

Rapport annuel  
d'activité  
Avril 2014

Année d'exercice  
**2013**

# CNR des Gonocoques



## LABORATOIRE COORDONNATEUR

Laboratoire de Bactériologie  
Institut Alfred Fournier  
25 bd Saint Jacques  
75014 Paris  
Tél.: +33 (0) 1 40 78 26 00 (standard)  
Fax : +33 (0) 1 40 88 33 28  
Site Internet : <http://www.institutfournier.org>

Responsables scientifiques :

Dr Agathe GOUBARD  
Tél.: +33 (0) 1 40 78 26 25/ +33 (0) 6 62 58 65 76  
Email : [agathe.goubard@institutfournier.org](mailto:agathe.goubard@institutfournier.org)

Dr Patrice SEDNAOUI  
Tél.: +33 (0) 1 40 78 26 70  
Email : [patrice.sednaoui@institutfournier.org](mailto:patrice.sednaoui@institutfournier.org)

## LABORATOIRE ASSOCIE



Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène  
Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal (AP-HP)  
2, rue Ambroise Paré  
75018 Paris cedex 18  
Tél. : +33 (0) 1 49 95 65 51 (secrétariat)  
Fax : +33 (0) 1 49 95 85 37

Responsables scientifiques:

Pr Emmanuelle CAMBAU  
Tél. : +33 (0) 1 49 95 65 54/ +33 (0) 6 80 42 25 08  
Email : [emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr](mailto:emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr)

Dr Béatrice BERÇOT  
Tél. : +33 (0) 1 49 95 67 99/ +33 (0) 6 65 33 48 63  
Email : [beatrice.bercot@lrb.ap-hop-paris.fr](mailto:beatrice.bercot@lrb.ap-hop-paris.fr)

## TABLE DES MATIERES

<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b>	<b>5</b>
<b><u>RESUME ANALYTIQUE</u></b>	<b>6</b>
<b><u>I. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</u></b>	<b>8</b>
<b><u>II. ACTIVITES D'EXPERTISE</u></b>	<b>8</b>
II.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2013	8
II.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR EN 2013	11
<b><u>III. ACTIVITES DE SURVEILLANCE</u></b>	<b>12</b>
III.1. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	12
III.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	22
III.3. PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE	35
III.4. ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	36
<b><u>IV. ALERTE</u></b>	<b>36</b>
IV.1. PROCEDURE D'ALERTE DE L'INVS ET DE LA DGS	36
IV.2. SIGNALEMENTS ET /OU ALERTES DE L'ANNEE 2013	36
IV.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPEES ET DES PHENOMENES ANORMAUX	36
IV.4. ANALYSE DES TENDANCES ET DU FONCTIONNEMENT DU SYSTEME	37
<b><u>V. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, DE CONSEIL</u></b>	<b>37</b>
V.1. ENSEIGNEMENTS, FORMATIONS, ACCUEIL DE STAGIAIRES	37
V.2. GUIDES ELABORES	39
V.3. MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES	39
V.4. ACTIVITE DE CONSEIL AUX PROFESSIONNELS	40
V.5. LISTE DES ACTIVITES D'EXPERTISE	40
<b><u>VI. TRAVAUX DE RECHERCHE DU CNR</u></b>	<b>40</b>
VI.1. ACTIVITES DE RECHERCHE	40
VI.2. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	50
(i) PUBLICATIONS NATIONALES	50
(ii) PUBLICATIONS INTERNATIONALES	50
(iii) COMMUNICATIONS NATIONALES	51
(iv) COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	52
(v) CONFERENCES SUR INVITATIONS	52
(vi) PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DIDACTIQUES	53
<b><u>VII. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENTAUX</u></b>	<b>53</b>
<b><u>VIII. PROGRAMME D'ACTIVITES 2014-2015</u></b>	<b>54</b>
➤ CONTRIBUER A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	54
➤ EVALUER LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION	55
➤ DETECTER DE NOUVEAUX PHENOTYPES DE RESISTANCE EN CONTRIBUANT A L'IDENTIFICATION DES MECANISMES DE RESISTANCE ET DEVELOPPER LES TECHNIQUES DE TYPAGE DES SOUCHES DE N. GONORRHOEA	55

