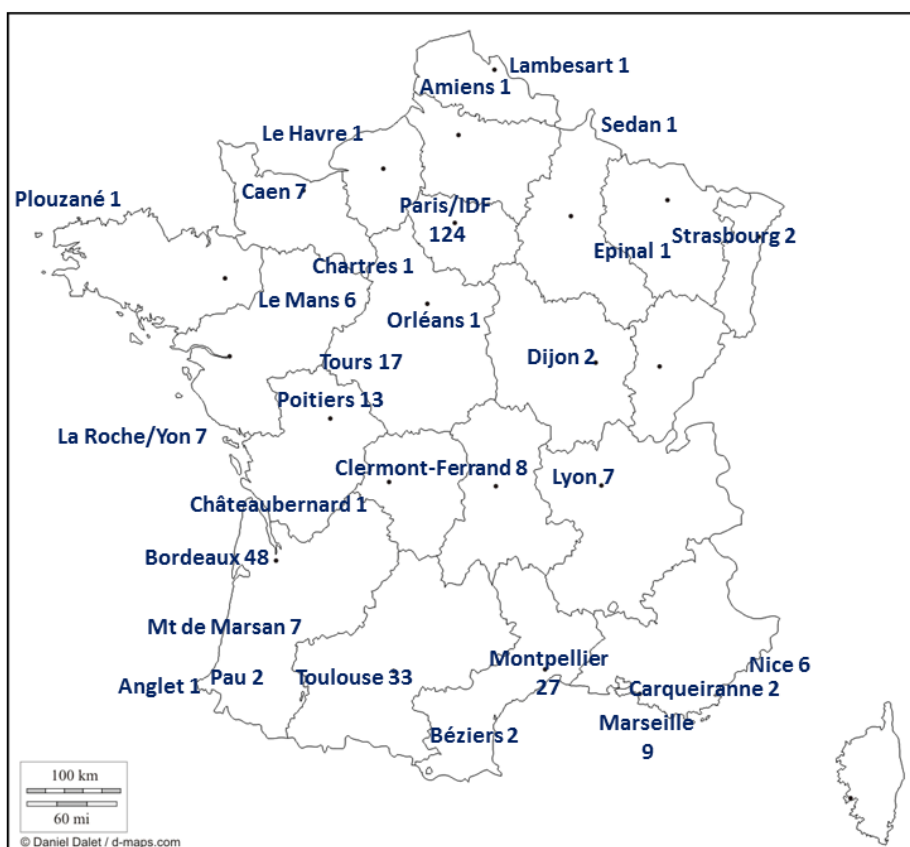


Figure. Répartition géographique des centres participants et nombre d'échantillons reçus par ville.

Population étudiée

Au total, **339 échantillons provenant de 335 patients** (42,1% femmes et 57,9% d'hommes) ont été collectés entre le 15 septembre et le 15 octobre 2018. Parmi les échantillons féminins, 90,8% (128/141) étaient des écouillons cervico-vaginaux, 8,5% (12/141) des premiers jets d'urine et 0,7% (1/141) des prélèvements rectaux. Les échantillons masculins comprenaient 49,5% (98/198) d'urine de premier jet, 39,9% (79/198) de prélèvements rectaux, 7,1% (14/198) de prélèvements de gorge, 3,5% (7/198) de prélèvements urétraux. Chez les femmes, la sensibilité de la détection de la résistance aux macrolides était de 78,1% (100/129) dans les prélèvements cervico-vaginaux et 58,3% (7/12) dans les urines. Chez les hommes, la sensibilité de la détection de la résistance aux macrolides était de 86,1% (68/79) dans les prélèvements ano-rectaux, 85,7% (6/7) pour les prélèvements urétraux et 82,6% (81/98) dans les urines.

L'âge moyen des patients était de 31,3 ans et l'âge médian était de 29 ans (avec une amplitude de 15 ans à 68 ans). Les hommes étaient statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 35,2 ans vs 26,1 ans ($p < 0,001$; test de Student). Nous n'avons pas d'information concernant l'âge pour six patients. La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe 21-25 (24,6%), 37,6% des femmes avaient entre 21 et 25 ans et 23,3% des hommes étaient âgés de 25 à 30 ans.

Parmi les patients ayant accepté de renseigner leur orientation sexuelle, **71,4% (50/70) déclaraient avoir des pratiques hétérosexuelles**. Sur les 31 hommes ayant déclaré leurs pratiques, 58,1% (18/31) étaient des HSH. À noter que 80,3% (269/335) des patients avaient des pratiques inconnues.

Enfin parmi les patients pour lesquels une recherche de *C. trachomatis* a été faite, 12,9% étaient positifs (38/295). La prévalence de la co-infection avec *C. trachomatis* était de 17,2% chez les femmes (20/116) vs 10,1% chez les hommes (18/178) ($p = 0,07$; test du Chi2). En ce qui concerne *N. gonorrhoeae*, 3% des patients testés (11/294) étaient positifs. La prévalence de la co-infection avec *N. gonorrhoeae* était de 5,5% chez les femmes (6/115) vs 2,9% chez les hommes (5/17), ($p = 0,3$; test exact de Fisher). Parmi les patients pour lesquels nous avons le statut VIH, une séronégativité était notée pour 65,6% (101/154) des patients, tandis que **34,4% (53/154) d'entre eux était séropositifs au VIH**. Le statut sérologique VIH était inconnu pour 54% (181/335) des patients. Une différence statistiquement significative était

à noter entre les hommes et les femmes ; en effet, 43,7% des hommes (52/119) pour lesquels nous avons le statut VIH étaient positifs pour *M. genitalium* vs 2,9% des femmes (1/35) ($p < 0,001$; test de Chi²).

Prévalence de la résistance aux macrolides

Parmi les 270 échantillons pour lesquels une amplification a été obtenue, 57% (154/270) étaient sensibles aux macrolides tandis que **43% (116/270) d'entre eux étaient résistants aux macrolides** (tableau ci-dessous).

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

Centres participants	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 résistance aux fluoroquinolones*	Nb (%) de patients avec sensibilité aux fluoroquinolones*	Nb (%) patients avec une double résistance**
BARLA NICE	Privé	5	5	1 (20)	4 (80)	0	5 (100)	0
BIO 67 STRASBOURG	Privé	2	2	1 (50)	1 (50)	0	1 (50)	0
BIORYLIS	Privé	7	7	1 (14)	6 (86)	1 (14)	6 (86)	0
CERBA	Privé	56	56	15 (31)	33 (69)	11 (23)	37 (77)	3 (8)
CERBALLIANCE	Privé	64	64	48 (83)	10 (17)	12 (27)	32 (73)	10 (23)
LDA 13, MARSEILLE	CeGIDD	2	2	1 (100)	0	1 (50)	1 (50)	0
CH CAEN	CH	7	7	1 (20)	4 (80)	0	5 (100)	0
CH LE MANS	CH	6	6	2 (40)	3 (60)	2 (67)	1 (33)	0
CHU BORDEAUX	CHU	47	47	3 (22)	11 (78)	5 (13)	32 (87)	1 (8)
CHU CLERMONT FERRAND	CHU	8	8	0	7 (100)	0	7 (100)	0
CHU DIJON	CHU	2	2	2 (100)	0	2 (100)	0	2 (100)
CHU LYON	CHU	6	6	2 (33)	4 (67)	1 (33)	2 (67)	1 (33)
CHU MARSEILLE	CHU	6	6	3 (50)	3 (50)	0	6 (100)	0
CHU MONTPELLIER	CHU	27	24	16 (67)	8 (33)	5 (22)	18 (75)	4 (17)
CHU POITIERS	CHU	13	13	3 (25)	9 (75)	1 (10)	9 (90)	1 (10)
CHU TOULOUSE	CHU	33	32	3 (11)	23 (89)	2 (7)	25 (93)	0
CHU TOURS	CHU	17	17	3 (21)	11 (79)	1 (10)	9 (90)	0
ANTOINE BECLERE	CHU APHP	19	19	4 (25)	12 (75)	1 (8)	11 (92)	1 (9)
LOUIS MOURIER	CHU APHP	10	10	4 (50)	4 (50)	1 (20)	4 (80)	1 (25)
SAINT-LOUIS	CHU APHP	2	2	1 (50)	1 (50)	0	2 (100)	0
20		339	335	114 (43)	154 (57)	46 (18)	213 (82)	24 (11)

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

La résistance aux macrolides n'a pas pu être déterminée chez 67 patients (20%) car l'ARNr 23S n'a pas pu être amplifié. La résistance aux fluoroquinolones n'a pas pu être déterminée chez 76 patients (23%) car le gène *parC* n'a pas pu être amplifié.

Parmi les 116 échantillons présentant une mutation associée à la résistance, **les mutations A2058/2059G** (numérotation *E. coli*) **étaient les plus fréquentes dans 71,5%** (83/116) des cas (49 A2059G ; 28 A2058G ; 6 A2058 ou 2059G), suivi de la substitution A2058T dans 16,4% (19/116) des cas. La mutation A2058C représentait 0,8% (1/116) des cas. Dans 11,2% (13/116) des cas, la position exacte de la mutation n'a pas pu être déterminée.

Une différence statistiquement significative apparaissait entre le taux de résistance aux macrolides dans le secteur privé 49,3% (66/134) *versus* les centres hospitaliers 23,6% (47/199), ($p < 0,001$; test du Chi2). La faible participation des CeGIDD ne permettait pas de les comparer. Un biais de sélection explique probablement cette différence ; en effet, les prélèvements envoyés par le laboratoire Cerballiance provenaient, pour la plupart, d'un centre de santé sexuelle fréquenté essentiellement par des HSH. Dans ce centre, 83% des échantillons hébergeaient un *M. genitalium* résistant aux macrolides (voir tableau ci-dessus).

La prévalence de la résistance aux macrolides était de 58,8% chez les hommes (94/160) *versus* 18,5% chez les femmes (20/108) ($p < 0,001$; test du Chi2). En ce qui concerne les hommes, la prévalence de la résistance était de 70,5% (48/68) sur les prélèvements anaux *versus* 51,1% (48/92) pour les autres sites de prélèvement ($p < 0,05$; test du Chi2). Il y avait aussi une différence significative de la résistance aux macrolides chez les patients d'Ile de France (67/111=60,4%) *versus* les patients de métropole hors Ile de France (47/157=29,9%), ($p < 0,001$; test du Chi2).

Parmi les patients pour lesquels nous avons le statut VIH, une séropositivité était notée pour 18,7% (12/64) des non-résistants, ce pourcentage passait à 49,3% (37/75) dans le groupe des patients résistants aux macrolides ($p < 0,001$; test du Chi2).

Les pratiques sexuelles des patients n'étaient connues que pour quarante-neuf d'entre eux. Parmi les HSH, 60% (9/15) étaient résistants aux macrolides *versus* 20,6% (7/34) dans la population hétérosexuelle ($p < 0,05$; test du Chi2). Un meilleur recueil des données aurait pu donner plus de robustesse à cette significativité.

Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

Parmi les 262 échantillons analysés par séquençage du gène *parC*, 82,1% (215/262) étaient sensibles aux fluoroquinolones tandis que **17,9% (47/262) présentaient une mutation dans la QRDR du gène *parC***. Parmi les échantillons présentant une résistance, sept mutations différentes ont été retrouvées parmi lesquelles des « hotspots » : 35 Ser83(80)Ile, 3 Ser83(80)Asn, 4 Asp87(84)Asn, 2 Asp87(84)Tyr, 1 Asp87(84)Gly ainsi que 1 His106(103)Tyr et 1 Gly81(78)Cys (numérotation *M. genitalium* avec numérotation *E. coli* entre parenthèse) localisées aussi dans la QRDR. Parmi elles, la mutation His106(103)Tyr n'a pas été décrite dans la littérature.

La prévalence de la résistance aux fluoroquinolones était de 19,4% chez les hommes (30/155) *versus* 15,9% chez les femmes (17/107) ($p = 0,4$; test du Chi2). Il n'y avait pas non plus de différence significative de la résistance aux fluoroquinolones chez les patients d'Ile de France (22/92=23,9 %) *versus* les patients de métropole hors Ile de France (25/170=14,7 %), ($p = 0,06$; test du Chi2). Parmi les patients pour lesquels nous avons le statut VIH, une séropositivité était notée pour 38,0% (35/92) des non-résistants, ce pourcentage passait à 30,4 % (7/23) dans le groupe des patients résistants aux fluoroquinolones ($p = 0,5$; test du Chi2).

La prévalence de la résistance a été étudiée en fonction d'éventuels **traitements antérieurs par macrolides ou fluoroquinolones**. L'information a pu être recueillie chez 46,6% (34/73) des patients. Parmi les patients préalablement traités par les macrolides, 75% (12/16) étaient infectés par une souche résistante aux macrolides tandis que parmi les patients n'ayant pas reçu de traitement préalable par les macrolides, seulement 24% (6/25) des patients étaient infectés par une souche résistante ($p < 0,001$; test de Chi2). La différence de prévalence de résistance aux fluoroquinolones entre les patients préalablement traités ou non traités par les macrolides (40% *versus* 14,3%) n'était, quant à elle, pas significative ($p = 0,1$; test de Fisher).

En conclusion, la prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* a atteint 43%, valeur très élevée, inquiétante mais stable depuis un an. Ces chiffres confirment les résultats de notre enquête réalisée en 2017 sur un plus petit échantillon (prévalence de 42,6%, voir poster en annexe). La résistance aux fluoroquinolones, moins élevée, est en nette augmentation puisque nous décrivions une prévalence à Bordeaux autour de 6% entre 2013 et 2016 et au niveau national la prévalence était de 7,5% en 2017 *versus* 17,8% en 2018. Elle est préoccupante, la moxifloxacine étant pratiquement la seule alternative en cas d'échec des macrolides.

La proportion de double résistance, calculée pour les 220 patients pour lesquels une amplification a été obtenue pour la recherche de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones, **s'élève à 10,9% (24/220)** et est en augmentation par rapport à 2017 (7,5%). À noter que **83,3% (20/24)** des patients présentant une double résistance étaient des **hommes** dont l'âge médian est de 35 ans.

3.3.3.4 Surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2018)

L'objectif de cette enquête a été de déterminer la **prévalence de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les territoires et départements d'Outre-Mer en 2018**. Guadeloupe et Martinique n'ont pas été incluses ; en effet, c'est le Cerba qui nous a fourni les échantillons positifs à *C. trachomatis* pour ces 2 départements. La recherche de *M. genitalium* n'étant pas remboursée, le Cerba n'a pas ou peu de demandes.

Dans les centres participants, il s'agissait de récolter pendant 3 mois, du 1^{er} août au 31 octobre 2018, tous les échantillons urogénitaux positifs à *M. genitalium* (urine, vagin, col, écouvillons rectaux et de gorge). Les échantillons ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées ou par des transporteurs agréés. Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier Excel comportant le sexe, la date de naissance, la nature de l'échantillon, le service demandeur, la notion de dépistage et de symptômes, le traitement antérieur par macrolides.

La résistance aux macrolides a été recherchée par une PCR en temps réel « maison » de type FRET ou par une PCR multiplex commercialisée en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET (kit ResistancePlus™ MG, SpeedX). Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature précise de la mutation. Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR du gène *parC*. Un total de **287 échantillons positifs à *M. genitalium* ont été reçus de 6 centres issus de 5 territoires ou départements d'Outre-Mer** (figure ci-dessous).

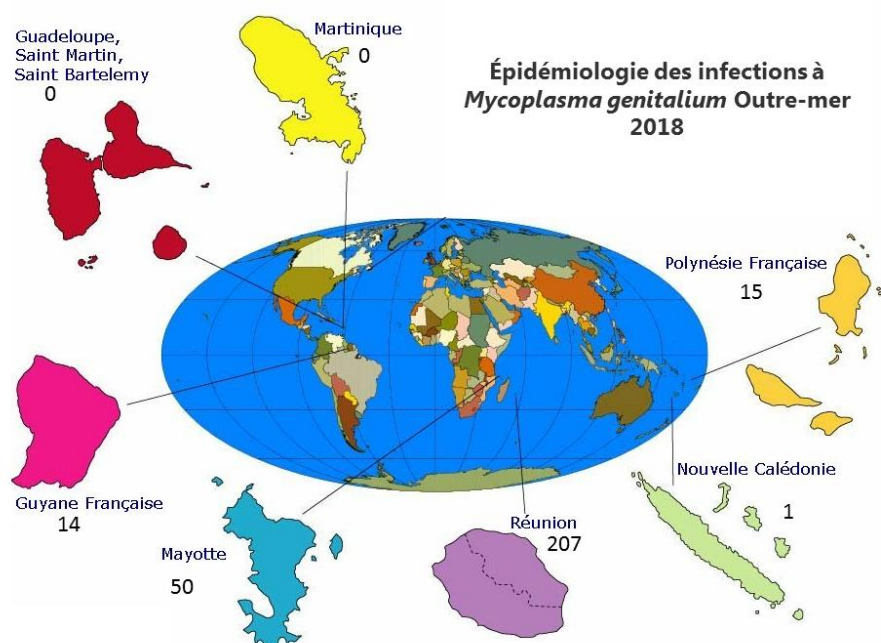


Tableau. Répartition des échantillons selon le sexe et le territoire.

Territoire	F n (%)	H n (%)	Total	%
Réunion	139 (67,1)	68 (32,9)	207	72,12
Mayotte	21 (42,0)	29 (50,0)	50	17,42
Polynésie	14 (93,3)	1 (6,7)	15	5,22
Guyane française	14 (100)	0	14	4,87
Nouvelle Calédonie	0	1 (100)	1	0,35
Total	188 (65,5)	99 (34,5)	287	100

Population étudiée

Au total, 287 **échantillons provenant de 287 patients** (65,5% femmes et 34,5% d'hommes) ont été collectés entre le 1^{er} août et le 31 octobre 2018.

Prévalence de la résistance aux macrolides

Parmi les 235 échantillons pour lesquels une amplification a été obtenue, 94,0% (221/235) étaient sensibles aux macrolides tandis que **5,9% (14/235) d'entre eux étaient résistants aux macrolides**. Treize des 14 échantillons résistants étaient issus de la Réunion (8 femmes et 5 hommes) et un de la Guyane française (1 femme).

Parmi les 14 échantillons présentant une mutation associée à la résistance, la position de mutation a pu être déterminée pour neuf échantillons. **La mutation A2058G** (numérotation *E. coli*) **était la plus fréquente** (6/9 cas), suivi de la substitution A2058T (2/9 cas) et de la mutation A2059G (1/9). La position exacte de la mutation n'a pas pu être déterminée dans cinq échantillons.

Nous observons ainsi **une différence significative de la prévalence de la résistance aux macrolides en Outre-Mer versus en France métropolitaine en 2018 (5,9% versus 43,0%)**.

Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

L'analyse des mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones par amplification et séquençage de la QRDR du gène *parC* est en cours.

3.3.4 Réseau de surveillance des gonocoques en France (Renago)

En 2019, le CA-SFM propose des modifications pour l'interprétation de l'antibiogramme du gonocoque en homogénéisation avec les recommandations de Eucast. Les diamètres ne sont plus utilisés et la détermination des CMI est nécessaire pour l'interprétation R/S/I des souches. Le tableau ci-dessous rapporte les concentrations critiques à appliquer en 2019.

Tableau. Catégorisation des gonocoques en sensible, intermédiaire ou résistant (SIR) en fonction des concentrations critiques de chaque antibiotique testé et des guidelines des sociétés savantes.

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		
	S ≤	R >	E coff
Pénicilline G	0,06	1	-
Amoxicilline	0.25	2	-
Ceftriaxone	0,125	0,125	0,032
Céfotaxime	0,125	0,125	0,016
Céfixime	0,125	0,125	-
Spectinomycine	64	64	64
Tétracycline	0,5	1	
Minocycline	0,5	1	
Azithromycine	0,25	0,5	
Ofloxacin	0,125	0,25	0,064
Ciprofloxacine	0,03	0,06	0,016

E-coff : Cut off épidémiologique, CA-SFM version 2019.

3.3.4.1. Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* aux fluoroquinolones et céphalosporines de 3^{ème} génération dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2017)

Suite à la collaboration du CNR IST avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert), le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Saint Louis a reçu 71 prélèvements cliniques de 2017 dont 24 de Guyane, 17 de Martinique et 30 de Polynésie Française. La détection de résistance aux fluoroquinolones a été recherchée par le test resistancePlus GC Speedx (Australia) qui cible la mutation en position 91 de la gyrase GyrA du gonocoque. La *détection* de la résistance aux C3G a été effectuée à l'aide d'une PCR maison puis séquençage Sanger.

Polynésie Française

Concernant les échantillons de Tahiti, une sensibilité aux quinolones était observée dans 100% des cas. Pour la résistance aux C3G, 17/30 échantillons étaient analysables et rapportaient la présence des variants *penA14*, *penA2* et *penA9*. Un échantillon sur 17 (5,8%) hébergeait *penA9* pouvant être responsable d'une augmentation de la CMI aux

C3G voire d'une résistance à cette classe d'antibiotique.

Guyane

Sur les 24 échantillons positifs en PCR provenant de patients de Guyane, 24% des échantillons présentaient une résistance aux fluoroquinolones. Pour les C3G, 9/24 échantillons étaient analysables avec une séquence du gène *penA* complète. Les variants observés étaient *penA14.001* (n=5), *penA22.00* (n=1), *penA15.001* (n=1), *penA19.001* (n=1) et *penA2.001* (n=1). Un échantillon sur 9 (11%) hébergeait *penA22* pouvant être responsable d'une augmentation de la CMI aux C3G voire d'une résistance à cette classe d'antibiotique.

Martinique

Pour la Martinique, une résistance aux fluoroquinolones était observée dans 41% des cas ce qui est proche du taux de 37,7% retrouvé en France métropolitaine en 2017. Concernant les C3G, 9/17 échantillons étaient analysables et hébergeaient les variants *penA2.001* (n=2), *penA13.001* (n=2), *penA14.001* (n=2), *penA22.001* (n=1), *penA34.001* (n=1) et *penA68.001* (n=1). Cinq échantillons sur 9 (55,5%) présentaient des mutations critiques pouvant être responsables d'une augmentation de la CMI aux C3G voire d'une résistance à cette classe d'antibiotique. Un des échantillons provenait d'une jeune femme de 35 ans asymptomatique qui présentait une infection avec un gonocoque multirésistant aux antibiotiques (*penA34.001*, *GyrA* mutée) et une coinfection avec *C. trachomatis*.

En conclusion, il existe une variation très importante des résistances aux fluoroquinolones et C3G au niveau des DROM. Des souches de sensibilité diminuée aux C3G sont présentes avec notamment une prévalence plus importante en Martinique. Une étude plus importante sur les souches cliniques est nécessaire afin de confirmer ces résultats et d'analyser les clones circulants.

3.3.4.2. Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* en France métropolitaine (enquête Ngon 2018)

La surveillance de la résistance aux antibiotiques du gonocoque a été effectuée sur les souches de gonocoque recueillies dans le cadre de l'enquête Ngon2018 (recueil de 10 souches consécutives en France métropolitaine et 20 souches dans les DROM entre le 1 septembre 2018 et le 31 décembre 2018). Les souches sont arrivées au laboratoire au premier trimestre 2019. A ce jour, le laboratoire de l'Hôpital Saint Louis a reçu les prélèvements provenant de **25 centres, un total de 205 informations cliniques et 177 souches** dont 150 congelées. La réalisation des CMI est en cours.

3.3.4.3. Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* en France métropolitaine (Renago 2018)

La surveillance de la résistance aux antibiotiques du gonocoque a été effectuée pour les souches isolées dans le cadre du réseau Renago. Le réseau Renago a envoyé à l'Institut Fournier 359 souches issues de toute la France métropolitaine dont 317 ont pu être étudiées. Ces 317 souches ont été isolées entre 3 janvier 2018 et le 28 décembre 2018 et 48,3% des souches proviennent du Nord-Est de la France.

Parmi ces 317 souches investiguées, la production de la bêta-lactamase a été observée pour 37/284 souches (13%). La détermination des CMI de 6 antibiotiques (céfixime, ceftriaxone, gentamicine, tétracycline, ciprofloxacine, azithromycine) a été effectuée par la technique de Etest (i2A, France). Les résultats ont été compilés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau. Interprétation R/S/I des CMI des 317 souches de gonocoques isolées du réseau Renago.

Antibiotiques	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Céfixime	316 (99,7%)	0	1 (0,3%)
Ceftriaxone	317 (100%)	0	0
Tétracycline	80 (25,2%)	87 (27,4%)	150 (47,3%)
Ciprofloxacine	167 (52,7%)	1 (0,3%)	149 (47%)
Azithromycine	178 (56,2%)	84 (26,5%)	55 (17,3%)

Dans le réseau observé, toutes les souches sont sensibles à la ceftriaxone et une seule souche est résistante au céfixime (0,3%). La répartition des CMI du céfixime et de la ceftriaxone est objectivée dans la figure ci-dessous et une seule souche (0,3%) présente une CMI à la ceftriaxone supérieure à l'E-coff (0,032 mg/L). Ces données confirment la tendance de diminution des souches résistantes aux C3G et, en parallèle, la diminution de souches dont la CMI est supérieure à l'E-coff, donc la circulation de moins d'isolats avec des PLP remaniées.

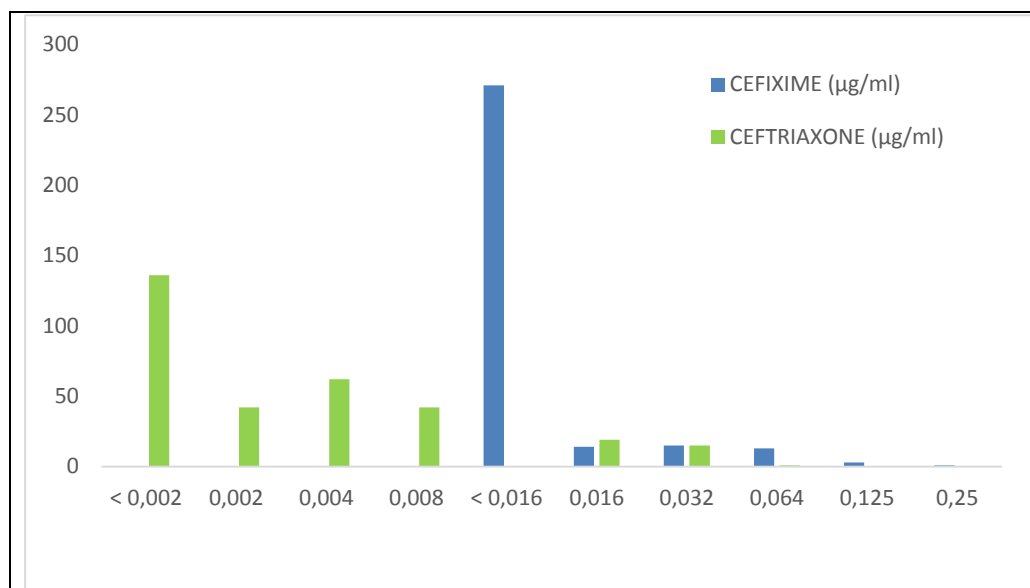


Figure. Répartition des CMI du céfixime et de la ceftriaxone des 317 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago.

Pour les autres molécules, la répartition des CMI est visualisée dans la figure ci-dessous. On observe une augmentation des résistances aux fluoroquinolones (47% vs 37,7% en 2017) et à l'azithromycine (17,3% vs 5,5% en 2017). La résistance à la tétracycline diminue à 47,3 % vs 65% en 2017, mais avec une augmentation des souches à haut niveau de résistance (57,3%). La répartition des CMI de la gentamicine est comprise entre 1 et 16 µg/ml.

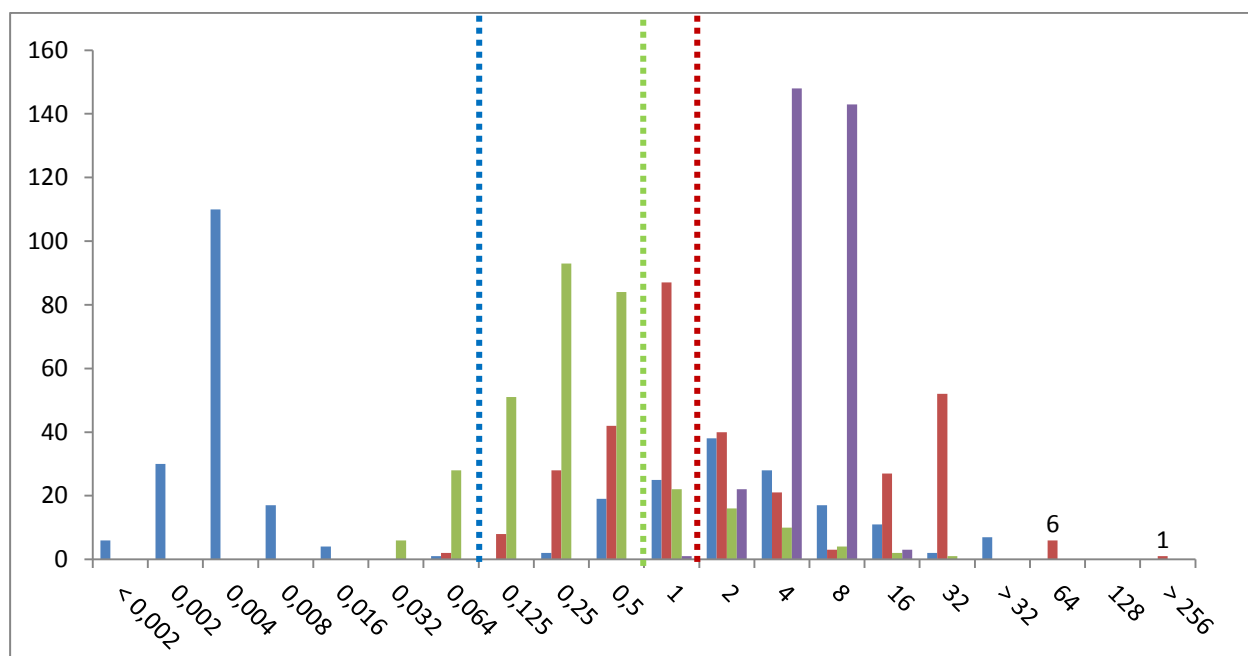


Figure : Répartition des CMI de l'azithromycine, gentamicine, ciprofloxacin et tétracycline des 317 gonocoques de Renago. La barre pointillée bleue représente les concentrations critiques.

3.3.4.4 Surveillance de la résistance de *N. gonorrhoeae* à Port au Prince (Haïti) en 2018

Le CNR des IST bactériennes (B. Bercot) a été sollicité par les Centres GHESKIO de Port-au-Prince à HAÏTI (Dr Raskine, Dr Oksana Ocheretina) afin d'évaluer les déterminants moléculaires et la clonalité des souches de gonocoques isolées à Haïti.

Vingt-cinq souches de gonocoque isolées à Port-au-Prince en 2018 ont été analysées. Le génome des souches a été extrait à l'aide du kit PROMEGA Wizard puis séquencé à l'aide d'un MiSeq ILLUMINA. L'analyse bio-informatique a été effectuée à l'aide du pipeline du CNR (plateforme Galaxie APHP).

Les souches possédaient dans 24/25 (96%) des cas un gène *bla*_{TEM} responsable de la résistance aux pénicillines par production de bêta-lactamase. Les gènes *bla*_{TEM-1B} et *bla*_{TEM-135} ont été respectivement retrouvés pour 20 (80%) et 4 souches (16%). Le gène *tet*(M) était présent chez 24 des 25 souches séquencées (96%) correspondant à un haut niveau de résistance aux tétracyclines, avec la mutation additionnelle V57M de la protéine S10 dans 100% des cas. Aucune mutation spécifique à la résistance aux céphalosporines n'a été retrouvée dans le gène *penA* et uniquement des gènes *penA* non mosaïques *penA2* et *penA4* ont été observés. Les mutations au niveau du gène *gyrA* responsables de la résistance aux quinolones (S91F et D95G) ont été retrouvées chez 3 des 25 souches (12%) associées à des mutations additionnelles dans le gène *parC* pour 2/3 des souches résistantes. Au niveau de l'ARNr 23S, aucune mutation n'a été retrouvée indiquant que toutes les souches seraient sensibles à l'azithromycine.

En conclusion, aucune résistance aux C3G et à l'azithromycine n'a été mise en évidence sur le profil génomique des souches isolées à Haïti, la résistance aux fluoroquinolones est faible (10%) et **la quasi-totalité des souches hébergent des plasmides portant des déterminants de haut niveau résistance aux tétracyclines et à la pénicilline.**

3.3.5 Surveillance de la résistance de *T. pallidum* aux macrolides

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*.

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. 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 n'a été rapporté au CNR.

Echantillons de La Réunion

Nous avons expertisé 18 échantillons provenant de La Réunion issus d'ulcérations génitales de patients diagnostiqués avec une syphilis récente. Dans un premier temps, l'ensemble des échantillons a été testé pour la présence de *T. pallidum*, 3 échantillons se sont avérés négatifs. Dans un deuxième temps, le gène de l'ARNr 23S a été amplifié dans 7 échantillons et l'analyse RFLP montre que tous les 7 échantillons **(100%) possèdent la mutation A2058G** (numérotation *E. coli*).

Echantillons protocole Genosyph

Nous avons analysé 118 échantillons issus du protocole Génosyph provenant d'ulcérations cutanéomuqueuses de patients suspectés de syphilis récente. Nous montrons que **102 (86,4%) échantillons possèdent la mutation A2058G** sur le gène de l'ARN 23S correspondant à la résistance clinique à l'azithromycine.

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 présentiellles ou téléphoniques au cours de 2018 sur la pertinence des réseaux à développer et le développement d'une meilleure coordination des enquêtes entre les différents réseaux, les réseaux volontaires Rénago et Rénachla ayant été arrêtés en septembre 2018. Ces discussions ont notamment porté

sur la surveillance du gonocoque.

Cécile Bébéar et Béatrice Berçot se sont rendues à une réunion de consultation organisée par Santé Publique France à propos de l'évolution de la surveillance des IST via les laboratoires en présence de différents représentants des laboratoires. A cette occasion, a été acté l'arrêt des réseaux volontaires Rénago et Rénachla et leur remplacement par des enquêtes pluriannuelles sur les IST comme celle qui a été réalisée pour l'année 2016 (Enquête Labo-IST, SPF). L'enquête LaboIST sera reconduite en 2019 pour recueillir les données de l'année 2018 et suite au retour d'expérience de la première enquête, différents éléments permettront d'améliorer la représentativité, l'exhaustivité et l'efficacité des prochains épisodes.

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 Maastricht, The Netherlands.

Dans ce cadre, 321 échantillons de *C. trachomatis* de génotype L isolées de 2010 à 2017 de patients présentant une anorectite et provenant de différents pays (Suisse, France, Suède, Pays-Bas, Espagne, Slovénie, Hongrie, République chèque et 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. Le séquençage du génome par capture de cible et Illumina a été réalisé pour 42 échantillons. Une grande diversité des génotypes *ompA* est retrouvée dans les échantillons LGV et indique que ce gène est un « hotspot » pour les mutations. Ce travail va être présenté à l'ECCMID 2019.

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 Infections (ESGMI) de l'ESCMID nous permettent d'initier ou de participer à des études épidémiologiques internationales et européennes sur les mycoplasmes urogénitaux. A noter qu'à l'initiative du CNR des IST (Cécile Bébéar) et des collègues européens, l'ESGMI a inclus la thématique Chlamydia et devient l'**ESGMAC** (European Study Group on Mycoplasma and Chlamydia).

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* et aux enquêtes annuelles sur la résistance aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux,
- avec les CeGIDD notamment ceux de Bordeaux, Paris et Marseille, et des services hospitaliers tels que le CAUVA (Centre d'Aide aux Victimes d'Aggressions, CHU de Bordeaux) et le centre de planification familiale et d'orthogénie du CHU de Bordeaux.

3.4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Le laboratoire participe aux enquêtes annuelles dans le cadre du groupe de travail européen **EURO-GASP** (27 pays

participants).

Afin d'assurer la surveillance des clones circulants en Europe, le laboratoire de St Louis a envoyé pour la surveillance 2018, 55 souches pour lesquelles le NGS sera centralisé. Le CNR effectuera en parallèle le séquençage des souches dans un but de contrôle qualité de son process bio-informatique. Il est prévu pour les années suivantes l'envoi des fichiers fastq. Les données épidémiologiques de chaque cas, associées aux CMI de 7 antibiotiques de référence demandées pour l'enquête (céfixime, ceftriaxone, azithromycine, ciprofloxacine, tétracycline, gentamicine, azithromycine) seront transmises à l'ECDC via TESSy comme chaque année par Santé Publique France (Equipe de Florence Lot).

3.4.3 Laboratoire APHP Cochin

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

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 Enquête de surveillance en Outre-Mer en 2017 et en 2018 des génovars d'infections urogénitales à *C. trachomatis* et des infections à gonocoque

3.5.1.1 *C. trachomatis* : enquête rétrospective en 2017, DROM 2017 (Cerba)

Une collaboration avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert) nous a permis de collecter et typer 446 échantillons urogénitaux, pharyngés ou anaux positifs pour *C. trachomatis*, provenant de la Réunion, la Guyane, la Polynésie Française, la Martinique et la Guadeloupe.

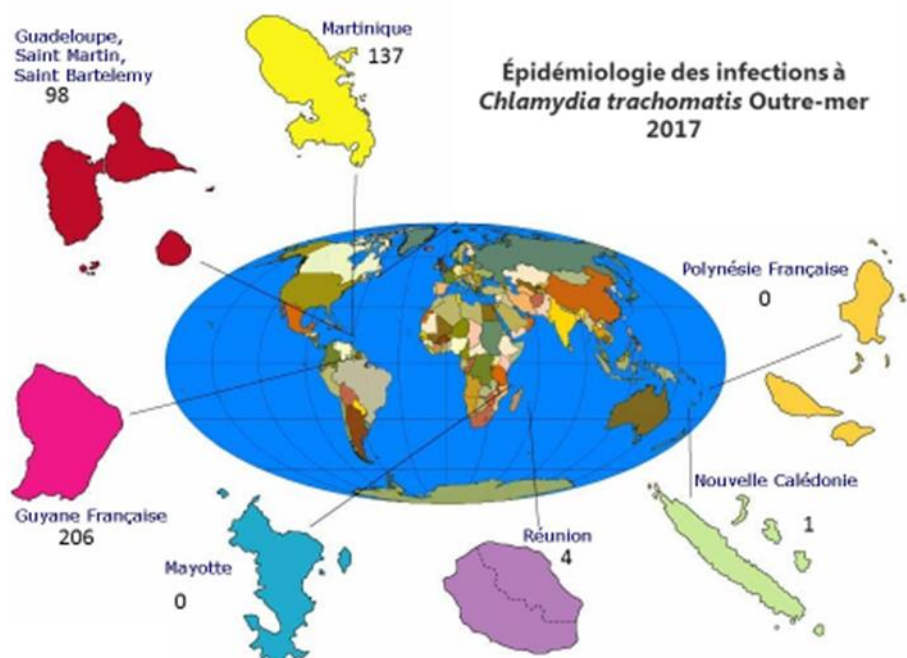


Tableau. Répartition des échantillons selon le sexe et le territoire. DROM 2017.

	F n (%)	H n (%)	Total	%
Guyane	179 (86,9)	27 (13,1)	206	46,19
Martinique	73 (53,3)	64 (46,7)	137	30,72
Guadeloupe	68 (69,4)	30 (30,6)	98	21,97
Réunion	4 (100)	0	4	0,90
Nouvelle Calédonie	1 (100)	0	1	0,22
Total	325 (72,9)	121 (27,1)	446	100

Les 446 échantillons provenaient de 446 patients (72,9% femmes et 27,91% d'hommes). L'âge moyen des patients était de 24,3 ans et l'âge médian était de 22 ans (avec une amplitude de 13 ans à 61 ans). Les hommes sont statistiquement plus âgés que les femmes, respectivement 27,1 ans vs 23,05 ans ($p < 0,05$; test de Student). La classe d'âge la plus représentée sur l'ensemble de la population était la classe 20-24 (31,5%), 36,7% des femmes avaient moins de 20 ans et 40,8% des hommes été âgés de 20 à 24 ans. L'orientation sexuelle des patients n'était pas connue. Parmi les échantillons féminins, 48,9% (159/325) étaient des écouillons cervico-vaginaux, 44,9% (146/325) des premiers jets d'urine, 4,6% (15/325) des prélèvements anaux et 1,6 % (5/325) des prélèvements de gorge. Les échantillons masculins comprenaient 85,1% (103/121) d'urine de premier jet, 12,4% (15/121) de prélèvements urétraux et 2,5% (3/121) de prélèvements rectaux.

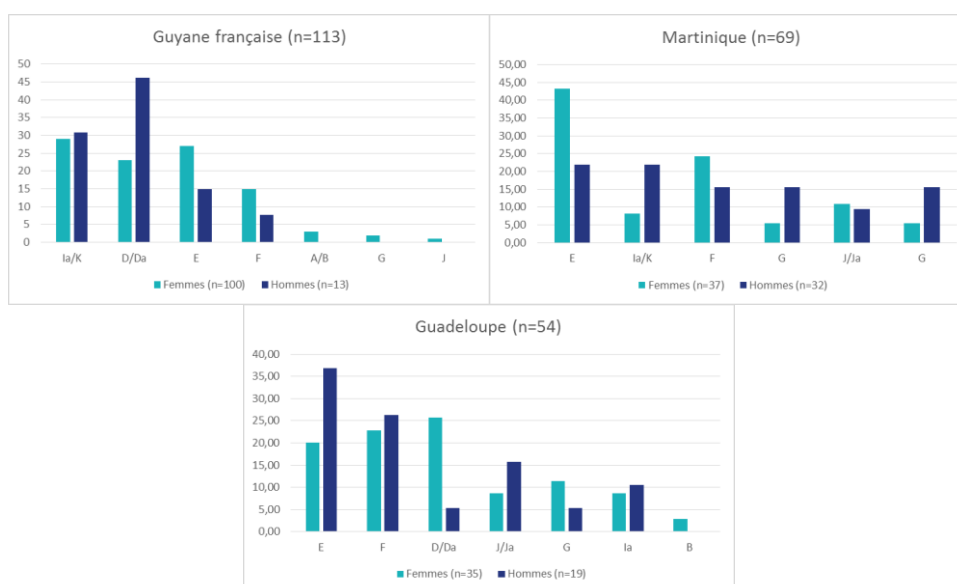
Sur les 446 échantillons reçus, 14 n'ont pas pu être analysés car les tubes étaient vides, 5 séquences étaient ininterprétables et 188 souches n'ont pas amplifié. Le typage a été réalisé sur 239 échantillons (55,3%).

La souche E était la plus représentée avec une prévalence de 28,0% (67/239), suivi par les Ia/K avec 20,5% (49/239), les D/Da avec 20,1% (48/239), les F avec 18,0% (43/239), 5,9% les G avec 5,8% (14/239), les J/Ja avec 5,8% (14/239) et enfin les souches A/B avec 1,7 % (4/239).



Figure. Répartition en % des génotypes de *C. trachomatis* en fonction du sexe et des territoires-(DROM 17).

La répartition était inégale en fonction des territoires, il n'y avait toutefois pas de différence statistiquement significative.



Parmi les patients pour lesquels une recherche de *M. genitalium* a été faite 9,3 % étaient positifs (40/432). La prévalence de la co-infection avec *M. genitalium* était de 10,2 % chez les femmes (32/313) vs 6,7% chez les hommes (8/119) ($p=0,3$; test du Chi2).

3.5.1.2 *C. trachomatis* : enquête prospective sur le dernier trimestre 2018

L'an dernier, le CNR a génotypé 1014 échantillons positifs à *C. trachomatis* provenant de 1012 patients (661 femmes, 346 hommes, 1 transexuel et 4 inconnus), reçus de 65 centres principalement de France métropolitaine en 2017 (voir annexe). La moyenne d'âge des femmes était de 26 ans et celle des hommes de 28,6 ans et 85,4% des patients déclaraient des pratiques hétérosexuelles. La répartition des génovars selon le sexe est résumée dans la figure ci-dessous. L'ensemble de ces résultats ainsi que l'épidémiologie de la résistance de *M. genitalium* et celle de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques sont présentés sous forme de « mini oral presentation » à l'ECCMID 2019.