<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>57</b>
<b><u>ANNEXE 1: MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR</u></b>	<b>58</b>
<b>1.1. RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR ET DES LABORATOIRES ASSOCIES :</b>	<b>58</b>
<b>1.2. DESCRIPTIF DE L'EQUIPE DU CNR</b>	<b>59</b>
<b>1.3. DESCRIPTIF DES LOCAUX ET DE L'EQUIPEMENT DU CNR</b>	<b>60</b>
<b>1.4. DESCRIPTIF DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE</b>	<b>62</b>
<b><u>ANNEXE 2: CAPACITES TECHNIQUES DU CNR</u></b>	<b>64</b>
<b>2.1. LISTE DES TECHNIQUES DISPONIBLES</b>	<b>64</b>
<b>2.2. LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES</b>	<b>65</b>
<b>2.3. COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUNS-SERUMS DE REFERENCE</b>	<b>65</b>
<b>2.4. LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR</b>	<b>66</b>
<b><u>ANNEXE 3: RESUMES DES PUBLICATIONS-COMMUNICATIONS</u></b>	<b>68</b>
<b>(I) PUBLICATIONS NATIONALES</b>	<b>68</b>
<b>(II) PUBLICATIONS INTERNATIONALES</b>	<b>70</b>
<b>(III) COMMUNICATIONS NATIONALES</b>	<b>71</b>
<b>(IV) COMMUNICATIONS INTERNATIONALES</b>	<b>74</b>
<b><u>ANNEXE 4: DETAILS DU CONTROLE DE QUALITE NATIONAL</u></b>	<b>79</b>

## Liste des abréviations

---

<b>AMR</b>	AntiMicrobial Resistance
<b>ANSM</b>	Agence Nationale de Sécurité du Medicament et des produits de santé
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>C3G</b>	Céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>CDAG</b>	Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit
<b>CIDDIST</b>	Centre de Dépistage Des Infections Sexuellement Transmises
<b>CPEF</b>	Centre de Planification et d'Education Familiale
<b>DGS</b>	Direction Générale de la Santé
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease prevention and Control
<b>ECOFF</b>	Epidemiological Cutoff value
<b>EUCAST</b>	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>Euro-GASP</b>	European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme
<b>IST</b>	Infection Sexuellement Transmissible
<b>HAS</b>	Haute Autorité de Santé
<b>LGV</b>	LymphoGranulomatose Vénérienne
<b>MLST</b>	Multi Locus Sequence Typing
<b>NG-MAST</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Multi Antigen Sequence Typing
<b>RENAGO</b>	Réseau national de surveillance des gonocoques
<b>RICAI</b>	Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse
<b>TESSY</b>	The European Surveillance System
<b>TAAN</b>	Test d'Amplification d'Acides Nucléiques

## RESUME ANALYTIQUE

---

Depuis fin des années 1990, on observe une recrudescence globale des IST dans le monde et plus particulièrement de la gonococcie, dont l'incidence, évaluée périodiquement par l'OMS, est passée de 62 millions de cas en 1999 à 106 millions en 2010. En France, la prévalence et l'incidence sont difficiles à évaluer. L'infection gonococcique n'est plus une maladie à déclaration obligatoire depuis l'année 2000 et les données épidémiologiques sont uniquement collectées par l'intermédiaire de réseaux de volontaires, le réseau Rénago (Réseau national des gonocoques), regroupant depuis 1986 des laboratoires métropolitains, et le réseau RésIST (Réseau de surveillance des IST), réunissant des cliniciens surveillant les gonococcies depuis 2004. Les données sont colligées et analysées par l'Institut de veille sanitaire (InVS) et le CNR des gonocoques. Après une nette diminution du nombre de cas entre 1986 et 1997, les gonococcies n'ont cessé d'augmenter, et le nombre de cas rapportés par les laboratoires du réseau Rénago a été multiplié par 10 entre 2001 et 2011.