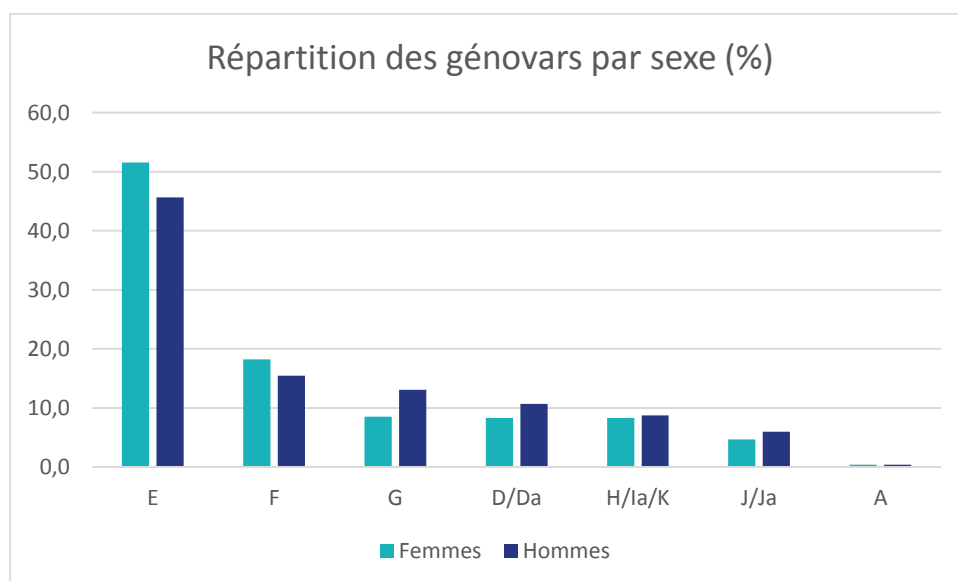
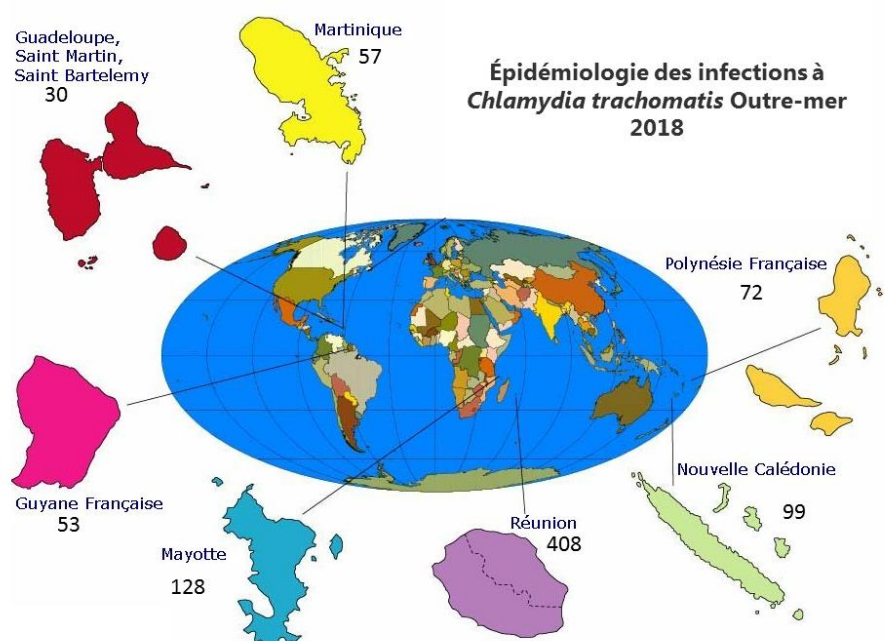


Figure. Répartition en % des génovars selon le sexe en France métropolitaine 2017.

En 2018, le CNR a souhaité poursuivre la surveillance des génovars d'infections urogénitales à *C. trachomatis* en se focalisant sur les régions Outre-Mer. Dans les centres participants, pendant trois mois du 1 août au 31 octobre 2018, tous les échantillons positifs à *C. trachomatis* (urine, vagin, col) ont été envoyés au CNR au moyen d'enveloppes T pré-adressées ou par transporteur agréé. 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.



Les 847 échantillons reçus provenaient de 847 patients (71,1% femmes et 28,9% d'hommes).

Tableau. Répartition des échantillons selon le sexe et le territoire-DROM 2018.

	Femmes n (%)	Hommes n (%)	Total	%
Réunion	297 (72,8)	111 (27,2)	408	48,2
Mayotte	71 (55,5)	57 (44,5)	128	15,1
Nouvelle Calédonie	80 (80,8)	19 (19,2)	99	11,7
Polynésie	63 (87,5)	9 (12,5)	72	8,5
Martinique	28 (49,1)	29 (50,9)	57	6,7
Guyane	42 (79,2)	11 (20,7)	53	6,3
Guadeloupe	21 (70,0)	9 (30,0)	30	3,5
Total	602 (71)	245 (29)	847	100,00

Sur les 847 échantillons reçus, 19 n'ont pas pu être analysés car les tubes étaient vides, 35 séquences étaient ininterprétables et 212 souches n'ont pas été amplifiées. Le typage a été réalisé sur 581 échantillons (70,1%).

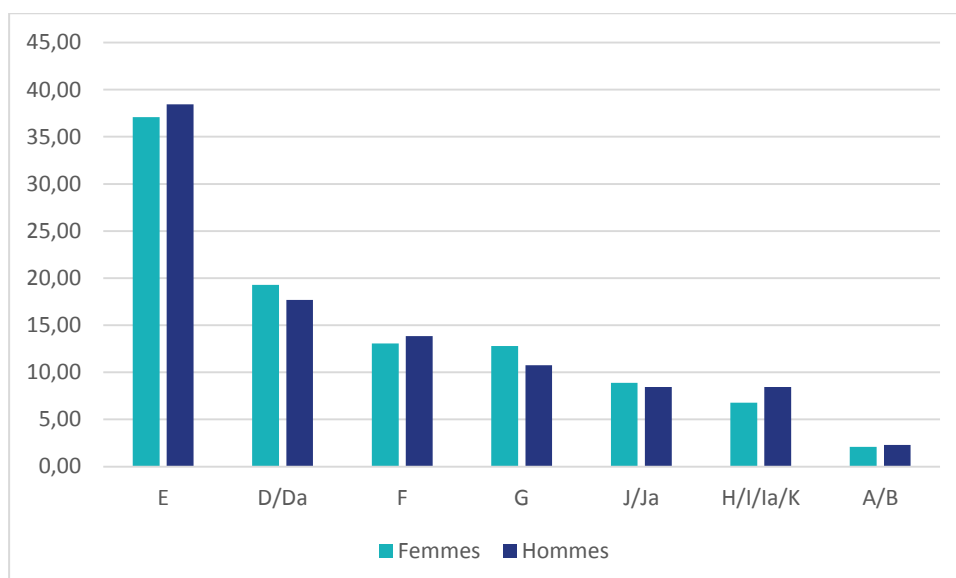
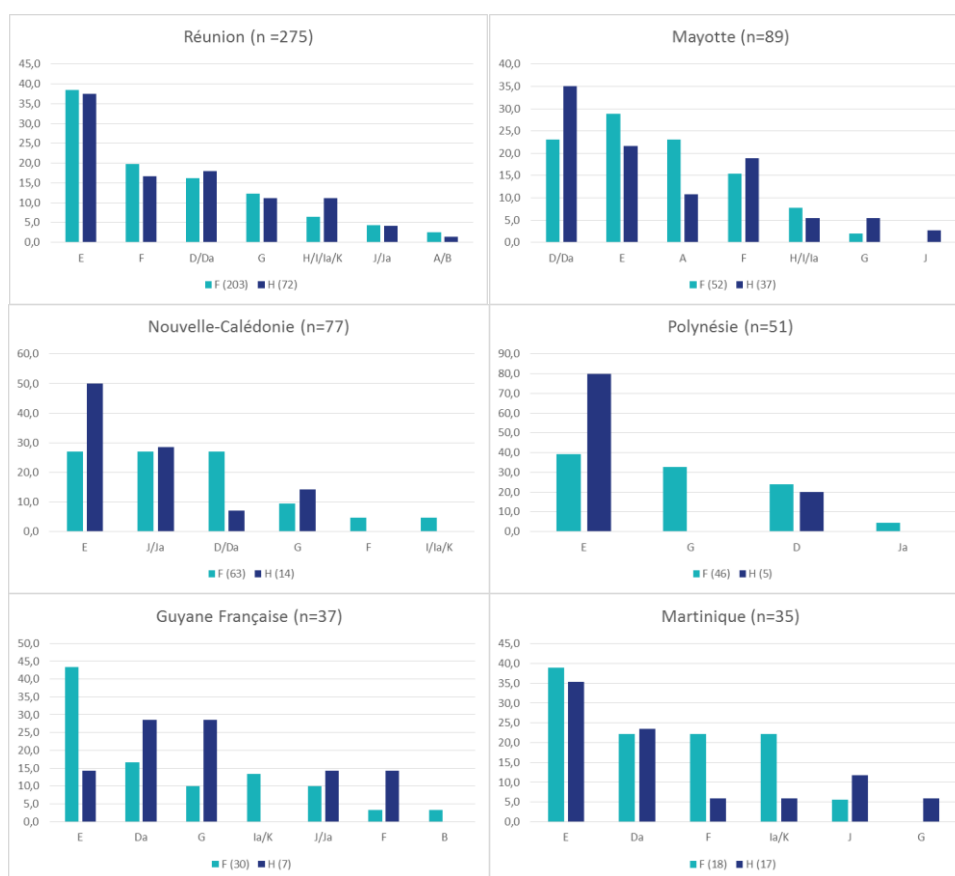
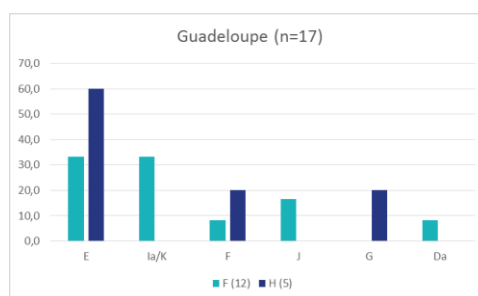


Figure. Pourcentage des génovars selon le sexe - Outre-Mer 2018.

L'étude concernant la répartition des génovars de souches urogénitales récoltées en Outre-mer est en cours. Les résultats préliminaires montrent que **le génovar E est majoritaire** avec une prévalence de 35,8% (208/581), suivi par les D/Da avec 20,1% (117/581), les F avec 13,6% (79/581), les G avec 11,4% (66/581), les J/Ja avec 7,8% (45/581), les H/I/Ia/K avec 7,4% (43/581) et les A/B avec 4,0% (23/581), (figure ci-dessus). Nous notons que les souches A ne proviennent que de Mayotte (16 souches) et de La Réunion (5 souches), la proximité géographique pourrait en être l'explication. L'analyse épidémiologique est en cours.



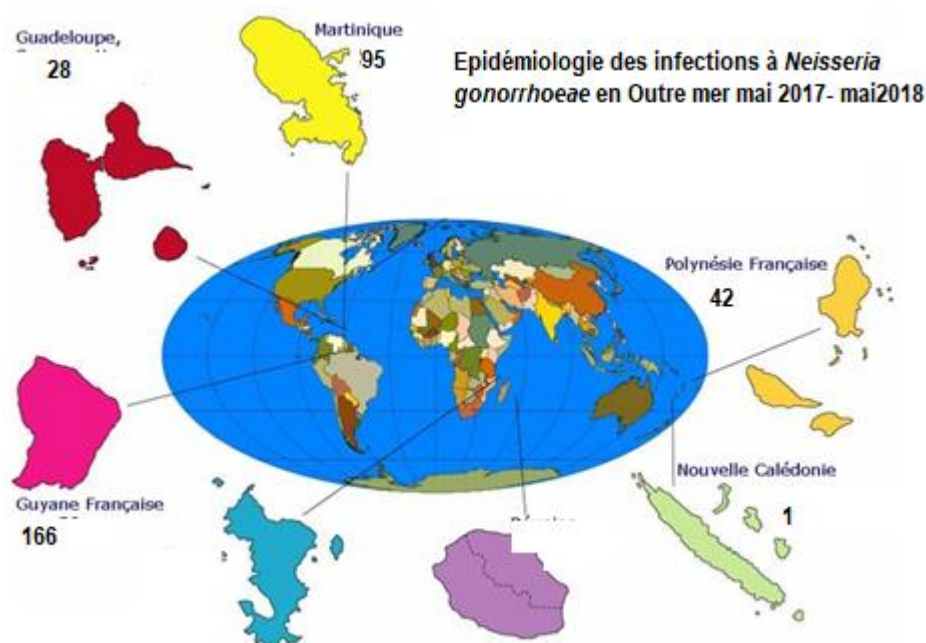


3.5.1.3 Enquête rétrospective DROM mai 2017 – mai 2018 (Cerba) pour les infections à gonocoques

Une collaboration avec le laboratoire Cerba (Sabine Trombert) nous a permis de recueillir les données de **4491 demandes de PCR gonocoque provenant des patients de Guyane, Guadeloupe, Martinique, Nouvelle-Calédonie**. Deux cent quatre-vingt-dix tests étaient positifs en PCR. La moyenne d'âge était de 26 ans [15-58 ans]. Cent-dix-neuf sur 290 patients (41%) avaient une double infection gonocoque/*C. trachomatis*.

Les Dr Olivier Belmonte et Bénédicte Roquebert ont fourni les données de **la Réunion** (109 échantillons positifs) et le Dr Lastere celles de **Tahiti** (42 échantillons positifs).

Au total dans les DROM, **441 échantillons** (6,4%) étaient positifs en PCR dont 185 urines, 26 anus, 42 gorges, 130 prélèvements vaginaux, 58 non déterminés. Les prélèvements provenaient de 189 (44%) hommes et 240 femmes (55,9%), (cf tableau ci-dessous).



Le tableau ci-dessous rapporte un pourcentage d'infections à gonocoque de 6,4% dans les DROM avec une proportion de cas plus importante en Guyane (8,3%) et à la Réunion, cas majoritairement observés chez les femmes. Le rapport homme/femme est équivalent en Guadeloupe et de 70,5% en Martinique. L'analyse des résistances est décrite chapitre 3.3.4.1.

DROM	Nb total de prélèvements positifs	Nb total de prélèvements	Prevalence	Homme	Femme	NR
Guyane	166	2004	8,3%	42 (25,3%)	124 (74,7%)	
Guadeloupe	28	871	3,2%	14 (50%)	14 (50%)	
Martinique	95	1606	5,9%	67 (70,5%)	28 (29,5%)	
Nouvelle-Calédonie	1	10	10%	0	1	
Polynésie Française	42	1151	3,6%	15	15	12
La Réunion	109	1234	8,8%	51 (46,8%)	58 (53,2%)	
Total	441	6876	6,4%	189 (44%)	240 (55,9%)	

NR : non renseigné

3.5.2 *N. gonorrhoeae* : enquête rétrospective Ngon en 2018 en France métropolitaine

Au 25 mars 2019, le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Saint Louis a reçu un total de 205 informations cliniques. Sur ces **205 souches**, 177 souches sont parvenues au laboratoire, et 150 ont été congelées en attendant la fin de la réception de tous les laboratoires participants. Un recueil de données cliniques a été fourni aux laboratoires participants. Ces données sont en cours d'analyse et des premiers résultats sont décrits au chapitre 3.2.2.1.

3.5.3 *N. gonorrhoeae* : enquête rétrospective à Port-au-Prince, Haïti

Nous avons reçu 34 souches de gonocoques des CENTRES GHESKIO de Port-au-Prince à Haïti et avons analysé la diffusion de clones circulants dans cette île très peu étudiée à ce jour.

Parmi ces souches, 25 ont pu être séquencées et la clonalité core-génome a été observée avec la détermination d'un arbre phylogénique. Un nombre important de MLST / NG-MAST / NG-STAR sont inconnus car possédant des allèles non décrits. Deux regroupements en cluster sont observés : le cluster 1 regroupe les souches HAIT04, 13 et 30 possèdent qui possède les mêmes MLST / NG-MAST / NG-STAR et le cluster 2 regroupant les souches HAIT18 et 19 de mêmes allèles MLST / NG-MAST / NG-STAR. Notre observation décrit des transmissions dans l'île qui sont en cours d'investigation par l'équipe en place. L'analyse des déterminants moléculaires de la résistance est décrite au chapitre 3.3.4.4.

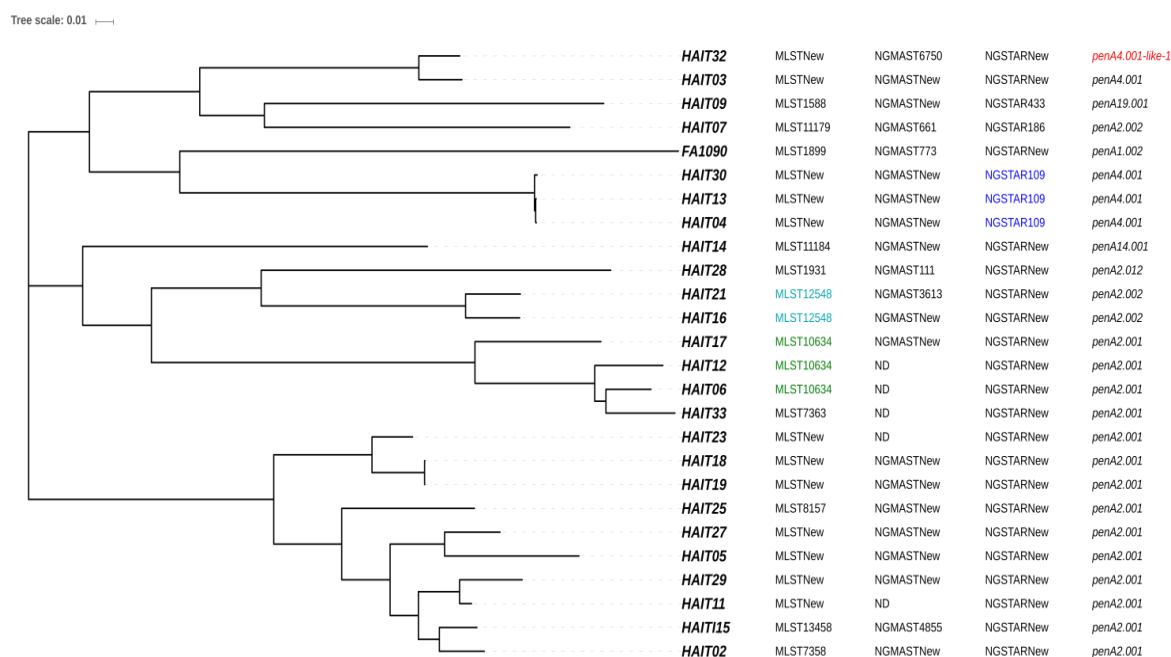


Figure. Arborescence des SNP des 25 souches de *N. gonorrhoeae* circulant à Port-au-Prince (avec la souche FA1090 de référence).

3.5.4 Enquête de surveillance européenne TESSy et contrôles de qualité européens

3.5.4.1 EU STI Microbiology Network: Sentinel Surveillance of Gonococcal Antimicrobial Susceptibility

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 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. Le CNR a ainsi réalisé le séquençage complet du génome de ces souches afin d'en extraire le typage NG-MAST. L'institut Fournier a fourni les CMI des souches pour l'azithromycine, la ciprofloxacine, le céfixime et la ceftriaxone (cf rapport du CNR de 2017). Dans cette collection, 100% des souches étaient sensibles à la ceftriaxone et 99,1% au céfixime alors que 6,2% et 34,5% étaient respectivement résistantes à l'azithromycine et aux fluoroquinolones. La population étudiée était composée de 87,3% hommes de 12,7% de femmes. Les souches étaient majoritairement isolées chez des hommes jeunes âgés de 20 à 34 ans.

Les résultats obtenus avec le séquençage, nous a permis de constater que 46 ST différents étaient observés vs 36 en 2017. Le ST2 était le plus prévalent en 2018 (6,4%) suivi du ST5793 et ST11461 (4,5%), puis le ST5441 et ST13113 (3,6%). Le ST1407 était non retrouvé et une quantité importante de ST restaient non répertoriés dans les bases de données (23,6%), (cf figure ci-dessous). Lorsque l'on compare avec les résultats obtenus avec un séquençage Sanger pour l'enquête ECDC 2017, seul 36 ST étaient observés avec un ST majoritaire le ST5441 qui était le plus prévalent (11,8%) suivi du ST2 (6,9%), puis du ST5793 et du ST13113 (4,9%).

Nos résultats montrent une diversité importante des souches sur le territoire et l'absence de ST prédominant dans le réseau étudié.

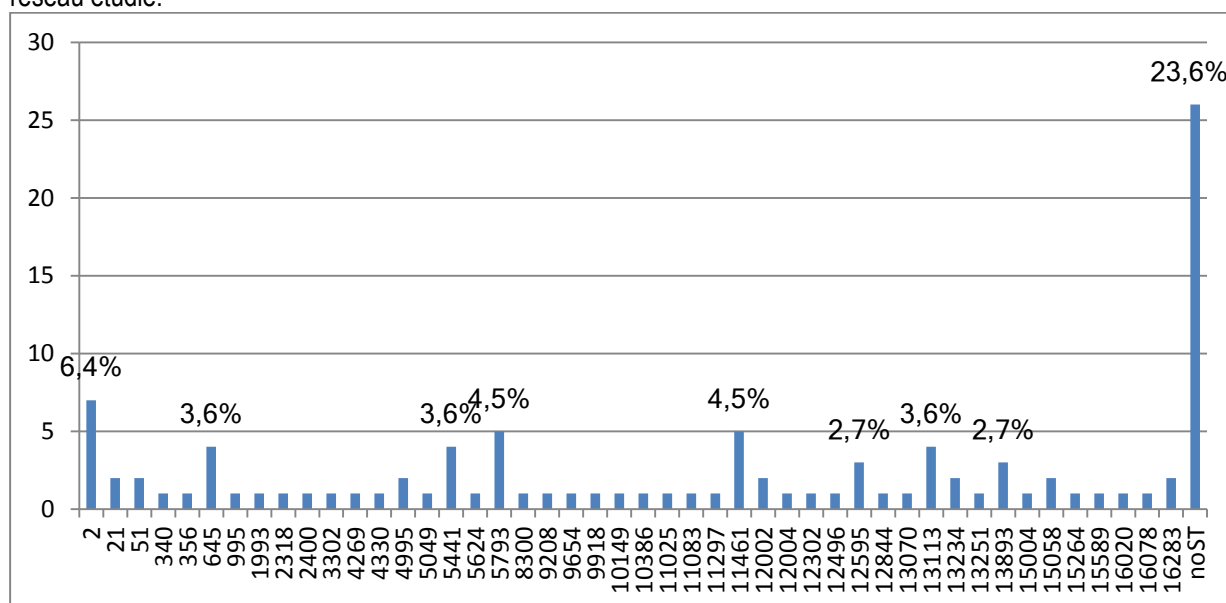


Figure. Répartition des ST provenant des souches isolées en 2017 pour l'enquête ECDC2018.

3.5.4.2 Contrôles de qualité européens

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

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

Name	ST	β -lactamase	Ceftriaxone	Cefixime	Azithromycin	Ciprofloxacin	Gentamicin	Spectinomycin
UKNEQAS 4932	15589	+	0,004	0,016	0,25	0,5	4	4
UKNEQAS 4933	16848	-	0,5	1	>256	>32	4	4
UKNEQAS 4934	1424	-	0,032	0,125	0,125	>32	2	8
UKNEQAS 4935	495	+	0,008	0,016	0,064	0,004	2	>1024
UKNEQAS 4936	4015	-	0,25	1	0,25	>32	4	8
UKNEQAS 4937	15589	+	0,004	0,016	0,125	0,25	4	4
UKNEQAS 4938	495	+	0,016	0,016	0,125	0,004	4	>1024
UKNEQAS 4939	4015	-	0,25	1	0,25	>32	8	8
UKNEQAS 4940	5743	-	0,002	0,016	0,032	0,002	4	4
UKNEQAS 4941	4015	-	0,25	1	0,125	>32	2	2

4 Alerte

4.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Pas d'alerte en 2018.

4.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Une alerte en 2018 a été effectuée *via* un article dans Eurosurveillance, une communication en congrès européen (ECCMID 2018, late breaker) et national (RICAI 2018) **pour une nouvelle souche multi-résistante aux antibiotiques présentant un haut niveau de résistance à la ceftriaxone**, aux quinolones et aux cyclines. La patiente hétérosexuelle a consulté en novembre 2017 pour une vaginite au CeGGID de St Louis et a conservé un portage pharyngé.

L'isolat a été assigné MLST1903 (NG-MAST3435) et présente un NG-STAR233. Des clones semblables de MLST1903 et de NG-STAR233 ont été signalés au Japon (clone FC428) en 2016, au Canada (GC063564/47707) et au Danemark (GK124) en 2017.

Une procédure d'alerte de souche résistante à la ceftriaxone est en cours de validation par le groupe européen EURO-GASP et sera proposée sur le site internet du CNR pour application en France.

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 2018 :

- 9 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	Rendu résultat			
						Amplification génique		Sérologie LCR	
						nPCR	Date	VDRL	Date
011819	Cochin/Obstetrique	20	F	Placenta / cordon	15/01/18	pos/pos	19/01/18		/
021843	Cergy Pontoise	26	F	Liq. Amniotique	20/02/18	pos	02/03/18		/
041820	Le Mans	1 j	F	LCR	11/04/18	neg	20/04/18	pos	26/04/18
041821	Le Mans	1 j	F	Ecouvillon (non rens.) / Croute	11/04/18	pos/pos	20/04/18		/
06183	Fort de France	2 mois	F	LCR	29/05/18	pos	08/06/18		/
101883	Le Chesnay / Papeete	36	F	Liquide amniotique	26/10/18	pos	31/10/18		/
111837	Saint Etienne	1.5 mois	M	Secrétions rhino pharyngées	16/11/18	pos	23/11/18		/
111843	Fort de France	18	F	Liquide amniotique	16/11/18	pos	23/11/18		/
111874	Rouen	24	F	Placenta	19/11/18	pos	07/12/18		/

- 30 alertes de suspicion de neurosyphilis ont été déclenchées par le CNR IST bactériennes LA syphilis.

Numéro CNR	Centre	Age	Sexe	PRELEVEMENTS	Date du prélèvement	Rendu résultat			
						Amplification génique		Sérologie LCR	
						nPCR	Date	VDRL	Date
011826	Besançon	58	M	LCR	12/01/18	neg	26/01/18	pos	25/01/18
011836	Cergy Pontoise	52	M	LCR	24/01/18	neg	01/02/18	pos	01/02/18
02182	Lille	29	M	LCR	27/01/18	neg	09/02/18	pos	15/02/18
02186	Dax	72	F	LCR	01/02/18	neg	09/02/18	pos	15/02/18
02188	Lille	71	M	LCR	31/01/18	neg	09/02/18	pos	15/02/18
021824	Neuilly s/ Seine	67	M	LCR	13/02/18	pos	16/02/18	neg	15/02/18
021825	Avignon	41	M	LCR / Sérum pour expertise sérologique	12/02/18	neg	16/02/18	pos	15/02/18
031820	Libourne	39	M	LCR	28/02/18	neg	16/03/18	pos	22/03/18
031826	Lariboisière	50	M	LCR	07/03/18	neg	16/03/18	pos	22/03/18
031834	Necker	62	M	LCR	13/03/18	neg	16/03/18	pos	26/03/18
031836	Blois	50	M	LCR	14/03/18	neg	23/03/18	pos	22/03/18
031846	Ambroise Paré	28	M	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	14/03/18	/	/	pos	20/03/18
031851	Lariboisière	38	M	LCR	21/03/18	neg	30/03/18	dout	29/03/18
031862	Strasbourg	50	M	LCR	23/03/18	pos	30/03/18	pos	29/03/18
031871	La Pitié	49	M	LCR	28/03/18	pos	05/04/18	pos	05/04/18
041820	Le Mans	1 j	F	LCR	11/04/18	neg	20/04/18	pos	26/04/18
041826	La Pitié	50	M	LCR	16/04/18	neg	20/04/18	pos	26/04/18
041841	Lariboisière	34	M	LCR	23/04/18	neg	27/04/18	pos	26/04/18
041842	Strasbourg	47	F	LCR	20/04/18	neg	27/04/18	pos	15/05/18
041847	Valenciennes	51	F	LCR (envoyé directement en bactério, pas de PCR)	24/04/18	/	/	pos	26/04/18
06183	Fort de France	2 mois	F	LCR	29/05/18	pos	08/06/18	/	/
06184	Strasbourg	24	M	LCR	05/06/18	pos	15/06/18	neg	12/06/18
061824	Nancy	30	M	LCR	04/06/18	neg	22/06/18	pos	25/06/18

061840	Cochin/Dermato	27	F	LCR	28/06/18	pos	05/07/18	pos	02/07/18
071851	Poitiers	75	M	LCR	23/07/18	neg	03/08/18	pos	03/08/18
111822	Corbeil-Essonnes	53	M	LCR	30/10/18	neg	16/11/18	pos	15/11/18
111838	Saint Etienne	1.5 mois	M	LCR	16/11/18	fpos	23/11/18	neg	22/11/18
111873	Gueret	46	M	LCR	21/11/18	pos	07/12/18	neg	06/12/18
121858	Troyes	59	M	LCR	19/12/18	pos	27/12/18	pos	31/12/18
121877	Lens	44	M	LCR	27/12/18	pos	04/01/19	neg	03/01/19

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Le site de web du CNR des IST bactériennes est en ligne depuis le 1^{er} janvier 2019 (www.cnr-ist.fr). A cette occasion, Santé Publique France a demandé à l'Institut Alfred Fournier d'enlever la mention « CNR des IST bactériennes » sur leur site web ; elle ne paraît plus sur leur site web.

5.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

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

- C. Bébéar. Epidémiologie des infections sexuellement transmissibles. Labexa, Bordeaux, 19 octobre 2018.
- S. Pereyre. Diagnostic des infections sexuellement transmissibles. Labexa, Bordeaux, 19 octobre 2018.
- C. Cazanave. Cas cliniques sur les infections sexuellement transmissibles. Labexa, Bordeaux, 19 octobre 2018.
- B. de Barbeyrac. Diagnostic des infections à *Chlamydia trachomatis*, à gonocoque et de la syphilis. Association des Biologistes d'Aquitaine, 13 septembre 2018.
- S. Pereyre. Diagnostic des mycoplasmes urogénitaux. Association des Biologistes d'Aquitaine, 13 septembre 2018.
- B. de Barbeyrac. Epidémiologie des infections à *Chlamydia trachomatis*. GynéPôle, Cité du vin, Bordeaux, 6 avril 2018.

- 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). 2018.

- B. de Barbeyrac. *Chlamydia* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). 2018.

- 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). 2018.

- C. Bébéar, Ch. Bébéar. 2018. Mycoplasmes. In : Encycl. Méd. Chir., Biologie médicale. 13(1):1-12.

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

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

- S. Pereyre, C. Bébéar. 2019. Infections à *Mycoplasma hominis*. In: Encycl. Méd. Chir., Maladies Infectieuses, Elsevier SAS, Paris.

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

Un poster résumant l'activité du **réseau LGV** est envoyé chaque année aux partenaires cliniciens et laboratoires participant au réseau. Le poster de l'année 2017 est joint en annexe et est disponible sur le site web du CNR. Celui de l'année 2018 est en préparation et devrait être envoyé en mai 2019.

Un poster résumant la **surveillance des génovars de *C. trachomatis* des infections urogénitales et la résistance de *M. genitalium* aux antibiotiques** en France métropolitaine en 2017 a été envoyé à tous les laboratoires participants et est disponible sur le site web du CNR. Il est joint en annexe.

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

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

- *Activités de conseil aux professionnels de santé :*

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

- Nous répondons, par email ou téléphone, à environ 2 ou 3 demandes par semaine concernant les activités d'expertise sur les mycoplasmes urogénitaux (conseils techniques pour la détection et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, conseils thérapeutiques) avec dans la moitié des cas confirmation de l'identification, recherche de résistance aux antibiotiques ou envoi d'extrait d'ADN de souches de référence à différents laboratoires.

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

5.1.2 Laboratoire APHP Saint-Louis et IAF

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

- Bercot B. Gonocoque et résistance aux antibiotiques : le point en 2018. 8^{ème} journée organisée par le Pôle d'Obstétrique Reproduction Gynécologie, Centre Aliénor d'Aquitaine, Gynépole, CHU de Bordeaux Université de Bordeaux, 6 avril 2018

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

Bercot B, Goubard A. *Neisseria gonorrhoeae*. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). 2018.

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

Une newsletter résumant les résultats de l'enquête Ngon2017 a été adressée aux partenaires laboratoires participants (voir annexe). La communication orale correspondante a été présentée à la RICAI 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 de web du CNR des IST bactériennes est en ligne depuis le 1^{er} janvier 2019 (www.cnr-ist.fr). Nos correspondants y trouvent tous les documents à envoyer pour expertise d'un échantillon ou d'une souche, Ils ont

également accès aux rapports du CNR (2017), aux recommandations de traitement des IST, à des documents et publications de référence et aux actualités concernant le CNR.

- *Activités de conseil aux professionnels de santé :*

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

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

- conseils techniques pour la détection et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des gonocoques,
- confirmation de l'identification,
- recherche de résistance aux antibiotiques,
- conseils thérapeutiques.

5.1.3 Laboratoire APHP Cochin

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

Nicolas Dupin, participation à de nombreux FMC et congrès :

- 32^{ème} congrès de la FFFCEDV, 22-23 Mars 2018, Palais des Congrès Antibes-Juin les Pins ; Master Class : MST : actualités cliniques et thérapeutiques
- 16^{ème} congrès Preuves et pratiques d'Ile de France, 17 Mars 2018, Palais des Congrès Paris : Quand penser à la syphilis ?
- 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, 17 Décembre 2018, Palais des Congrès Paris : Infections materno-fœtales, les nouveaux paradigmes, la Syphilis
- Séances des 4 saisons de la Société Française de Dermatologie, Séance du Jeudi 11 Octobre 2018, Maison de la RATP : La bouche est un organe sexuel comme les autres
- Journées Dermatologiques de Paris du 11-15 Décembre 2018, le Gridist présente actualités en infections sexuellement transmissibles, Forum 19 Vendredi 14 Décembre 2018 : Actualités dans la syphilis
- Nombreux cours dans le cadre de DU, DIU dans l'année 2018 :
 - * DIU Infection par le VIH de la Région Est coordonné par le Pr Chirouze, le 26 Avril 2018, Université de Besançon
 - * DIU, Paris VI et XII de Dermatologie Infectieuse coordonné par les Prs Chosidow et Caumes : la syphilis
 - * DIU de Stratégies thérapeutiques et préventives en pathologie infectieuse : MST chez l'homme
 - * DU, Paris VII de Maladies sexuellement transmissibles, infection à VIH en France coordonné par les Prs Matheron et Ghosn : La syphilis
 - * Séminaire des IST, séminaire du DES de Dermatologie, Hôpital Saint Louis, Musée des Moulages, Vendredi 12 Octobre 2018 : La syphilis
- Nombreuses FMC en 2018 pour des associations de dermatologues libéraux dans toute la France : Bordeaux, Besançon, Marseille, Dijon, Lyon

Ouvrages didactiques

- Rédaction des recommandations de prise en charge des MST

Nadjet Benhaddou

- **Congrès RICAI, 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 18-19 décembre 2018**
« Evolution des techniques diagnostiques de la syphilis »
- **« Syphilis Congénitale », Revue Francophone des laboratoires, février 2019**
- **« Syphilis Congénitale », Cours des Sages des Femmes P3, septembre 2018 – janvier 2019**

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

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

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

Parallèlement aux échantillons qui nous sont confiés pour expertise sérologique et moléculaire, nous avons également une très forte activité d'assistance dans la prise en charge des patients. En 2018, 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 2018. Une adresse email générique cnr.ist.cch@aphp.fr à cet effet.

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, Cécile Bébéar et Charles Cazanave ont participé 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. L'HAS a publié ses dernières recommandations en matière de dépistage de l'infection à *Chlamydia trachomatis* en septembre 2018 https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2879401/fr/reevaluation-de-la-strategie-de-depistage-des-infections-a-chlamydia-trachomatis.

Charles Cazanave et Bertille de Barbeyrac ont participé au groupe de travail rédigeant les recommandations pour la pratique clinique des infections génitales hautes, élaborées par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français en collaboration avec la Société de pathologie infectieuse de langue française. Elles sont parues en novembre 2018 et viennent d'être publiées dans Gynecol Obstet Fertil Senol.

Bertille de Barbeyrac participe au groupe de travail de l'International Union of Sexually Transmitted infections (IUSTI) révisant les recommandations de prise en charge de la lymphogranulomatose vénérienne, coordonné par Henri de Vries.

Le CNR des IST bactériennes a co-rédigé avec la Société Française de Dermatologie un communiqué sur la prise en charge des patients infectés par *M. genitalium* asymptomatiques (<http://www.sfdermato.org/actualites/communiqu-commun-gridist-et-sfd.html>).

5.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Béatrice Bercot a participé au 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.

Béatrice Bercot a participé au groupe de relecture des recommandations pour la pratique clinique des infections génitales hautes, élaborées par le Collège national des gynécologues et obstétriciens français en collaboration avec la Société de pathologie infectieuse de langue française.

Béatrice 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 Etude des infections à *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* au cours d'une cohorte de HSH et de travailleuses du sexe au Togo

Le CNR des IST bactériennes a collaboré avec Charlotte Charpentier, Diane Descamps (APHP hôpital Bichat) et Didier Ekouevi (Université de Lomé, Togo) dans le cadre d'une cohorte de 207 HSH et de 310 travailleuses du sexe suivies pour l'infection à HPV, HIV et autres IST en 2017.

Trente et un échantillons anaux d'HSH et 31 échantillons féminins (14 écouvillons anaux et 17 vaginaux) positifs à *M. genitalium* ont été envoyés au CNR à Bordeaux pour rechercher par biologie moléculaire la résistance aux antibiotiques. Des prévalences de 3,4% (1/27) et 16,7% (5/30) ont été retrouvées respectivement pour la résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones chez les HSH. Chez les travailleuses du sexe, seulement 3,8% des échantillons étaient résistants aux macrolides et il n'y avait pas de résistance aux fluoroquinolones.

Vingt-quatre échantillons d'HSH et 28 échantillons de travailleuses du sexe positifs à *N. gonorrhoeae* ont été envoyés au CNR à Paris, St Louis pour rechercher la résistance aux fluoroquinolones. Un taux très élevé de 90,9% (20/22) et 96,3% (26/27) d'échantillons mutés en *gyrA* a été retrouvé respectivement chez les HSH et les travailleuses du sexe.

Sur les 53 échantillons anaux et cervicaux *C. trachomatis*-positif envoyés à Bordeaux, 46 ont pu être génotypés. Les génotypes des 21 travailleuses du sexe se répartissaient comme suit : E>F>G>Da>la, comme retrouvé en France. En revanche, chez les HSH, la répartition était : E>F>G>Da>la>D, très proche de celle retrouvée chez les travailleuses du sexe et différente de celle observée pour les HSH en France (D>G>E>J en 2017).

Ces résultats seront à confirmer par l'étude plus importante qui va démarrer chez les HSH au Togo en 2019 (voir projet).

6.1.2 Laboratoire CHU de Bordeaux

- I-Predict

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

Cet essai clinique rentre dans le cadre de la cohorte i-Share (www.i-share.fr, 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. Des étudiantes âgées de 18 à 24 ans participant à la cohorte I-Share et provenant des Universités de Bordeaux, Versailles Saint-Quentin, Nice Sophia Antipolis et Paris intra-muros, sont suivies sur une période de 2 ans et incluses dans 2 bras, un bras contrôle, non dépisté avec conservation des échantillons, et un bras intervention dépisté et traité, avec analyse des échantillons et rendu des résultats positifs. Le CNR en tant que principal co-investigateur assure toute la logistique des échantillons vaginaux, réalise les tests diagnostiques CT/NG et participe à l'analyse des résultats. Les inclusions ont commencé en janvier 2016. 457 étudiantes ont été incluses en 2017 et 390 en 2018, soit au total 423 dans le bras intervention et 424 dans le bras contrôle.

Dans le bras intervention, la prévalence est de l'ordre de 2,5%, 11/423 à l'inclusion, 6/267 à M6, 2/167 à M12. Dans le bras contrôle, 82 étudiantes ont fini l'étude et l'ensemble des échantillons a pu être testé. Sur les 6 positives à J0, 4 n'ont pas envoyé leurs échantillons de suivi et les deux autres sont restées positives tout le long du suivi. Les visites finales sont en cours.

- 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*. La PEP par doxycycline utilisée dans l'essai ouvert Ipergay a montré une diminution significative des infections à *C. trachomatis* chez les PrEPeurs prenant la PEP par rapport à ceux ne la prenant pas (Molina et al, Lancet Infect Dis 2017). La prise de cette PEP par doxycycline pourrait conduire à la sélection de souches résistantes à cette classe d'antibiotiques.

La souche de référence L2/434/Bu a été mise en pression de sélection en présence de concentrations subinhibitrices croissantes de doxycycline. Vingt-six passages ont pu être réalisés sans augmentation de la concentration en antibiotique du milieu. Le séquençage de l'ARNr 16S, cible des tétracyclines, n'a révélé aucune mutation.

La recherche de mutations de l'ARNr 16S a été également recherchée dans des échantillons cliniques anaux de patients présentant une récurrence d'une infection à *C. trachomatis* et chez les patients PrEPeurs sous PEP à la doxycycline de la cohorte Ipergay. Aucune mutation n'a été identifiée. Ces résultats suggèrent que les souches de *C. trachomatis* ne développent pas de résistance à la doxycycline.

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

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

Les ICE ont été récemment décrits chez des espèces de mycoplasmes de ruminants. Dans cette étude, nous avons recherché la présence d'ICE au sein du génome de 12 souches de *M. hominis* par séquençage illumina et estimé la prévalence de ces ICE par PCR au sein de 120 isolats cliniques de *M. hominis* de notre collection.

Des ICE ont été retrouvés dans 7 des 12 génomes entièrement séquencés. Ce sont des éléments génétiques de 29 kpb présents en 1 ou 2 copies. Parmi les 120 souches cliniques dépistées par PCR, 45% avaient un ICE complet, 20% un ICE incomplet et 35% n'avaient pas d'ICE. Parmi ces souches, 27% hébergeaient le gène de résistance *tet(M)*. Aucune différence significative n'a été retrouvée dans la prévalence des ICE entre souches portant le *tet(M)* et celles ne le portant pas. Les ICE ne semblent donc pas impliqués dans la dissémination de la résistance aux tétracyclines chez *M. hominis*.

Cette étude fait partie des travaux de doctorat d'Alexandra Meygret et a été présentée en communication affichée à la Réunion de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 2018 et au congrès de l'International Organization for Mycoplasma (IOM), Portsmouth, USA, 2018. Une publication est en préparation.

6.1.3 Laboratoire APHP Saint-Louis

- Exploration des souches de gonocoque résistantes aux C3G sur la période 2008-2016

Le taux de souches de gonocoques de sensibilité diminuée ou résistantes au céfixime (CFM^{SD/R}, définies par une CMI au céfixime $\geq 0,125$ mg/L) avait atteint un pic en 2012, avec 3% des souches, contre 0,7% en 2011. Depuis 2014, le taux de souches de gonocoques CFM^{SD/R} s'était stabilisé aux alentours de 1% en France. Ce changement semblait corrélé aux recommandations européennes de 2012 pour le traitement probabiliste des gonococcies non compliquées, associé à l'intensification des dépistages.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux structures des populations de CFM^{SD/R} (CMI céfixime $\geq 0,125$ mg/L) isolées entre 2008 et 2016 avec une investigation par NGS pour déterminer la clonalité de ces souches et les déterminants génétiques responsables du phénotype CFM^{SD/R}.