Par ailleurs, l'émergence et la dissémination de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques ne cesse de progresser et *N. gonorrhoeae* n'échappe pas à cette tendance. Depuis la généralisation de l'antibiothérapie, le gonocoque n'a cessé de développer de nouvelles résistances. Dès les années 1940, les premières résistances à la pénicilline sont apparues et ont depuis été suivies par les résistances aux cyclines puis aux quinolones. Aujourd'hui, ce sont les souches de sensibilité diminuée aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (C3G) qui sont alarmantes car c'est le traitement de première ligne qui est menacé par l'apparition sporadique, comme cela a été observé en 2010, de souches résistantes au C3G en France. Dans ce contexte de recrudescence de l'infection et de multiplication des résistances, la surveillance épidémiologique et microbiologique des gonococcies est donc plus que jamais indispensable.

Le CNRG en chiffres :

- En 2013, plus de 3000 cas de gonococcies ont été recensés et analysés conjointement par l'InVS et le CNRG.
- Le CNRG a reçu plus de 1300 souches de gonocoques et les CMI de six antibiotiques ont été déterminés pour 1189 souches.
- La collection du CNRG totalise plusieurs centaines de souches, conservées depuis la création du CNR et du réseau en 1986. Grâce à cette collection de souches nous avons pu mener plusieurs études en 2013 portant sur (i) la résistance plasmidique de souches de gonocoque productrices de bêta-lactamase (ii) l'épidémiologie moléculaire de la résistance du gonocoque aux quinolones pour des souches présentant différents niveaux de résistance aux fluoroquinolones.
- Le CNRG entretient une collaboration entre les laboratoires et les cliniciens pour permettre une meilleure prise en charge des patients, tant au quotidien que par la mise en place d'étude ponctuelles comme (i) le développement des techniques de détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones directement sur les prélèvements cliniques et (ii) l'impact du génotypage des souches par la technique de typage moléculaire NG-MAST pour différencier entre rechute et réinfection.

Sur le plan épidémiologique, on note une persistance de l'augmentation du nombre de cas en 2013. Les gonococcies touchent des patients de plus en plus jeunes et ce sont désormais les 20-24 ans qui sont les plus concernés par l'infection.

L'analyse phénotypique des souches, effectuée par le laboratoire coordonnateur, montre que les taux de résistance aux antibiotiques ont peu évolués par rapport à l'année 2012. On remarque toutefois une augmentation de la proportion de souches résistantes à la pénicilline et des souches résistantes à la tétracycline. Aucune souche de sensibilité diminuée à la ceftriaxone n'a été détectée. Le nombre de souches de sensibilité diminuée ou présentant des CMI élevées au céfixime a diminué par rapport à l'année précédente mais il faut rester très vigilants quant à l'interprétation de ces données et suivre leur évolution.

Des études d'épidémiologie moléculaire de la résistance aux antibiotiques, menées dans le laboratoire associé, ont porté sur l'exploration de la résistance aux bêta-lactamines et aux fluoroquinolones. Des souches de gonocoques productrices de bêta-lactamases ont été explorées et, bien que cette résistance soit encore reliée à la présence de la bêta-lactamase plasmidique TEM-1, nouveaux variants de TEM-1 qui n'hydrolysent pas les C3G, ont pu être objectivés. Ces résultats traduisent une évolution de la bêta-lactamase dans le temps qui nécessite une surveillance accrue car elle peut être significative d'une émergence vers une production de bêta-lactamase à spectre étendu chez *N. gonorrhoeae*. L'exploration de souches résistantes aux fluoroquinolones retrouve principalement que la résistance est liée à des mutations des QRDRs (Quinolone Resistance Determining Region) des protéines GyrA et ParC décrites dans la littérature. Un nouveau génotype qui associait quatre substitutions dont deux dans la sous-unité GyrA et deux dans la sous unité ParC a pu être mis en évidence.

La technique de NG-MAST, technique de référence pour le typage des souches de gonocoque, a été développée et optimisée au niveau du laboratoire associé. Cette technique nous a permis (i) de répondre à des enquêtes de transmission du gonocoque au sein de famille, (ii) de rechercher des complexes clonaux parmi les souches présentant des résistances identiques, (iii) de distinguer les récurrences des réinfections dans une population de patients consultants au CIDDIST du groupe hospitalier Lariboisière Saint Louis-Fernand Vidal. Les prochaines mesures de l'ECDC pour la surveillance des gonococcies visent à élargir le nombre de pays effectuant cette technique afin de pouvoir comparer et suivre la répartition des différents clones (ST types) de gonocoques et surveiller l'éventuelle dissémination d'un clone multi-résistant. Nous sommes désormais en mesure de répondre à cette nécessité et développons cette année la deuxième technique de typage des souches, le MLST (Multi Locus Sequence Typing), qui est basé sur l'amplification et le séquençage de fragments de sept gènes de ménages (*abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdh* et *pgm*) qui sont très conservés au cours du temps.