Un échantillonnage de **180 souches recueillies sur la période 2008-2016** a été exploré. Les gonocoques étaient multirésistants aux antibiotiques avec une co-résistance à la tétracycline, la ciprofloxacine et l'azithromycine dans 95%, 99,3% et 5% des cas, respectivement. Trois souches présentaient un haut niveau de résistance à la ceftriaxone et 97,3% des isolats étaient sensibles à la ceftriaxone mais avec une CMI supérieure ou égale à l'E-coff (CMI $\geq 0,032$ mg/L). Des variants mosaïques de PLP2 associés à la perte de sensibilité aux C3G étaient présents pour 97,3% des souches vs 2,7% pour les non mosaïques. Les allèles mosaïques les plus représentés étaient *penA34.001* (67,8%) et *penA10.001* (27,2%). La perte de sensibilité aux C3G dans les 180 souches de gonocoques de notre étude était fortement liée à l'acquisition d'une PLP2 mosaïque comportant les altérations spécifiques I312M, V316T et G545S.

La phylogénie par comparaison des core-genomes montre l'existence de **2 clades majoritaires**. Le clade I regroupait 70% des souches, était associé au MLST1901, à l'allèle mosaïque *penA34.001*, au génogroupe G1407 dans 81. Le clade II, regroupait 27,8% des isolats, était associé au MLST7363, à l'allèle mosaïque *penA10.001* et à 2 génogroupes le G11018 présent de 2008 à 2014 et le G13876 présent en 2015 et 2016.

Notre étude rapporte un **changement dans la structure de la population des gonocoques CFM^{SD/R} depuis les recommandations européennes de traitement de 2012**, en comparant les souches de la période « pré-recommandations » (i.e. 2008-2012) avec les souches de la période « post-recommandations » (i.e. 2013-2016).

Le clade I était plus associé à la période 2008-2012 qu'à la période 2013-2016 (Odd Ratio ajusté = 32,24, IC95% = [7,00 – 148,36], $p < 0,001$ – test du X²). Le clade I était affilié **au complexe clonal du MLST1901, au génogroupe G1407 et à la mosaïque *penA34.001***. Dans le clade I, Le modèle statistique montre une diminution significative de sa prévalence depuis 2012 et des CMI élevées pour l'azithromycine. Cette tendance s'observe également pour les CMI ceftriaxone. Il semble être également associé à des patients de sexe masculin. Il correspond au clone à succès de G1407 qui a diffusé depuis le Japon sur tous les continents. Ce clone de G1407 représentait 23% des isolats européens en 2009-2010 et était associé à la population homosexuelle masculine (HSH) et à la multirésistance : 100% de résistance à la ciprofloxacine (CMI ≥ 32 mg/L), des CMI modales élevées pour le céfixime (CMI₅₀ = 0,125 mg/L), la ceftriaxone et l'azithromycine.

Le clade II était plus associé à la période 2013-2016 qu'à la période 2008-2012. Le clade II était affilié **au MLST7363, très prévalent au Japon et en Asie de l'Est**. Ce clade semblait moins clonal, représenté par 2 génogroupes qui se sont succédés à des périodes différentes. Les souches du clade II présentaient des CMI à l'azithromycine et à la ceftriaxone plus basses. La proportion de souches avec une CMI ceftriaxone $> 0,032$ mg/L (E-coff) était plus faible dans le clade II que dans le clade I (15,58% vs. 84,42%, $p = 0,001$). Ces souches étaient associées avec une population mixte de patients : 36 hommes et 13 femmes pour le clade II contre 112 hommes et 14 femmes dans le clade I ($p = 0,011$ – test du X²), et semble évoluer dans un environnement différent de celui du clade I.

Cette étude fait partie des travaux de doctorat en Pharmacie et de Master 2 Recherche de Thibaut Poncin ; elle a été présentée en communication orale à la Réunion de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 2018 et sera présenté en communication orale à l'ECCMID 2019. L'analyse statistique est effectuée en collaboration avec le Dr Delphine Viriot de l'équipe de Florence Lot à Santé Publique France.

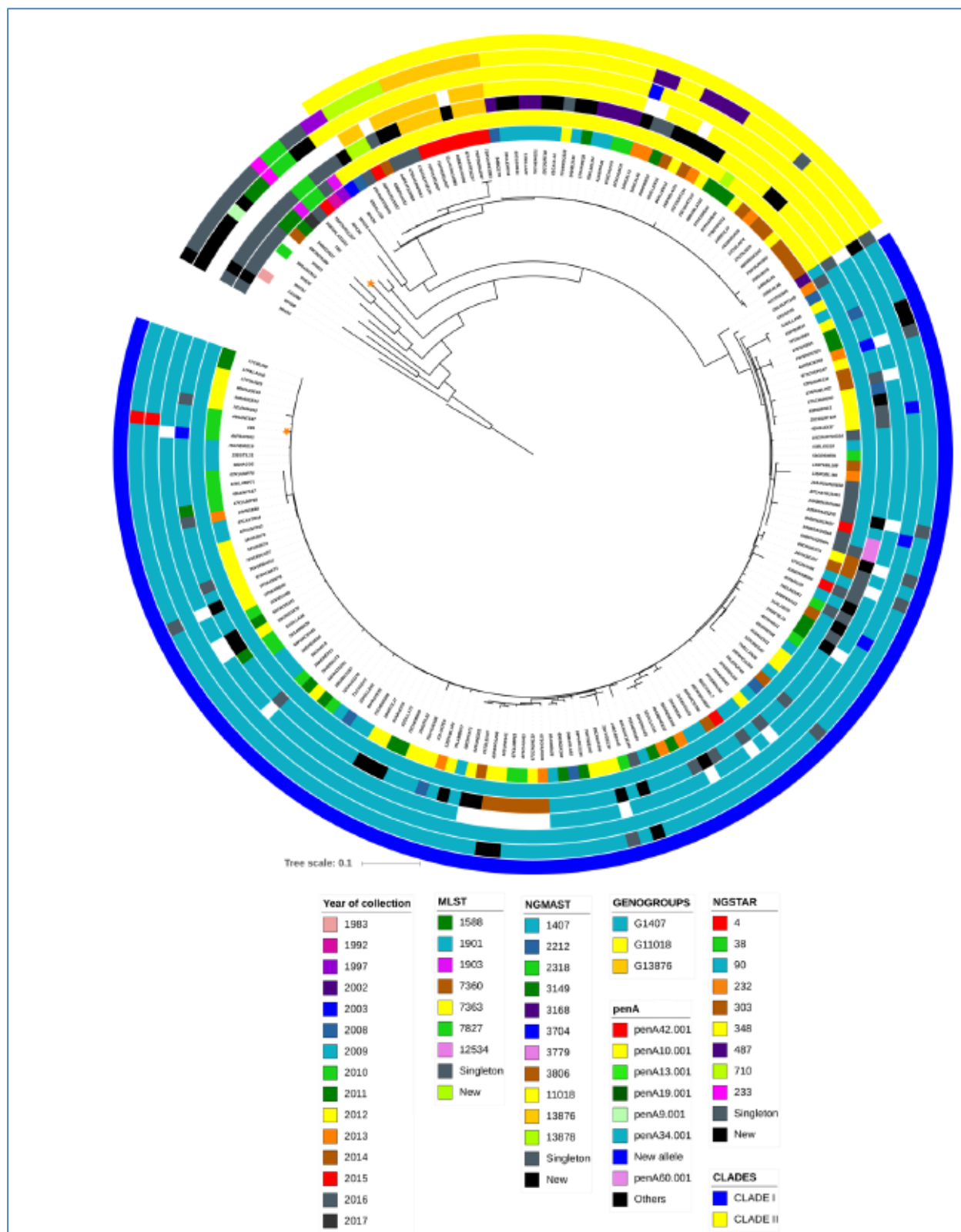


Figure. Arbre phylogénétique, en technique de maximum de vraisemblance, basé sur la comparaison des 18421 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) des core-genome des 191 assemblages. Les sets de données sont disposés de façon circulaire avec de l'intérieur vers l'extérieur : l'année d'isolement de la souche, le MLST, le NG-MAST, le génogroupe, l'allèle de *penA*, le NG-STAR et le clade. Les deux souches F89 et F90 sur l'arbre ont été repérées par une étoile orange. La plus grande branche de l'arbre (set de données bleu) correspond au clade I (n = 126 souches). La branche occupant le quart supérieur de l'arbre (set de données jaune) correspond au clade II (n = 49 souches). Pour chaque set de données, les singletons non informatifs ont été colorés en gris.

- **Gonocoques multirésistants : étude des CMI d'antimicrobiens non conventionnels**

L'émergence d'isolats de *N. gonorrhoeae* résistants aux C3G est inquiétante. La bithérapie associant la ceftriaxone et l'azithromycine est recommandée en Europe depuis 2012 afin de contenir le réservoir de NG multirésistants (MDR-NG). Le but de notre étude était d'évaluer la sensibilité *in vitro* à d'autres agents antimicrobiens dans une collection d'isolats de gonocoque MD Ret d'isolats de référence de l'OMS.

Trente-cinq isolats de gonocoque ont été testés pour leur sensibilité aux antimicrobiens, dont 25 souches MDR (MDR-NG) présentant des CMI élevées aux C3G (CMI céfixime $\geq 0,125$ mg/L) et 10 isolats de référence de l'OMS. Les CMI de **12 antibiotiques (gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine, spectinomycine, streptomycine, ertapénème, céfépime, céfotaxime, nitrofurantoïne, linézolide et fosfomycine)** ont été déterminées par E-test (BioMérieux, Marcy Etoile). Les critères du CA-SFM et de l'EUCAST v 7.1 (si documentés) ont été utilisés pour l'interprétation.

Parmi les 25 isolats MDR-NG, 23%, 77% et 86% étaient respectivement résistants à l'azithromycine, à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Pour les aminoglycosides, les CMI les plus basses étaient observées pour la gentamicine [2-8mg/L], la netilmicine [2-8mg/L], la tobramycine [4-8mg/L] et la spectinomycine [8-16mg/L] versus l'amikacine [32-64mg/L]. Une augmentation des CMI de l'ertapénème [<0.002 -0.032mg/L], du céfépime [0.032-8 mg/L], du céfotaxime [0.032-2mg/L], et de la ceftriaxone [0.032-2mg/L] a été observée pour les isolats résistants au céfixime [0.125-4mg/L]. Les CMI étaient de [4-16mg/L], [0,125-8mg/L] et [1-16 mg/L] à la fosfomycine, à la nitrofurantoïne et au linézolide, respectivement. En utilisant les concentrations critiques non reliées à une espèce (EUCAST v 7.1), les souches pouvaient être caractérisées sensibles à la nitrofurantoïne et à la fosfomycine et résistantes au linézolide.

Ce travail met en évidence **des CMI basses à la gentamicine pour les souches MDR-NG**, molécule proposée en seconde intention pour le traitement des gonococcies. Des études cliniques restent nécessaires pour évaluer l'efficacité clinique de ces traitements dans les localisations génitales et extragénitales. L'ertapénème pourra être envisagé pour le traitement des infections disséminées à MDR-NG.

Cette étude a été présentée en poster à la Réunion de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 2018.

- ***N. gonorrhoeae* : détection de la résistance à la tétracycline directement à partir d'échantillons cliniques.**

La doxycycline a récemment montré son efficacité dans la diminution des IST bactériennes chez les HSH ne se protégeant pas lors des rapports sexuels. Or, ces patients sont habituellement asymptomatiques et peu de souches de gonocoques sont disponibles pour l'étude de la résistance. Dans un contexte de résistance élevée du gonocoque à la tétracycline en France en 2017 (65,4%), le but de cette étude était de développer de nouveaux outils pour explorer la résistance moléculaire de NG à la tétracycline (TET) à partir d'échantillons cliniques.

Cinquante souches de gonocoques et 50 échantillons cliniques correspondants (37 urines, 9 anus et 3 urèthres, 1 gorge) ont été collectés **chez des HSH consultant au CeGGID de l'Hôpital Saint-Louis**. Les CMI de la tétracycline ont été déterminés par Etest (Biomérieux). Les ADN des souches et les échantillons ont été extraits par EasyMag (Biomérieux). Les amorces utilisées pour les échantillons ont été choisies dans une région conservée de NG par comparaison avec les autres *Neisseria*. Les PCR ciblaient le gène plasmidique *tet(M)*, le gène *rpsJ* codant la protéine S10 (V57M) et le gène *mtrR* represseur du système d'efflux MtrCDE. Les séquences obtenues ont été analysées par Bioedit par rapport une matrice NG FA1090 de référence et comparées à celles obtenues à partir des souches. Parmi les 50 gonocoques, 44 étaient résistants à la tétracycline [22 à haut niveau (CMI ≥ 16 mg/L), 22 à bas niveau ($1 < \text{CMI} < 16$ mg/L)] et 6 étaient intermédiaires [$0,5 < \text{MIC} \leq 1$ mg/l]. Le gène *tet(M)* a été détecté pour les 22 gonocoques de haut niveau de résistance. La substitution V57M dans la protéine S10 qui confère un bas niveau de résistance était présente pour 48/50 des souches exceptées 2 qui portaient le *tet(M)*. La délétion delA du promoteur du gène *mtrR* et des mutations de la protéine MtrR étaient retrouvées dans 52% (26/50) et 72% (36/50) des souches, respectivement. Les mêmes mutations ont été trouvées dans les 50 échantillons cliniques correspondants.

Dans notre étude, 100% de résultats concordants ont été obtenus à partir des échantillons cliniques et des cultures. Ces procédures permettront de dépister la résistance à la tétracycline à partir d'échantillons cliniques, en l'absence de souches. Cette étude a été présentée en poster à la Réunion de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) 2018.

6.1.4 Laboratoire APHP Cochin

Thèse exercice de pharmacie de Mme Naila MAHRAOUI portant sur « Etude rétrospective sur les cas de syphilis congénitale ».

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, C. Bébéar. Infections à *Mycoplasma hominis*. In: Encycl. Méd. Chir., Maladies Infectieuses, Elsevier SAS, Paris. sous presse.

J.-L. Brun, B. Castan, B. de Barbeyrac, C. Cazanave, A. Charvériat, K. Faure, S. Mignot, R. Verdon, X. Fritel, O. Graesslin. Les infections génitales hautes. Mise à jour des recommandations pour la pratique clinique – texte court. Gynecol Obstet Fertil Senol. 2019 Mar 14.

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

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

C. Bébéar, S. Pereyre. *Mycoplasma* et *Ureaplasma* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). 2018.

B. de Barbeyrac, *Chlamydia* spp. Référentiel en microbiologie médicale (REMIC) 6^{ème} édition, Société Française de Microbiologie (ed). 2018.

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). 2018.

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

C. Bébéar, Ch. Bébéar. 2018. Mycoplasmes. In : Encycl. Méd. Chir., Biologie médicale. 13(1):1-12.

Publications internationales

O. Peuchant, A. Touati, C. Laurier, N. Hénin, C. Bébéar, B. de Barbeyrac. Are pre-exposure prophylaxis users at risk of Lymphogranuloma venereum acquisition? Soumis à Emerg Infect Dis.

M. Deborde, S. Pereyre, M. Puges, C. Bébéar, A. Desclaux, M. Hessamfar, C. Le Roy, F. Le Marec, F. Dabis, C. Cazanave. 2018. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection and macrolide resistance in patients enrolled in HIV Pre-exposure Prophylaxis program. Med. Mal.Infect. Sous presse.

K.B. Waites, C. Bébéar. 2019. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*, pp.1117-1136. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. ASM Press, Washington DC.

C. Bébéar, J. S. Dumler. 2019. Algorithms for identification of *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and obligate intracellular bacteria, pp. 1109-116. In Manual of Clinical Microbiology, 12th edition. ASM Press, Washington DC.

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

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

J. Tamarelle, A.C.M. Thiébaud, B. de Barbeyrac, C. Bébéar, J. Ravel, E. Delarocque-Astagneau. 2018. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and

Mycoplasma genitalium infections: a systematic review and meta-analysis. Clin. Microbiol. Infect. pii: S1198-743.

T. Poncin, S. Fouere, A. Braille, F. Camelena, M. Agsous, C. Bébéar, S. Kumanski, F. Lot, S. Mercier-Delarue, N.N. Ngangro, M. Salmona, N. Schnepf, J. Timsit, M. Unemo, B. Bercot. 2018. Multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France, November 2017. Euro Surveill. 23 : 21.

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. 2018. Observational study of anorectal *Chlamydia trachomatis* infections in France through the lymphogranuloma venereum network, 2010-2015. Int.J. STD AIDS.29 : 1215-1224.

A. Meygret, C. Le Roy, H. Renaudin, C. Bébéar, S. Pereyre. 2018. Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015 J. Antimicrob. Chemother. 73 : 2696-2703.

S. Pereyre, C. Bénard, C. Brès, C. Le Roy, J.P. Mauxion, F. Rideau, P. Sirand-Pugnet, B. Henrich, C. Bébéar. 2018. Generation of *Mycoplasma hominis* gene-targeted mutants by targeting-induced local lesions in genomes (TILLING). BMC Genomics. 19 : 525.

G. Kayem, A. Doloy, T. Schmitz, Y. Chitrit, P. Bouhanna, B. Carbonne, J. M. Jouannic, L. Mandelbrot, A. Benachi, E. Azria, F. Maillard, F. Fenollar, C. Poyart, C. Bébéar, F. Goffinet. 2018. Antibiotics for amniotic-fluid colonization by *Ureaplasma* and/or *Mycoplasma* spp. to prevent preterm birth: A randomized trial. PLoS One. 13. e0206290.

J Tamarelle, B. de Barbeyrac, I. Le Hen, A. Thiébaut, C. Bébéar, J. Ravel, E. Delarocque-Astagneau. 2018. Vaginal microbiota composition and association with prevalent *Chlamydia trachomatis* infection: a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France. Sex. Transm. Infect. 94 : 616-618.

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. 2018. 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. 18:308-317.

N. Etienne, L. Bret, C. Le Brun, H. Lecuyer, J. Moraly, F. Lanternier, O. Hermine, A. Ferroni, M. Lecuit, S. Pereyre, L. Béven, O. Lortholary. Disseminated *Spiroplasma apis* infection in patient with agammaglobulinemia, France. Emerg. Inf. Dis., 2018, 24, 12, 2382-2384.

Communications nationales

N. Schnepf, A. Braille, T. Poncin, M. Mérimèche, C. Monin, C. Bébéar, B. Bercot et Réseaux gonocoque des hôpitaux. 2018. Enquête nationale 2017 de surveillance des infections à *Neisseria gonorrhoeae* 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 17-18 décembre, Paris. Communication orale.

T. Poncin, M. Mérimèche, F. Camelena, P. Arias, C. Bébéar, A. Braille, J. Brayet, H. Jacquier, H. Jourdain, F. Lot, N.N. Ngangro, S. Mercier-Delarue, M. Salmona, N. Ranger, A. Goubard, B. Bercot. 2018. Gonocoques résistants au céfixime : remaniements des PLP et clonalité. 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 17-18 décembre, Paris. Communication orale.

L. Alleman, M. Ducours, M. Puges, M. Deborde, F. Le Marec, M. Hessamfar, F. Bonnet, F. Dabis, C. Bébéar, B. de Barbeyrac, C. Cazanave. 2018. Gonocoques chez les usagers de PrEP : pas si résistants qu'attendus... 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 17-18 décembre, Paris. Communication orale.

O. Peuchant, A. Touati, C. Laurier, N. Hénin, C. Bébéar, B. de Barbeyrac. Prévalence élevée de LGV chez les patients sous PrEP. Journées Nationales d'Infectiologie, 13-15 Juin, 2018, Nantes. Communication orale.

A. Meygret, O. Peuchant, E. Dordet-Frisoni, P. Sirand-Pugnet, C. Citti, C. Bébéar, S. Pereyre. 2018. Integrative and conjugative elements and tetracycline resistance in *Mycoplasma hominis*. 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 17-18 décembre, Paris. Poster.

T. Poncin, S. Fouere, A. Braille, F. Camelena, M. Agsous, C. Bébéar, S. Kumanski, F. Lot, S. Mercier-Delarue, N. N. Ngangro, M. Salmona, N. Schnepf, J. Timsit, B. Bercot. 2018. Nouvelle souche de gonocoque résistante à la ceftriaxone, Paris, 2017. 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris. 17-18 décembre, Paris. Poster.

S.A. Gibaud, E. Thomas, L. Crémet, J. Coutherut, C. Bernier, M. Lefebvre, S. Pereyre, J. Caillon. 2018. Evaluation du kit ResistancePlus™ MG assay Speedx pour la détection simultanée de *Mycoplasma genitalium* et de la résistance

à l'azithromycine. 19^{èmes} Journées Nationales d'Infectiologie, Juin, Nantes. Poster.

Communications internationales

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

H.M. B. Seth-Smith, D. Goldenberger, A. Bénard, J. Kok, O. Peuchant, C. Bébéar, D. A. Lewis, B. Versteeg, D. Kese, E. Balla, H. Zákoucká, F. Rob, S. A. Morré, I. Carter, B. Hermann, J. C. Galán, S. M. Bruisten, B. de Barbeyrac, H. J. de Vries, N. R. Thomson, A. Egli. 2019. Exploring the *ompA* diversity of circulating *Chlamydia trachomatis* LGV strains: ongoing evolution of L2b. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 13-16 April, Amsterdam, Netherlands. Poster.

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

S. Pereyre, C. Bénard, C. Brès, C. Le Roy, J. P. Mauxion, F. Rideau, P. Sirand-Pugnet, B. Henrich, C. Bébéar. 2018. Generation of *Mycoplasma hominis* gene-targeted mutants by targeting-induced local lesions in genomes (TILLING). 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 9-7 July Portsmouth, NH, USA. Communication orale.

A. Meygret, C. Le Roy, H. Renaudin, S. Pereyre, C. Bébéar. 2018. Tetracycline and fluoroquinolone resistance in clinical *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* isolates in France between 2010 and 2015. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 9-7 July Portsmouth, NH, USA. Communication orale.

A. Meygret, O. Peuchant, E. Dordet-Frisoni, P. Sirand-Pugnet, C. Citti, C. Bébéar, S. Pereyre. 2018. High prevalence of integrative and conjugative elements (ICE) in *Mycoplasma hominis*. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 9-7 juillet Portsmouth, NH, USA. Poster.

N. Etienne, C. Le Brun, H. Lecuyer, J. Moraly, F. Lanternier, O. Hermine, M. Lecuit, S. Pereyre, L. Beven, O. Lortholary. 2018. Disseminated *Spiroplasma apis* infection in an agammaglobulinemic patient. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 9-7 juillet Portsmouth, NH, USA. Poster.