Les autres objectifs majeurs de nos travaux de recherche seront le séquençage à haut débit des souches d'intérêt et l'exploration de la résistance à l'azithromycine. En effet, l'enjeu majeur de la surveillance actuelle des gonococcies est d'éviter la dissémination de souches multirésistantes car les options thérapeutiques sont très limitées. Il est donc essentiel d'étudier les supports génétiques des résistances aux antibiotiques et d'estimer la transmission des différents clones dans des populations données.

Nous allons donc poursuivre nos missions de surveillance et d'alerte dans le respect des normes de qualité et en développant et diffusant nos travaux de recherche pour contribuer efficacement à la gestion de la recrudescence des infections gonococciques et au risque d'émergence de souches multi-résistantes.

## I. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

---

Les missions et l'organisation du CNRG sont détaillées en annexe de ce rapport.

## II. ACTIVITES D'EXPERTISE

---

La liste des techniques utilisées et développées par le CNR et le laboratoire associé ainsi que le descriptif des marqueurs épidémiologiques et de la collection de souches sont disponibles en annexe de ce rapport.

### II.1. Evolution des techniques au cours de l'année 2013

En 2012, le laboratoire associé au CNR des gonocoques a rapidement mis en place des outils permettant de suivre l'épidémiologie moléculaire de la résistance du gonocoque et la technique de typage moléculaire NG-MAST qui est la technique de référence pour le génotypage des souches de gonocoque. Ces outils moléculaires permettent une vision plus précise de l'épidémiologie moléculaire des souches de *N. gonorrhoeae* circulantes en France.

#### II.1.1. Techniques développées pour l'étude de la résistance aux antibiotique

- Extraction de l'ADN bactérien de *N. gonorrhoeae* : kit InstaGene Matrix (BIORAD®)
- Extraction du contenu plasmidique de *N. gonorrhoeae*
  - Technique de Kieser [Kieser T. Plasmid. 1984;12(1):19-36].
  - Kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep®
- Séquençage des plasmides par PCR par chevauchement



- Détection des gènes *bla*<sub>TEM</sub>
  - Design des amorces
  - Amplification de la totalité du gène *bla*<sub>TEM</sub> par PCR classique
  - Visualisation des produits de PCR par migration sur gel d'agarose : Système Biorad QuantityOne®.
  - Purification des produits de PCR par microplaques Nucleofast 96 PCR® (Macherey-Nagel)
  - Séquençage Sanger : *Dye terminator sequencing* à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems).Applied
  - Purification des séquences (colonne Sephadex G50® (GE Healthcare®)
  - Analyse des réactions de séquence : séquenceur 3130 XL Life Technologies®.
  - Les séquences des gènes *bla*<sub>TEM</sub> ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit® et alignées à une séquence de référence du gène *bla*<sub>TEM</sub> (numéro GenBank AAB40517.1)
  
- Détection des mutations dans les QRDR de GyrA et ParC
  - Choix des séquences cibles à partir d'une séquence de souche sauvage de *N. gonorrhoeae* publiée dans Genbank (numéro d'accès U08817).
  - Design des amorces
  - Amplification des QRDR des gènes *gyrA* et *parC* par PCR classique
  - Visualisation des produits de PCR par migration sur gel d'agarose : Système Biorad QuantityOne®.
  - Purification des produits de PCR par microplaques Nucleofast 96 PCR® (Macherey-Nagel)
  - Séquençage Sanger : *Dye terminator sequencing* à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems).Applied
  - Purification des séquences (colonne Sephadex G50® (GE Healthcare®)
  - Analyse des réactions de séquence : séquenceur 3130 XL Life Technologies®.
  - Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit®
  
- Stratégie similaire pour la détection des mutations dans les QRDR de GyrB et ParE
  