F. Rideau, C. Le Roy, H. Renaudin, C. Lartigue, C. Bébéar. 2018. Cloning, stability and modification of *Mycoplasma hominis* genome in Yeast. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 9-7 juillet Portsmouth, NH, USA. Poster.

A. Touati, B. Hermann, C. Laurier, N. Hénin, C. Bébéar, B. de Barbeyrac, O. Peuchant. 2018. MLVA genotyping of *Chlamydia trachomatis* genovar E shows a clonal spread of a strain among men who have sex with men. 4th International Symposium on Human Chlamydial infections, 01-06 July, Zeist, Netherlands. Poster.

B. de Barbeyrac, D. Baïta, A. Touati, O. Peuchant. 2018. Does *Chlamydia trachomatis* anal infection occur with vaginal infection in women? 4th International Symposium on Human Chlamydial infections, 01-06 July, Zeist, Netherlands. Communication orale.

O. Peuchant, A. Touati, C. Laurier, N. Hénin, C. Bébéar, B. de Barbeyrac. 2018. High prevalence of *Chlamydia trachomatis* genovar L strains among PrEP users. 4th International Symposium on Human Chlamydial infections, 01-06 July, Zeist, Netherlands. Communication orale.

N. Gastli, A.C. Mahéroult, A.M. Simonpoli, J.L. Lopez Zaragoza, L. Mandelbrot, G. Barnaud, S. Pereyre, L. Landraud. 2018. High prevalence of azithromycin-resistant *Mycoplasma genitalium* in a French University Hospital. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21-24 avril, Madrid, Espagne. Poster.

M. Ducours, L. Alleman, M. Deborde, O. Peuchant, S. Pereyre, C. Bébéar, P. Duffau, F. Le Marec, F. Bonnet, F. Dabis, M. Hessamfar, C. Cazanave. 2018. Incidence et résistance aux antibiotiques des IST chez les PrEPeurs bordelais : bilan à 2 ans préoccupant. 9^{ème} conférence internationale Francophone VIH/Hépatites (AFRAVIH), 04-07 avril, Bordeaux. Communication orale.

Conférences sur invitation

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

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

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

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

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

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

S. Pereyre. 2019. *Mycoplasma genitalium*, un agent d'IST émergent. Biomed J, 22-23 mars, Paris.

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

B. de Barbeyrac. IST à Chlamydiae et mycoplasmes : même combat ? XV^{ème} journées thématiques de biologie médicale de la Guadeloupe. 8-9 décembre 2018. Le Gosier, Guadeloupe.

S. Pereyre. 2018. Infections à mycoplasmes urogénitaux au cours de la grossesse : quelles conséquences ? 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 17-18 décembre, Paris.

B. de Barbeyrac. 2018. Epidémiologie moléculaire des infections urogénitales et rectales à *Chlamydia trachomatis*. 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 17-18 décembre, Paris.

C. Bébéar. Comment dépister et traiter les IST ? Journée Nationale des CeGIDD. 6 décembre 2018, Paris.

C. Bébéar. L'élargissement des indications des macrolides au long cours doit-il faire craindre l'émergence de *Mycoplasma pneumoniae* résistant aux macrolides ? 6^{èmes} journées du GREPI. 22-23 novembre, Chantilly.

C. Bébéar. Résistance, épidémiologie et nouveaux outils de dépistage des IST. JEEC1, 18 octobre, Paris.

S. Pereyre. 2018. Mechanisms of antimicrobial resistance in Mollicutes in vitro and in vivo. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. 07-09 juillet, Portsmouth, NH, USA.

C. Bébéar. 2018. MIC measurement by standardized methods and use of commercial systems for detection of antimicrobial resistance in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp. 22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. 07-09 juillet, Portsmouth, NH, USA.

S. Pereyre. 2018. Global challenge of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium*. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21-24 April, Madrid, Spain.

C. Bébéar. 2018. Sexually transmitted infections in pregnancy and congenital infections. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21-24 April, Madrid, Spain.

C. Bébéar. 2018. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections and outbreak management. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 21-24 April, Madrid, Spain.

C. Bébéar. 2018. Prophylaxie médicamenteuse des IST. 9^{ème} Conférence Internationale Francophone (AFRAVIH), 04-07 avril, Bordeaux.

C. Cazanave. 2018. Résistance des IST. 9^{ème} Conférence Internationale Francophone (AFRAVIH), 04-07 avril, Bordeaux.

C. Bébéar. 2018. Résistance bactérienne au cours des IST. Journées thématiques de la SPILF. 29-30 mars, Paris.

C. Bébéar. 2018. Dépistage des IST : Quels nouveaux outils ? Quelles recommandations ? Journées thématiques de la SPILF. 29-30 mars, Paris.

6.2.2 Laboratoire APHP Saint-Louis

Publications nationales

Poncin T, Bercot B. Le Gonocoque : le point en 2018. Les feuillets de Biologie : n°347, Mars 2019, page 35-47

Publications internationales

Molina JM, Charreau I, Chidiac C, Pialoux G, Cua E, Delaugerre C, Capitant C, Rojas-Castro D, Fonsart J, Bercot B, Bébéar C, Cotte L, Robineau O, Raffi F, Charbonneau P, Aslan A, Chas J, Niedbalski L, Spire B, Sagaon-Teyssier L, Carette D, Mestre SL, Doré V, Meyer L; ANRS IPERGAY Study Group. 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*. 2018 Mar;18(3):308-317.

Sellier PO, Maylin S, Brichler S, Bercot B, Lopes A, Chopin D, Pogliaghi M, Munier AL, Delcey V, Simoneau G, Evans J, Gordien E, Simon F, Bergmann JF. Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country. *Liver Int*. 2018 Apr;38(4):611-618.

Poncin T, Fouere S, Braille A, Camelena F, Agssous M, Bébéar C, Kumanski S, Lot F, Mercier-Delarue S, Ngangro NN, Salmona M, Schnepf N, Timsit J, Unemo M, Bercot B. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France, November 2017. *Euro Surveill*. 2018 May;23(21).

Unal G, Alessandri-Gradt E, Leoz M, Pavie J, Lefèvre C, Panjo H, Charpentier C, Descamps D, Barin F, Simon F, Meyer L, Plantier JC; ORIVAO Study. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Infection in France: Clinical Features and Immunovirological Response to Antiretrovirals. *Clin Infect Dis*. 2018 May 17;66(11):1785-1793.

Harris SR, Cole MJ, Spiteri G, Sánchez-Busó L, Golparian D, Jacobsson S, Goater R, Abudahab K, Yeats CA, Bercot B, Borrego MJ, Crowley B, Stefanelli P, Tripodo F, Abad R, Aanensen DM, Unemo M; Euro-GASP study group. Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jul;18(7):758-768.

Leblanc J, Hejblum G, Costagliola D, Durand-Zaleski I, Lert F, de Truchis P, Verbeke G, Rousseau A, Piquet H, Simon F, Pateron D, Simon T, Crémieux AC; 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*. 2018 Jul;72(1):41-53.e9.

Golparian D, Rose L, Lynam A, Mohamed A, Bercot B, Ohnishi M, Crowley B, Unemo M. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate, belonging to the internationally spreading Japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018. *Euro Surveill*. 2018 Nov;23(47).

Morel F, Jacquier H, Desroches M, Fihman V, Kumanski S, Cambau E, Decousser JW, Bercot B. Use of Andromas and Bruker MALDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;37(12):2273-2277.

Day MJ, Spiteri G, Jacobsson S, Woodford N, Amato-Gauci AJ, Cole MJ, Unemo M; Euro-GASP network. Stably high azithromycin resistance and decreasing ceftriaxone susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* in 25 European countries, 2016. *BMC Infect Dis*. 2018 Dec 3;18(1):609.

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

Communications nationales

T. Poncin, F. Camelena, A. Braille, A. Goubard, B. Bercot. *Neisseria gonorrhoeae* multirésistants : détermination des CMI d'antimicrobiens non conventionnels. 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Poster 272, 17-18 décembre 2018, Paris.

T Poncin, M Mérimèche, F Camelena, P Arias, C Bébear, A Braille, Josselin Brayet, H Jacquier, Hugo Jourdain, F Lot, NN Ngangro, S Mercier-Delarue, M Salmona, N Ranger, A Goubard, B Bercot. Gonocoques résistants au céfixime : remaniements des PLP et clonalité. 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Communication orale 091, 17-18 décembre 2018, Paris.

T Poncin, S Fouere, A Braille, F Camelena, M Agsous, C Bebear, S Kumanski, F Lot, S Mercier-Delarue, NN Ngangro, M Salmona, N Schnepf, J Timsit, B Bercot. Nouvelle souche de gonocoque résistante à la ceftriaxone, Paris, 2017. 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Poster 280, 17-18 décembre 2018, Paris

A Braille, N Schnepf, K Djelloul, E Cambau, C Delaugerre, S Mercier-Delarue, H Jacquier, C Monin, C Rousseau, S Fouéré, JM Molina, B Bercot. *Neisseria gonorrhoeae* : résistance à la tétracycline sur échantillons cliniques. 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Poster 279, 17-18 décembre 2018, Paris

N Schnepf, A Braille, T Poncin, M Mérimèche, C Monin, C Bébear, B Bercot & Réseaux gonocoque des hôpitaux. Enquête nationale 2017 de surveillance des infections à *Neisseria gonorrhoeae*. 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Communication orale 091, 17-18 décembre 2018, Paris

Communications internationales

Poncin T, Braille A, Agsous M, Camelena F, Kumanski S, Mercier-Delarue S, Ndeinkooundam N, Salmona M, Schnepf N, Timsit J, Fouere S, Bercot B. A novel high-level ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate in Paris, France, November 2017. Communication orale n°1142, 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelone, 21-24 April 2018.

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

Bercot B, Charreau I, Rousseau C, Delaugerre C, Chidiac C, Pialoux G, Capitant C, Bourgeois-Nicolaos N, Raffi F, Pereyre S, Senneville E, Meyer L, Bébéar C, Molina JM, and the ANRS Ipergay Study Group. High Prevalence and Antibiotic Resistance of *M. genitalium* Infections in MSM on PrEP. Conference on retroviruses and Opportunistic Infections, Poster 966, 1-4 mars 2019, Seattle.

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

Conférences sur invitations

Bercot B. Gonocoque et résistance aux antibiotiques : le point en 2018. 8ème journée organisée par le Pôle d'Obstétrique Reproduction Gynécologie, Centre Aliénor d'Aquitaine, Gynépole, CHU de Bordeaux Université de Bordeaux, 6 avril 2018.

Bercot B. Epidémiologie des infections à gonocoque suivant les populations. Communication orale, 38ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 17-18 décembre 2018, Paris

6.2.3 Laboratoire APHP Cochin

Publications internationales

N. Ngangro Ndeikoundam, D. Viriot, E. Lucas, M. Boussac-Zarebska, F. Lot, N. Dupin, G. La Ruche. 2018. Relevance of healthcare reimbursement data to monitor syphilis epidemic: an alternative surveillance through the national health insurance database in France, 2011-2013. *BMJ Open*. 8(7):e020336.

P. Pospíšilová, P. A. Grange, L. Grillová, L. Mikalová, P. Martinet, M. Janier, A. Vermersch, N. Benhaddou, P. Del Giudice, I. Alcaraz, F. Truchetet, N. Dupin, D. Šmajš. 2018. Multi-locus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* present in clinical samples from France: Infecting treponemes are genetically diverse and belong to 18 allelic profiles. *PLoS One*. 13(7):e0201068.

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

Publications nationales

N. Benhaddou. « Syphilis Congénitale », *Revue Francophone des laboratoires*, février 2019

Conférences sur invitation

N. Benhaddou. 2018. « Evolution des techniques diagnostiques de la syphilis », 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. 17-18 décembre, Paris.

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

Le CNR IST bactériennes n'est pas concerné.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

8.1 Evaluation de trousse diagnostiques

8.1.1 Evaluation de PCR multiplex IST pour 2019

En 2019, les laboratoires de Bordeaux et de l'APHP Saint Louis évalueront 4 kits de PCR multiplex en temps réel à partir de leurs échantillons négatifs et positifs pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis*.

Seront recueillis en prospectif à partir de janvier 2019 100 échantillons positifs et 100 échantillons négatifs pour chacun des 4 pathogènes. Les échantillons seront tous extraits à Paris en quantité suffisante pour traiter les extraits à Paris et les envoyer également à Bordeaux.

Nous envisageons d'évaluer **les 4 trousse diagnostiques marquées CE suivantes** :

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

Le CHU de Bordeaux évaluera **3 trousse de PCR en temps réel multiplex ou simplex pour le diagnostic de la LGV** avec détection de *C. trachomatis* génovar L :

- Allplex™ Genital ulcer Assay de Seegene revendu par Eurobio ; c'est une PCR en temps réel multiplex qui détecte HSV 1 et 2, *H. ducreyi*, CMV, *C. trachomatis* génovar L, *T. pallidum*, et VZV
- RealCycler ULCGEN-U/ULCGEN-G de Progenie Molecular revendu par Orgentec ; c'est une PCR en temps réel multiplex qui détecte HSV 1 et 2, *C. trachomatis* génovar L et *T. pallidum*
- RealCycler CHSL-U/CHSL-G de Progenie Molecular revendu par Orgentec ; c'est une PCR en temps réel monoplex qui détecte *C. trachomatis* génovar L.

Les tests seront réalisés sur le CFX96™ Real-time PCR System (Bio-Rad), appareil validé pour les différentes trousse. Cent échantillons seront sélectionnés à partir des prélèvements typés en 2017 dans le cadre du réseau de surveillance des anorectites à *C. trachomatis* provenant de patients sous PrEP, HIV-négatif, syphilis-positif ou négatif ou de patients HIV-positif, syphilis positive ou négative. Les échantillons positifs pour *T. pallidum* seront envoyés au laboratoire de N. Dupin pour contrôle.

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

Le laboratoire de St Louis évaluera **la trousse CT/NG/MG/TV** sur l'Allinity (Abbott) versus les trousse CT/NG et MG/TV sur le Cobas 6800 (Roche) à partir de leurs échantillons négatifs et positifs pour *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* et *T. vaginalis*.

8.1.3 Evaluation de trousse pour le diagnostic de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides

Le CNR des IST bactériennes va évaluer les performances cliniques de **trois trousse de PCR commercialisées pour le diagnostic de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides**. Environ 200 échantillons urogénitaux positifs pour *M. genitalium* seront collectés prospectivement au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Après extraction d'ADN, ces échantillons seront soumis à trois trousse commerciales de PCR en temps réel : la trousse SpeedX ResistancePlus MG assay, la trousse Diagenode S-DiaMGRES assay et la trousse PathoFinder Real accurate TVMG^{RES}, en comparaison à notre PCR en temps réel maison de type FRET couplée au séquençage de l'ARNr 23S utilisés comme référence.

8.1.4 Validation du Test Tréponémique Syphilis Tp sur LCR (Architect Abbott) en cours.

8.1.5 Contrôle qualité

Mise en place d'un contrôle qualité national pour la sérologie syphilis en collaboration avec l'ANSM.

8.2 Ipergay et syphilis

Dans une approche préliminaire de détection de l'ADN de *T. pallidum* à partir de plasma et d'écouillons oraux et anaux chez 13 patients, nous avons analysé 71 échantillons par nPCR *tp47* et montré une positivité dans 6 d'entre eux. Cette étude va être amplifiée sur un plus grand nombre d'échantillons afin d'estimer le pourcentage de portage de *T. pallidum* dans cette population.

8.3 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 le Pr J.-M. 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. Elle a démarré en mai 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 du Dr 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 nous avons 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 circulantes chez ces patients et l'élaboration de recommandations sur la nécessité de rechercher CT/NG/MG dans les 3 sites (anus, gorge, urine) de patients HSH symptomatiques ou asymptomatiques.

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

8.4 Projet de recherche clinique Remind/ Memodépistages, 2018-2021, Santé Publique France -

Le projet **Remind/ Memodépistages** vise à promouvoir le dépistage répété du VIH chez les HSH en France. Il vise à proposer une solution personnalisée reposant sur les préférences des individus, évolutive dans le temps et combinant les différents types de tests et de dispositifs (autotest, consultation en CEGIDD, en médecine générale, dépistage communautaire) et sur une offre expérimentale (envoi à domicile d'un kit pour des auto-prélèvements sanguin, urinaire, oropharyngé et anal). Cette étude s'adresse aux HSH régions IDF, ARA et PACA et a débuté en avril 2018 avec un recrutement en ligne via un site internet dédié. Une fois inclus dans l'étude, les sujets reçoivent à domicile un kit d'auto-prélèvement pour le dépistage du VIH, du VHB, du VHC, de la syphilis, de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Ils seront suivis pendant 18 mois tous les 3 mois. A M+12, un kit d'auto-prélèvement pour le dépistage combiné du VIH, du VHB, du VHC, de la syphilis, de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* leur seront à nouveau proposés afin de respecter la recommandation d'au moins un dépistage des IST par an.

Le recrutement s'est fait du 11 avril au 10 juin 2018. Deux mille vingt participants ont renvoyé un kit complet. Parmi les plus de 2000 échantillons urinaires, pharyngés et anaux tests, environ **9% des sujets avaient au moins un site positif à Chlamydia ou à gonocoque.**

Les échantillons positifs à *C. trachomatis* (environ 200 dont 133 en Ile de France) et *N. gonorrhoeae* (223 dont 169 en Ile de France) ont été envoyés par les 4 centres participants (Paris, Lyon, Montpellier et Marseille) au CNR des IST bactériennes pour :

- le typage des échantillons *C. trachomatis* (+) à Bordeaux (C. Bébéar)
- le typage des échantillons *N. gonorrhoeae* (+) et recherche de résistance aux bêta-lactamines et fluoroquinolones (B. Berçot). Les analyses sont en cours.

Nous proposons lors du kit envoyé à M12 en avril 2019, quand seront à nouveau recherchées les IST bactériennes, pour la patients inclus en Ile de France, **de tester également *M. genitalium***, IST émergente dont l'histoire naturelle est mal connue chez les HSH. Les tubes d'analyse CT/NG/MG seront centralisés à l'hôpital St Louis.

Les échantillons positifs à CT, NG et MG seront envoyés au CNR des IST bactériennes pour :

- le typage des échantillons *C. trachomatis* (+) à Bordeaux (C. Bébéar)
- le typage des échantillons *N. gonorrhoeae* (+) et recherche de résistance aux bêta-lactamines et fluoroquinolones (B. Berçot)
- la recherche de résistance aux macrolides et aux fluoroquinolones pour les échantillons *M. genitalium* (+) à Bordeaux (C. Bébéar)

Le typage des échantillons *C. trachomatis* (+), *N. gonorrhoeae* (+) et la recherche de résistance chez *N. gonorrhoeae* et *M. genitalium* seront financés par le CNR. Le diagnostic de *M. genitalium* à M12 pourra être financé par l'étude Remind.

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

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

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

Deux cent HSH seront recrutés et auront des visites avec réalisation de prélèvements à l'inclusion (M0) puis à M12 et à M24.

8.6 Constitution d'un groupe de travail IST auprès de l'ANRS

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

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

Un rapport devra être fourni fin 2019.

8.7 Laboratoire CHU de Bordeaux

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

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

L'objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à la doxycycline à partir de mutants résistants de *M. genitalium* sélectionnés *in vitro* en présence de concentrations subinhibitrices de tétracyclines. La sélection de mutants résistants sera réalisée par passages répétés de différentes souches cliniques en présence de concentrations croissantes de doxycycline. Les CMI des tétracyclines seront déterminées sur les mutants résistants ou de moindre sensibilité. La caractérisation génétique des mécanismes associés à la résistance sera réalisée par PCR puis séquençage de l'ARNr 16S, cible des tétracyclines.

Une recherche par amplification et séquençage de mutations au niveau de l'ARNr 16S, cible des tétracyclines, sera également faite à partir d'échantillons positifs à *M. genitalium* issus de patients ayant présenté un échec thérapeutique et des échantillons positifs à *M. genitalium* issus de patients HSH de la cohorte Ipergay sous prophylaxie post-exposition par doxycycline.

Ce projet fera l'objet du Master 2 recherche de Carla Balcon en 2019.

- **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 B. 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. 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. L'étude a démarré en octobre 2018 et à la fin 2018 les 7 centres étaient ouverts. À ce jour 77 femmes ont été incluses et 78% des femmes ont un prélèvement anal positif. Le projet vient d'être publié dans Médecine en 2019.

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

Nous allons étudier la sensibilité de 25 souches *C. trachomatis* isolées au CHU de Bordeaux en 2018 aux molécules les plus utilisées comme les macrolides, les tétracyclines et les fluoroquinolones. Il est très compliqué de récupérer des échantillons adaptés pour permettre la culture de *C. trachomatis* d'autres centres. Aussi, nous avons décidé de nous focaliser sur celles isolées au CHU de Bordeaux.

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

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.

8.8 Laboratoire APHP Saint-Louis

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

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

Une cohorte prospective de patients symptomatiques est en cours depuis janvier 2019 afin de recueillir une collection de souches de gonocoques. Des données clinico-biologiques seront recueillies.

Le laboratoire associé au CNR des IST bactériennes propose de séquencer par NGS ces souches afin d'analyser leur clonalité ainsi que les facteurs pouvant être impliqués dans leur virulence.

- **Analyse de la clearance spontanée du gonocoque dans la gorge en l'absence de traitement**

Projet en collaboration avec l'équipe d'inféctiologie de l'hôpital St Louis (Dr Pintado, Pr Molina), des centres investigateurs et le CNR des IST bactériennes (expertise gonocoque). Dans l'étude française Ipergay (Pr Molina) menée chez des patients à risque, 26% des IST étaient des gonocoques pharyngés. Malgré les données préoccupantes d'émergence de gonocoques résistants, pour réduire le risque théorique de transmission, les recommandations nationales conseillent de traiter systématiquement ces infections par ceftriaxone, y compris les localisations pharyngées asymptomatiques même si une clairance spontanée est possible. Aucune étude prospective

n'a décrit le délai de clairance des infections pharyngées à gonocoque. La plupart des études sur la clairance spontanée du portage pharyngé sont des études rétrospectives, avec un suivi inférieur à 15 jours et très peu d'études ont évalué la clairance par tests d'amplification et cultures répétées.

Dans un souci d'épargne d'antibiotiques, une étude prospective est proposée dans le cadre d'une demande de PHRC afin d'évaluer le taux de clairance spontanée du gonocoque pharyngé sur 3 mois et identifier les facteurs bactériologiques et immunologiques associés à la clairance et l'évolution du microbiote pharyngé.

- **Recueil des données de laboratoires (CMI) en 2019**

En 2019, le laboratoire responsable de l'expertise gonocoque souhaite proposer aux laboratoires participants aux enquêtes Ngon et tous les laboratoires réalisant des CMI de fournir des données de CMI de la ceftriaxone, céfixime, azithromycine et tétracycline afin d'avoir une représentation plus exhaustive par région et dans le temps de la résistance des souches circulantes sur le territoire. Cette demande pourrait être couplée à l'enquête labIST coordonnée par Santé Publique France afin de relier les formes cliniques aux CMI. L'analyse statistique des CMI pourra être effectuée en collaboration avec Santé Publique France

- **Séquençage haut débit à partir des prélèvements**

Les infections gonococques sont de plus en plus diagnostiquées par PCR et la sensibilité des cultures est faible pour les prélèvements extragénitaux. De plus, les données obtenues dans les premières investigations menées sur les prélèvements (patients des DROM, étude Remind, étude Ipergay) permettent d'obtenir une partie du résistome de la souche et/ou le typage moléculaire par PCR et séquençage Sanger ; l'exploration reste cependant limitée par la quantité d'ADN disponible pour l'exploration. En l'absence de souche, nous souhaitons développer une technique de capture d'ADN avec enrichissement de la quantité d'ADN qui sera couplée à du NGS. Ces travaux feront l'objet d'une partie de la thèse de doctorat de Thibaut Poncin (Ecole doctorale Bio-USCP, équipe d'accueil IAME, laboratoire de l'Hôpital St Louis).

8.9 Laboratoire APHP Cochin

- **Syphilis congénitale**

Mise en place de la surveillance de la syphilis congénitale, étude **SYBALE** (Syphilis Baby Long Term Evaluation) entre le CNR IST LA Syphilis (Pr Dupin) et le pôle de Périnatalité sur l'hôpital Cochin (Pr. Goffinet) en collaboration avec le Service d'Infectiologie de l'hôpital Necker (Pr. Charlier).

- **Surveillance moléculaire de la résistance aux antibiotiques de *T. pallidum***

Recrutement d'un stagiaire de Master 2 recherche pour la mise au point de la détection moléculaire de mutations sur le gène de l'ARN 16S dans le cadre de la surveillance de la résistance de *T. pallidum* à la doxycycline.

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, ingénieur.....ETP 1*

- Elodie Ladevèze, technicienne.....ETP 1*

- Mélanie Lecoœur.....ETP 0,4* (depuis le 1^{er} novembre 2018)

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

- Nadège Hénin, technicienne UBx.....ETP 0,5

- Angélique Alonso, technicienne projet i-PREDICTETP 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, laboratoire associé

Département des Agents Infectieux

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

Site Hôpital St Louis

Pr Béatrice Bercot, 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 : Pr Béatrice Bercot

Tél : 33.1.42.38 56 09 - Fax : 01.42.49.92.00

email : beatrice.bercot@aphp.fr

Pour l'année 2018, une convention de travail a été signée entre les directions du GH SLS-LRB-FW et l'Institut Fournier.

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 Bercot (PU-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 Rénago.....ETP 0,25
- Hervé Jacquier (MCU-PH)
Phylogénétique, traitement des données de bioinformatiques.....ETP 0,15
- Thibaut Poncin (étudiant en thèse).....ETP 0,50
- Myriem Agsous (PHC).....ETP 0,10
- Jean-Michel Molina (PU-PH), référent infectiologue.....ETP 0,05

Ingénieurs, techniciens et personnels administratifs

- Aymeric Braille, ingénieur junior.....ETP 1 *
- Clotilde Monin, technicienne qui est remplacée fin 2018 par Mary Mainardis, ingénieur junior
.....ETP 1 *
- Manel Merimèche, bioinformaticienneETP 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
- 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 cycler (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 électroporateur (Bio-Rad) et 1 concentrateur évaporateur (Jouan)
- 1 appareil d'électrophorèse en champ pulsé CHEF DR-III (Bio-Rad)
- Matériels d'électrophorèse conventionnelle
- 4 congélateurs à -80°C sous alarme, 6 congélateurs -20°C
- 1 autoclave (Gettinge), 1 appareil de purification d'eau (Véolia)
- 1 laveur de plaques (Thermo), 1 balance à haute précision (Sartorius)
- 1 spectrophotomètre à microplaques (Thermo), 1 spectrophotomètre (Thermo)
- 1 microcentrifugeuse (Eppendorf), 1 centrifugeuse à microplaques (Eppendorf), 2 centrifugeuses hautes performances (Beckman Coulter), 3 centrifugeuses à nacelle thermostatées (Jouan)
- 2 étuves (Jouan), 2 étuves à 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 culturelles 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)
- Equipement pour antibiogramme en milieu solide avec lecteur automatisé d'antibiogramme en diffusion de type ADAGGIO (Bio-Rad), en milieu liquide Vitek 2 (Biorad) et Sensititre (Thermofisher)
- 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 (Biomerieux), un Filmarray (Biomerieux)

Extraction :

- Beat beaters
- Extracteurs automatiques d'acide nucléique ARN/ADN : 3 Qiasymphony RGQ (Qiagen), 1 esayMag (Biomerieux), 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 électroporateur Gene Pulser X-cell (Bio-Rad)
- 2 amplificateur pour PCR en temps réel Rotor Gene (Qiagen) et Smart cyclers (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 FASTTREE 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.

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

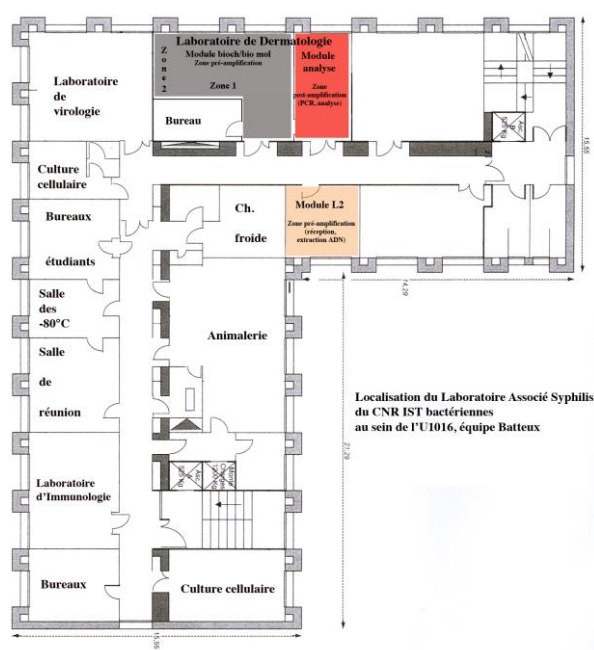
Le module L2 qui fait partie de la zone de pré-amplification, contient 2 hottes à flux laminaire avec niveau de protection L2 (PSM) dont un est dédiée pour le CNR syphilis et identifiée comme telle ; 2 incubateurs CO₂, réfrigérateur-congélateur, un microscope inversé, des centrifugeuses haute et faible 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.

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.

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.

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} janvier et le 31 décembre 2018 :

- 759 échantillons biologiques positifs à *M. genitalium* dont 40 issus de l'enquête de surveillance de la résistance de *M. genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2017), 71 souches d'*Ureaplasma* spp. et 6 souches de *M. hominis*
- 3344 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre du réseau LGV
- 432 échantillons positifs à *C. trachomatis* dans le cadre de l'enquête de prévalence des infections urogénitales dans les départements et régions d'Outre-Mer (DROM 2017).
- 50 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

Depuis la nomination du laboratoire comme laboratoire responsable de l'expertise gonocoque du CNR des IST bactériennes, les matériels biologiques étudiés ont été stockés à l'hôpital St Louis.

Cela comporte :

- 392 souches de gonocoques isolées dans le réseau Renago en 2017 et 317 en 2018
- 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.
- 355 souches séquencées en NGS
- 223 échantillons positifs en PCR gonocoque (protocole Remind, ANRS)
- 15 boîtes de congélation en cryotubes correspondants aux souches de sensibilité diminuée isolées dans le cadre du réseau Renago
- 116 boîtes de congélation en cryotubes correspondant à la collection Renago
- 8 souches de gonocoques et 70 prélèvements cliniques recueillis dans l'étude ancillaire ANRS menée par le Pr Molina (étude IPERGAY).

Les souches et échantillons précieux sont conservés en double exemplaire dans des congélateurs différents. Les souches séquencées et les souches de référence sont conservées en double exemplaire dans des congélateurs différents au laboratoire de Bactériologie.

Transfert de la collection Renago : en décembre 2018, les souches isolées dans le cadre du réseau Renago ont été transférées de l'IAF vers le GH Saint-Louis.

Pour les collections plus précieuses incluant les souches de référence, souches séquencées et collection Renago bien caractérisée, le transfert en CRB est en cours pour 2019.

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 2006-2018, le CNR IST LA syphilis a reçu 891 échantillons positifs pour l'ADN de souches de *T. pallidum*

Collection souches CNR IST LA Syphilis (2006-2018)

LCR	Placenta	Liq. Am	Cordon/Sg Cord	Ecouv.	Biopsie	Sg total
78	13	7	9	714	48	22

Nous disposons également de 440 immun-sérums répertoriés

1.5 Démarche qualité du laboratoire

1.5.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Le laboratoire suit actuellement la démarche de la cellule qualité du Pôle de Biologie et Pathologie du CHU de Bordeaux pour l'obtention de l'accréditation totale en 2020 selon la norme EN ISO 15189. Le laboratoire est, tout au long du processus en cours accrédité à travers le Pôle de Biologie et Pathologie, pôle déclaré au COFRAC comme un laboratoire unique.

Les analyses requérant l'accréditation dans le cadre du nouvel CNR IST bactériennes sont le diagnostic moléculaire de la LGV à *C. trachomatis* et le diagnostic moléculaire de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium*. Le laboratoire a entamé les démarches 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. Toutes les fiches techniques ont été rédigées et sont enregistrées dans le logiciel Sharepoint permettant de gérer les documents qualité au CHU de Bordeaux. Les non-conformités mises en évidence à la réception des échantillons sont tracées et chaque appel reçu au CNR fait l'objet d'une traçabilité. Le personnel technique du CNR a été habilité pour travailler sur le plateau de Biologie moléculaire du CHU de Bordeaux.

Une technicienne qualité a été recrutée à mi-temps en novembre 2018 pour le CNR IST et partagée avec le CNR Campylobacter-Helicobacter hébergé dans le même laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Un 1^{er} audit interne des CNR par le CHU de Bordeaux est programmé en octobre 2019.

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 un an, un contrôle de qualité *M. genitalium* est disponible au QCMD et nous l'avons réalisé en 2018. Nous l'intégrerons tous les ans dans notre démarche qualité. Nous projetons également de participer à l'EEQ mycoplasmes urogénitaux (*M. hominis* et *Ureaplasma* spp.) que propose l'Association de Biologie Praticienne.

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 Cobas 6800 depuis 2018. Le diagnostic MG/TV est présenté en extension de portée pour juin 2019. Toutes les fiches techniques et préanalytiques ont été rédigées et sont enregistrées dans le logiciel Kalilab et Viskalis.

Les analyses requérant l'accréditation dans le cadre du nouvel CNR IST bactériennes sont le diagnostic moléculaire de la résistance C3G et Fluoroquinolones. La qualitiennne responsable de notre site a été recrutée à raison de 3 vacations/semaines et ces techniques d'implantation récente (fin 2018) doivent être inclus en 2019 dans le processus d'accréditation.

En ce qui concerne les contrôles de qualité concernant l'activité du CNR IST bactériennes, le laboratoire participera comme tous les ans dans le cadre de la démarche qualité du laboratoire de Bactériologie du GH St Louis-LRB-FW, au contrôle de qualité externe européen (*Quality Control in Molecular Diagnostics* ou QCMD) concernant la détection moléculaire de *N. gonorrhoeae*/ *C. trachomatis* et le panel syndromique IST.

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 milieux ensemencés 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.

*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- Quality controle for molecular Diagnosis QCMD CT/NG (2/an) et STI panel syndromique (2/an)

Dix échantillons biologiques sont testés pour la recherche de *N. gonorrhoeae*. Les résultats des contrôles sont basés sur la détection et l'identification de *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* dans un échantillon.

La restitution des résultats est effectuée en ligne avec comparaison aux autres laboratoires.

Visualisation des performances analytiques des automates utilisés.

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

Huit souches OMS de *N. gonorrhoeae* sont testées pour la détermination des CMI sur un panel de 8 antibiotiques (ciprofloxacine, ceftriaxone, céfixime, azithromycine, gentamicine, spectinomycine) et la recherche de bêta-lactamase.

EU STI Microbiology Network: Sentinel Surveillance of Gonococcal Antimicrobial Susceptibility : (2/an)

Dans le cadre du projet européen de surveillance des IST (The European Surveillance System, TESSy) mis en place par l'ECDC depuis 2009, le CNR participe à la surveillance de la résistance aux antibiotiques de *N. gonorrhoeae* (AMR surveillance programme).

De façon biannuelle, les CMI des 8 antibiotiques de référence (ci-dessus) d'une série de 55 à 110 souches testées consécutivement par le CNR ainsi que les données épidémiologiques de chaque cas sont transmises à l'ECDC via TESSy. Pour assurer la qualité des résultats rendus, les CMI pour 5 souches de référence OMS sont testées en début et en fin de série et envoyées en parallèle. Tous les résultats sont analysés à leur retour par les biologistes. Ils sont restitués à l'équipe du CNR avec mise en place d'actions correctives et préventives en cas d'inadéquation (ex : lecture CMI).

1.5.3 Laboratoire APHP Cochin

Une démarche pour l'accréditation du CNR syphilis a débuté en 2012 avec une visite du COFRAC en juin 2014 (famille Sérologie Infectieuse) et se poursuit depuis afin d'améliorer le fonctionnement interne, de fidéliser les demandes d'expertise et de collaboration des correspondants nationaux, et de favoriser la reconnaissance de la qualité de son expertise par les autres partenaires d'organismes de santé publique, de recherche ou de l'industrie.

Le programme de mise en place de la démarche d'accréditation comprend à la fois la validation des techniques d'analyse déjà éprouvées (sérologie) et celles en cours de développement (détection moléculaire), la formalisation des processus d'analyse et de rendu des résultats, l'identification d'indices d'appréciation de la qualité, et l'habilitation des personnes participant aux missions du CNR.

En ce qui concerne la sérologie, la participation à des contrôles de qualité externe est organisée depuis 2013, de même que des audits de pratique par des collègues externes au CNR.

Plusieurs services supports du CNR syphilis, tels que le système de gestion informatique des laboratoires et la maintenance des équipements sont partagés avec les Services du Pôle de Biologie du Groupe Hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu.

La démarche d'accréditation est effective pour le Pôle depuis Juin 2014 pour l'obtention de l'accréditation totale en 2020. Elle devra suivre la norme EN ISO 15189 qui décrit les exigences particulières concernant la qualité et la compétence requise pour la réalisation d'analyses biologiques médicales.

Liste des techniques :

- Dépistage par CLIA (automate Architect)	20%
- RPR pour sérum (Bio-Rad)	20%
- VDRL pour LCR (All Diag)	20%
- Immunoblot (IgG/IgM Ingen)	20%

Total 80% des techniques utilisées par le CNR syphilis sont accréditées depuis juin 2016.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Laboratoire CHU de Bordeaux

Chlamydia trachomatis

- Liste des techniques disponibles pour le diagnostic, l'identification, et l'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

- Recherche directe par culture cellulaire (sur cellules McCoy, tubes unitaires à lamelle, révélation à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-MOMP fluorescents, lecture au microscope à fluorescence)

- Recherche directe par amplification d'acides nucléiques

- Kit commercialisé 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 7 concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode E-test. Les concentrations critiques de *N. gonorrhoeae* sont précisées dans le communiqué annuel du CA-SFM version janvier 2019 : <http://www.sfm.asso.fr/>.

- Techniques disponibles pour le typage

- Typage moléculaire par méthode NG-MAST (amplification séquençage des gènes *porB* et *tbpB*) qui est la technique de typage de référence effectuée suivant les recommandations internationales (Belkacem A, et al, Antimicrob Chemother 71:2471-2478; Unemo et al, Clin Microbiol Rev 24:447-458)
- Typage moléculaire par MLST qui est basée sur l'amplification nucléotidique et le séquençage de fragments de 7 gènes de ménages (*abcZ*, *adh*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdh* et *pgm*) qui permet de comparer des souches plus éloignées dans le temps (Belkacem A, et al, Antimicrob Chemother 71:2471-2478; Unemo et al, Clin Microbiol Rev 24:447-458))
- PCR nichée « maison » / séquence pour le génotypage de *N. gonorrhoeae* sur prélèvements cliniques TAAN positifs ciblant les gènes *porB* et *tbpB*.
- Extraction in silico du core genome sur colonies

- Techniques disponibles pour l'étude de la résistance aux antibiotiques

- Extraction de l'ADN bactérien de *N. gonorrhoeae* : kit InstaGene Matrix (Bio-Rad)
- Extraction du contenu plasmidique de *N. gonorrhoeae* (gros et petits plasmides)
 - Technique de (Kieser, Plasmid 12:19-36.)
 - Kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep
- Séquençage des plasmides par PCR par chevauchement
- Séquençage du gène *penA* par PCR par chevauchement
- Détection des gènes *bla*_{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 type de *porB* et *tbpB*
- Pyrosequencing sur prélèvement pour la détection des mutations dans les gènes *gyrA* et *parC*
- 3 PCR spécifiques du génome de *N. gonorrhoeae* pour la détection des principaux déterminants de résistance aux cyclines sur prélèvements cliniques 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. Elles ont été transférées au GH SLS en décembre 2018.

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).

Réseau de surveillance des infections ano-rectales à *Chlamydia trachomatis* (CT) Bilan 2010- 2017



CNR des IST bactériennes. CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin
Laboratoire de bactériologie, Place Amélie Raba Léon 33076 BORDEAUX CEDEX
Tél : 05 57 57 16 33 / 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40
Site Web: <http://www.cnrchlamydiae.u-bordeaux.fr/>

1. Répartition et évolution des infections ano-rectales à CT

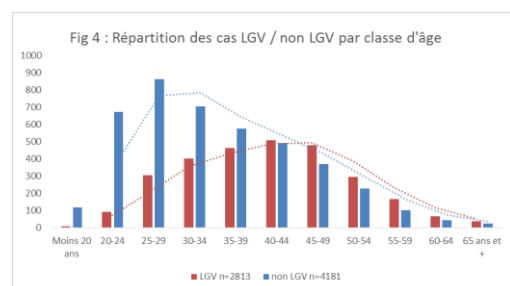
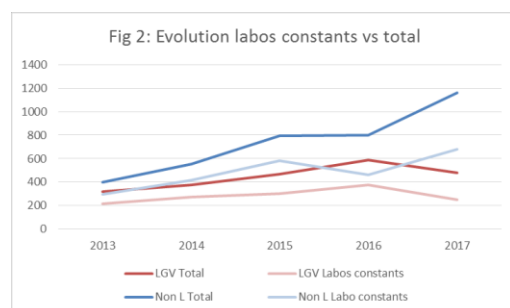
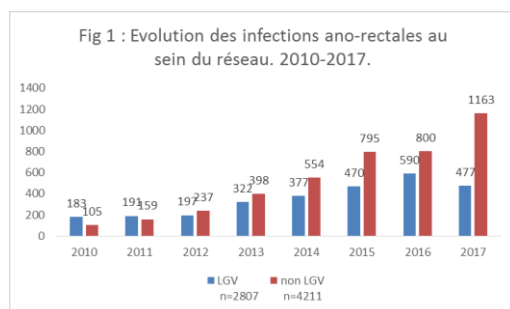
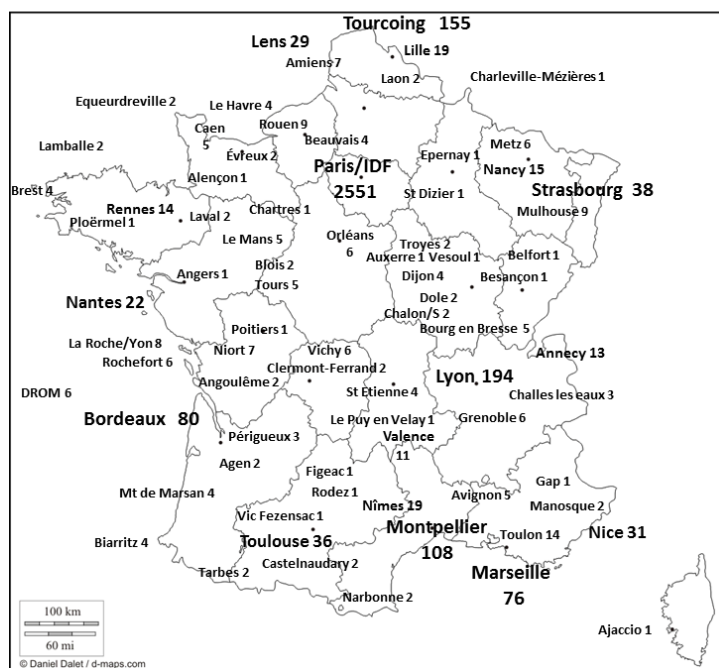


Fig 3 : Répartition géographique LGV (3610) 2002-2017



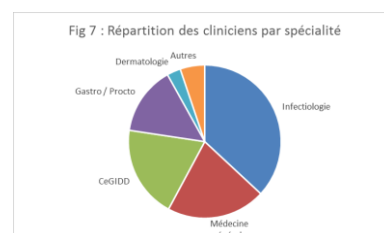
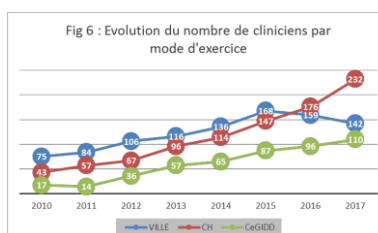
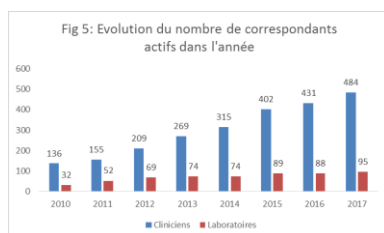
Depuis 2010, 7018 échantillons (93,2 %) sur les 7531 reçus ont pu être génotypés, soit 2807 (40,0 %) souches L et 4211 (60,0 %) souches non L. La limitation de nos indications de typage aux patients VIH+ et/ou symptomatiques, s'était traduite par une stabilisation des cas non LGV entre 2015 et 2016. La hausse des cas non LGV observée en 2017 (+45,3 %) est due à l'inclusion des patients sous Prophylaxie Pré-Exposition (PrEP). De plus, nous constatons une décroissance de 23,6 % du nombre de cas LGV en 2017 par rapport à 2016 (Fig.1). Cette diminution, également observée au Royaume-Uni et aux Pays-Bas, demande à être confirmée.

L'analyse des tendances en prenant uniquement en compte les laboratoires qui participent régulièrement, valide les observations sur l'ensemble du réseau (Fig. 2).

Toutes les régions de France métropolitaine et DROM (Antilles, La Réunion) sont représentées (Fig. 3).

L'âge moyen des patients LGV et non LGV est respectivement de 40,98 ans [19-73] et 34,31 ans [16-76] ($p < 0,05$) (Fig. 4).

2. Participation 2010 - 2017



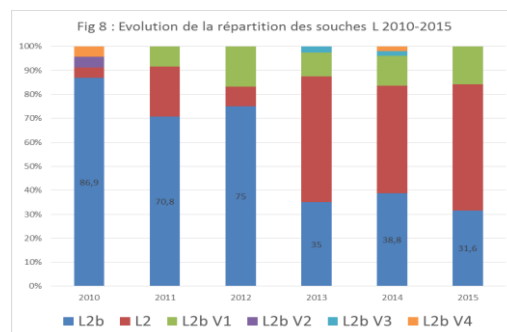
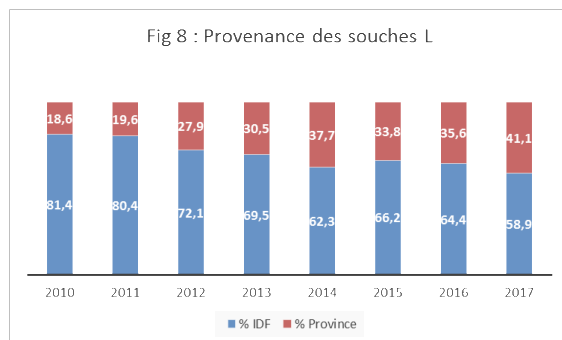
Le réseau présente une très bonne dynamique. En effet, 268 laboratoires ont participé au réseau depuis 2010 et, en 2017, nous en accueillons 42 nouveaux (Fig. 5). Dix laboratoires participent régulièrement et envoient 66,4% des échantillons. Cependant le regroupement des laboratoires perturbe l'exploitation de ces données.

En 2017, 193 nouveaux médecins ont été sollicités et le réseau compte désormais 1181 correspondants. Un total de 484 cliniciens a participé au réseau de surveillance en 2017 dont 48,3 % sont situés en Ile-de-France. L'augmentation du nombre de cliniciens est notable notamment dans les Centres Hospitaliers, +30 % en 2017 par rapport à 2016 (232 vs 176). 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 (Fig. 6).

Les spécialités médicales représentées sont: les Maladies infectieuses (37 %), la Médecine générale (21 %), les CeGIDD (19 %), la Gastro-entérologie / Proctologie (14 %), la Dermatologie / Vénérologie (3 %), autres (6 %) (Fig. 7).

Le taux de retour des fiches de recueil des données cliniques et comportementales continue de croître et atteint plus de 70 % en 2017.

3. Epidémiologie géographique et moléculaire des souches L



Ces cinq dernières années, nous constatons que:

- 1) L'origine géographique des patients LGV a été modifiée (Fig. 8). En 7 ans, le pourcentage de cas de LGV issus de la province est passé de 18,6 % en 2010 à 41,1 % en 2017 ($p < 0,05$).
- 2) Des souches L2 sont apparues majoritaires par rapport aux souches L2b à partir de 2013 (Fig. 9) (O. Peuchant et al, Emerg Infect Dis. 2016 Nov;22(11):1945-1947).

4. Focus sur les patients sous PrEP

La PrEP est une stratégie de réduction du risque de contracter le VIH basée sur l'utilisation d'un médicament antirétroviral à prendre au cours d'une période d'exposition à un risque de contamination. Cette stratégie s'accompagne d'un suivi renforcé et individualisé en santé sexuelle.

Nous avons analysé 491 échantillons de patients sous PrEP en 2017 qui se répartissent en 91 cas de LGV (18,5 %) et 400 cas non LGV (81,5 %) (Tab. 1).

Les patients sous PrEP inclus dans le réseau avaient une moyenne d'âge comparable qu'ils aient une LGV ou non.

Les patients LGV présentaient plus souvent des signes cliniques que les patients non LGV (68,8 % vs 21,5 %) et avaient plus de 5 partenaires occasionnels dans le mois précédent.

Caractéristiques des PrEPeurs 2017	LGV	Non LGV	p
Patients	91 (18,5%)	400 (81,5%)	
Age	38 [22-55]	35 [17-69]	NS
Présence de symptômes cliniques			
oui	68,8% (55)	21,5% (68)	$p < 0,001$
non	31,2% (25)	78,5% (249)	
Partenaire sexuel			
stable	0	5,2% (9)	
occasionnel	100% (43)	94,3% (164)	
prostitué	0	0,5% (1)	
Nombre de partenaires (mois précédent)			
< 5	16% (8)	30,4% (56)	$p < 0,05$
≥ 5	84% (42)	69,6% (128)	
Co-infections IST			
N. gonorrhoeae	20,6% (14)	22,6% (63)	NS
Syphilis active ou latente	45,8% (33)	30,1% (86)	$p = 0,01$

Tableau 2 : Comparaison des PrEPeurs 2017 avec la population HIV séronégative 2015-juin 2016						
	LGV			NON LGV		
	PrEP	Pop HIV-	p	PrEP	Pop HIV-	p
Patients	18,5% (91)	14,8% (144)	$p = 0,08$	81,5% (400)	85,2% (826)	NS
Age						
Moyenne	37,8	39,2	NS	35,9	32,2	$p < 0,001$
Min-max	[22-55]	[20-67]		[17-69]	[17-72]	
Présence de symptômes cliniques						
oui	68,8% (55)	87,2% (95)	$p < 0,05$	21,5% (68)	27,3% (181)	NS
non	31,2% (25)	12,8% (14)		78,5% (249)	72,7% (481)	
Orientation sexuelle						
HSH	88,7% (63)	92,5% (99)	NS	94,3% (264)	93,8% (602)	NS
Bisexuel	11,3% (8)	7,5% (8)		5,7% (16)	6,2% (40)	
Nombre de partenaires (mois précédent)						
< 5	16% (8)	56,7% (42)	$p < 0,001$	30,4% (56)	64,9% (288)	$p < 0,001$
≥ 5	84% (42)	43,3% (32)		69,6% (128)	35,1% (156)	
Co-infections IST						
N. gonorrhoeae	20,6% (14)	25,7% (30)	NS	22,6% (63)	24,7% (159)	NS
Syphilis active ou latente	45,8% (33)	50,9% (54)	NS	30,1% (86)	26,5% (177)	NS

La comparaison de la population PrEPeur avec celle des patients HIV- suivi dans le réseau de 2015 à juin 2016 et ne prenant pas la PrEP (Tab. 2), montre que :

- la proportion de patients LGV chez les PrEPeurs est plus élevée sans que la différence soit statistiquement significative ($p = 0,08$)
- les patients LGV PrEPeurs sont plus souvent asymptomatiques, probablement parce que plus suivis et diagnostiqués plus tôt.
- les patients PrEPeurs rapportent plus de partenaires sexuels occasionnels dans le mois précédant l'infection.

Ces observations montrent que la PrEP cible des patients à haut risque.

Remerciements

Nous remercions pour leur participation active au réseau de surveillance des infections ano-rectales à *Chlamydia trachomatis*

❖ Tous les biologistes des laboratoires hospitaliers et privés, ainsi que leurs équipes

❖ Tous les médecins spécialistes, les médecins généralistes et les médecins exerçant dans un Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST (CeGIDD)

L'équipe du CNR

Cécile LAURIER NADALIE, Arabella TOUATI, Nadège HENIN, Angélique ALONSO - MARRAU, Olivia PEUCHANT, Cécile BEBEAR, Bertille de BARBEYRAC

Santé Publique France

Ndeindo NDEIKOUNDAM, Florence LOT

Résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones et épidémiologie des infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis*

- 13-19 novembre 2017 -

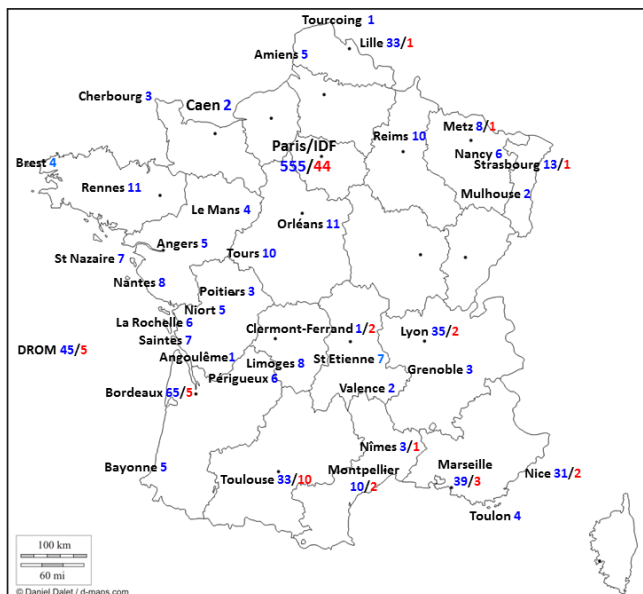


CNR
des IST bactériennes



CNR des IST bactériennes. CHU de Bordeaux, Hôpital Pellegrin
Laboratoire de Bactériologie, Place Amélie Raba Léon 33076 BORDEAUX CEDEX
Tél : 05 57 57 16 33 / 05 57 57 16 25 Fax : 05 56 93 29 40
Site Web: <http://www.cnrchlamydiae.u-bordeaux.fr/>

Répartition géographique des échantillons reçus Ct (1014) / Mg (79)



Objectifs:

- Typage des souches de *Chlamydia trachomatis* (Ct) responsables d'infection uro-génitale pour étudier les génotypes (sérovarys) des souches circulantes en Métropole et DROM.
- Détermination de la résistance de *Mycoplasma genitalium* (Mg) aux macrolides et aux fluoroquinolones pour évaluer la prévalence nationale de cette résistance.

Matériels et méthodes:

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 pharyngés) ont été adressés au CNR au moyen d'enveloppes T (sauf les DROM). Les données concernant les échantillons ont été colligées de façon anonyme sur un fichier excel.

Mycoplasma genitalium:

La résistance aux macrolides a été recherchée par PCR en temps réel de type FRET (1) ou par PCR multiplex commercialisée (2) en cas d'absence d'amplification avec la PCR FRET. Les échantillons présentant une bactérie mutée ont été soumis à une amplification et un séquençage de l'ARNr 23S pour déterminer la nature de la mutation. Les mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones ont été recherchées par amplification et séquençage de la QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) du gène *parC* (3).

Chlamydia trachomatis:

Le typage moléculaire de *C. trachomatis* a été fait par une PCR nichée amplifiant le gène *omp1* directement à partir de l'échantillon biologique (4) suivie par un séquençage des produits d'amplification (Eurofins Genomics). La détermination du génotype a été faite par alignement des séquences analysées (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Résistance de *Mycoplasma genitalium* aux macrolides et aux fluoroquinolones

Population étudiée

79 échantillons provenant de **73 patients** ont été reçus de **22 centres** (41 hommes, 31 femmes et 1 inconnu).

L'âge moyen des patients était de 32 ans, la classe d'âge la plus représentée est la classe 20-24 ans chez les femmes (34,5%) et 30-34 ans chez les hommes (32,3%).

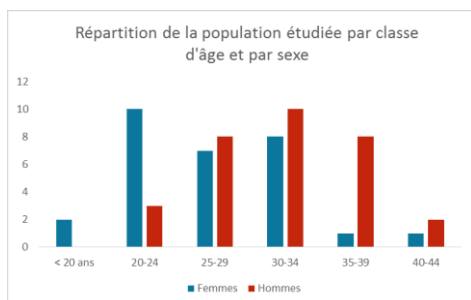
Les principaux services prescripteurs étaient :

- Les CeGIDD (28,7%)
- Les services de maladies infectieuses (20,5%)
- Les cabinets de médecine générale (8,2%).

Les dépistages systématiques représentaient le principal motif de consultation (50,9%).

68,8% des patients ayant accepté de renseigner leur orientation sexuelle ont déclaré avoir des pratiques hétérosexuelles.

Le statut VIH n'était connu que dans 68,5% des cas, et 26 % d'entre eux étaient séropositifs.



Prévalence de la résistance aux macrolides

Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **42,6% (26/61) étaient résistants aux macrolides**. Il n'y avait pas de différence significative de la résistance aux macrolides chez les patients d'Ile de France (14/39=35,9%) et chez les patients de métropole hors Ile de France (11/29=37,9%), $p=0,8$ (test du Chi2). La mutation A2059G (numérotation *Escherichia coli*) était la plus fréquente.

Prévalence de la résistance aux fluoroquinolones

Parmi les patients pour lesquels une amplification a été obtenue, **7,5% (5/67) étaient résistants aux fluoroquinolones**. Cinq mutations différentes étaient retrouvées dans les QRDR du gène *parC*.

Conclusion

La prévalence de la résistance aux macrolides chez *M. genitalium* a atteint **42,6%, valeur 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, de **7,5%**, paraît plus stable puisque nous décrivons une prévalence à Bordeaux de 6% en 2013-2014 (3). Elle est cependant préoccupante, la moxifloxacin étant pratiquement la seule alternative en cas d'échec des macrolides.

7.1 % de double résistance

Epidémiologie des infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis*

Population étudiée

1014 échantillons provenant de 1012 patients (661 femmes, 346 hommes, 1 transexuel et 4 inconnus) ont été reçus de 65 centres. La moyenne d'âge des femmes était de 26,01 ans [13-63] et celle des hommes de 28,6 ans [16-60] ($p < 0,05$). Le principal site de prélèvement pour les femmes était de nature cervico-vaginal (75,5%), les prélèvements urinaires représentent 83,8% de ceux des hommes. Les dépistages systématiques étaient le principal motif de consultation (47,2%). 85,4% des patients ayant accepté de renseigner leur orientation sexuelle ont déclaré avoir des pratiques hétérosexuelles. Le statut VIH était connu dans 35,6% des cas, et 1,7% d'entre eux étaient séropositifs.



Conclusion

La population infectée étudiée présentait les caractéristiques de la population suivie par le réseau Natchla (5) les données de l'orientation sexuelle et de motifs de consultation. La majorité des femmes infectées avait entre 20 et 24 ans ce qui confirme le bon positionnement de la recommandation HAS concernant cette tranche d'âge. Les recommandations aux moins de 20 ans et aux 25-30 ans pourrait être envisagé. Les génotypes se répartissaient de la même manière chez l'homme et la femme avec une prédominance du génotype E (50%), suivi des génotypes F et des G. Cette répartition est conforme à celle décrite dans la littérature concernant la population hétérosexuelle.

Références

1. Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar C, Pereyre S. 2014. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol 52:1549-1555.
2. Le Roy C, Henin N, Bébéar C, Pereyre S. 2017. Evaluation of a commercial multiplex quantitative PCR (qPCR) assay for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and macrolide resistance-associated mutations in clinical specimens. J Clin Microbiol 55:978-979.
3. Le Roy C, Henin N, Pereyre S, Bébéar C. 2016. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in France. Emerg Infect Dis 22:1677-1679.
4. Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JM, Meijer CJ, Van den Brule AJ. 1994. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. J Clin Microbiol 32:528-530.
5. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infections-sexuellement-transmissibles-IST/Bulletins-des-reseaux-de-surveillance-des-IST>

Remerciements

Nous remercions pour leur participation tous les biologistes des laboratoires hospitaliers et privés, ainsi que leurs équipes.

L'équipe du CNR IST bactériennes - Bordeaux

Cécile Bébéar, Bertille de Barbeyrac, Sabine Pereyre, Olivia Peuchant, Cécile Laurier-Nadalié, Arabella Touati, Marie Gardette, Nadège Hénin, Elodie Ladevèze, Angélique Alonso-Marrau.

Enquête nationale 2017 de surveillance des infections à *Neisseria gonorrhoeae* du 4 au 8 décembre 2017 - Newsletter de septembre 2018

Laboratoire expertise gonocoque associé au Centre National de Référence des IST bactériennes, Hôpital St Louis, Paris, France.

Introduction

Afin de caractériser les clones de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) responsables d'infections urogénitales circulants en France, il a été proposé à 123 laboratoires de métropole et des départements et régions d'outre-mer (DROM) de collecter du 4 au 8 décembre 2017 les échantillons cliniques positifs à NG par PCR et/ou les souches obtenues en culture et de les envoyer au CNR accompagnés de données clinico-biologiques.

Matériels et méthodes

Les souches de NG ont été transportées en milieu liquide (Eswab, Copan) à 4° C et remises en culture à réception pour déterminer leur CMI à 6 antibiotiques (azithromycine, pénicilline G, ceftriaxone, céfixime, ciprofloxacine, tétracycline). Les déterminants moléculaires de la résistance ainsi que le génotypage ont été recherchés par séquençage à haut débit (NGS), technologie illumina (MiSeq, Illumina, San Diego, CA). L'analyse des données a été effectuée par l'étude *in silico* du génome (NG-MAST, MLST, NG-STAR).

Résultats

Répartition des laboratoires et caractéristiques des échantillons collectés

Soixante-douze laboratoires (40 CHU, 16 CHG, 13 privés, 3 CeGIDD) ont accepté de participer à l'étude (figure 1). Au final, 58 laboratoires (dont 4 en DROM) ont testé 14859 échantillons cliniques (figure 1). NG a été recherché dans 11716 (78,8%) échantillons par PCR, avec 4 systèmes analytiques majoritaires (Hologic, Cepheid, Roche et Abbott), et dans 3143 (21,2%) échantillons après mise en culture.

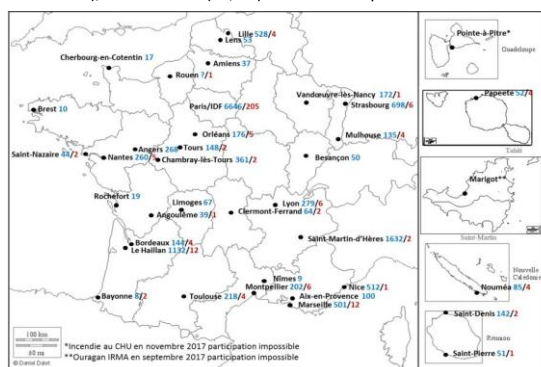


Figure 1. Répartition géographique des laboratoires participant à l'étude du 4 au 8 décembre 2017, avec pour chacun d'entre eux, le nombre total d'échantillons cliniques testés en PCR ou mis en culture (en bleu) et la somme des échantillons cliniques positifs en PCR et des cultures de NG envoyés à l'hôpital Saint-Louis (en rouge).

Les échantillons provenaient d'urines (29,9%), d'anus (25%), de gorge (20,5%), de vagin (13,1%), d'urètre (8,2%). Parmi les 11716 échantillons testés en PCR, 268 étaient positifs (2,3%) et 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 et médian des patients était de 31 et 29 ans, les 24-33 ans représentant 43,2% des patients. Au total, 10,1% (27/268) des patients étaient séropositifs pour le VIH, 10,8% (29/268) déclaraient avoir des pratiques hétérosexuelles, 22,8% (61/268) étaient des HSH, 0,4% (1/268) était bisexuel et 66% (177/268) avaient des pratiques inconnues. Le CNR a également reçu 32 souches de NG provenant des 3143 échantillons cliniques mis en culture (taux de positivité : 1,0%), dont 25 ont été obtenues en subculture pour antibiogramme et séquençage à haut débit (NGS). Ces souches provenaient de prélèvements génitaux dans 88% des cas et de 2 femmes et 23 hommes.

Les services prescripteurs sont décrits dans la figure 2.

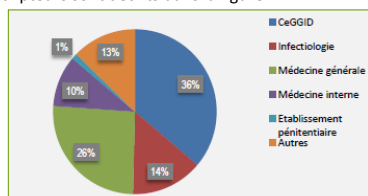


Figure 2. Répartition des services prescripteurs de l'étude.

Sensibilité des souches aux antibiotiques et génotypage

La figure 3 illustre la répartition des CMIs au céfixime, ceftriaxone et azithromycine. Les 25 souches étaient intermédiaires ou résistantes dans 80%, 75%, 41,7%, 16% à la tétracycline, pénicilline G, ciprofloxacine, azithromycine, respectivement, et sensibles à la ceftriaxone [CMI<0,002 à 0,016mg/L], au céfixime [CMI<0,0016 à 0,016mg/L] et à la spectinomycine. L'analyse de la résistance à la ciprofloxacine sur échantillons est en cours avec la trousse *ResistancePlus*® GC (SpeedX).

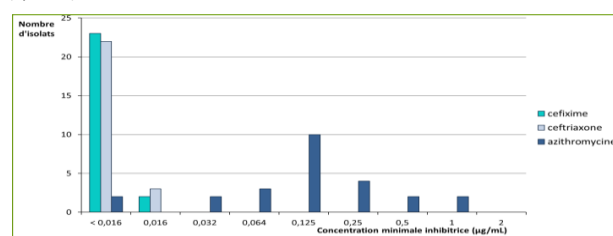


Figure 3. Répartition des CMI au céfixime, ceftriaxone et azithromycine pour les 25 souches de NG.

Les figures 4 et 5 montrent la répartition des génotypes des souches par NG-MAST et alignement des core génomes. Le génotype ST5441 (NG-MAST) était prédominant (12%) ; 24% avaient un ST inconnu.