- Détection du gène *aac(6')-Ib-cr*

La recherche du gène codant l'acétyltransférase *aac(6')-Ib-cr* est réalisée selon des conditions déjà mises en place dans le service de Bactériologie (hôpital Lariboisière) et publiées (Fihman V, et al. *J Infect.* 2008; 56 : 454-9)

## II.1.2. Techniques développées pour le génotypage des souches de gonocoque : NG-MAST

La technique de NG-MAST repose sur l'amplification et le séquençage de fragments internes de deux gènes *tbpB* et *porB* codant des protéines de la membrane externe

- Extraction de l'ADN bactérien de *N. gonorrhoeae* : kit InstaGene Matrix (BIORAD®)
- Amplification des gènes *porB* et *tbpB* avec trois couples d'amorces différentes
- Visualisation des produits de PCR par migration sur gel d'agarose : Système Biorad QuantityOne®.
- Purification des produits de PCR par microplaques Nucleofast 96 PCR® (Macherey-Nagel)
- Séquençage Sanger : *Dye terminator sequencing* à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems).Applied
- Purification des séquences (colonne Sephadex G50® (GE Healthcare®)
- Analyse des réactions de séquence : séquenceur 3130 XL Life Technologies®.
- Nettoyage des séquences des gènes *porB* et *tbpB* à l'aide du logiciel BioEdit®
- Résultat du génotype obtenu sur le site <http://www.ng-mast.net>

## II.1.3. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Evaluation des performances du kit de PCR multiplex CT/NG/MG de Biorad pour la détection de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoea* et *M. genitalium* dans des prélèvements cliniques de patients symptomatiques et asymptomatiques. Comparaison avec les résultats obtenus pour CT/NG avec l'automate Panther GenProbe®. L'analyse des résultats est en cours et fera l'objet d'un poster.
- Comparaison du système automatisé m2000 (Abbott) avec la trousse STI-7 (Seegene, distribuée par Eurobio) qui détecte 7 pathogènes responsables de MST (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *U. parvum*). Ce travail a été présenté au 9ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie, à Lille (Poster P167, 7-8 février 2013) et est soumis à publication.
- Comparaison du système automatisé m2000 (Abbott) avec les kits FluoroType® NG et CT (Hain) qui détecte *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*. Ce travail a été présenté au 10<sup>ème</sup> Congrès National de la Société Française de Microbiologie, à Paris (Poster P167, 31 mars-1<sup>er</sup> avril 2014).

## II.2. Activités d'expertise du CNR en 2013

Depuis 2012, la surveillance des infections gonococciques est scindée en deux grands items : d'une part, la surveillance microbiologique, pour laquelle le CNR teste la sensibilité des souches aux antibiotiques et l'InVS recueille les données épidémiologiques, et d'autre part, la surveillance épidémiologique, pour laquelle, seul l'InVS reçoit les données.

Le CNRG n'expertise donc plus que les souches de gonocoques isolées dans les laboratoires participant à la surveillance microbiologique, soit 78 laboratoires. Pour chacune de ces souches, le CNR réalise une identification et une évaluation de la sensibilité aux antibiotiques par recherche de bêta-lactamase et détermination des CMI des souches pour un panel défini d'antibiotiques.

Parallèlement, l'InVS reçoit les fiches épidémiologiques correspondant à ces souches ainsi que les fiches des cas de gonocoques identifiés dans les laboratoires du réseau ne participant qu'à la surveillance épidémiologique.

En 2013, le CNRG a reçu 1384 souches de gonocoques en provenance de 60 laboratoires privés ou hospitaliers appartenant au réseau RENAGO. Parmi ces souches, seules 1189 ont pu être étudiées, les autres n'ayant pas donné de subculture. La part des souches isolées à l'Institut Alfred Fournier représente 22,2% des souches étudiées, soit 264 souches.

Le nombre de souches reçues (1384) est légèrement supérieur à celui de 2012 (1278), ce qui semble conforter l'augmentation nationale du nombre de cas observés ces dernières années.

De même, la moyenne mensuelle du nombre de souches reçues est passée de 106 à 115. Le pic généralement observé au mois d'octobre n'est pas retrouvé. Le nombre de souches reçues a été plus élevé entre juillet et octobre (Tableau 1).

Sur les 1384 souches reçues, 1189 ont pu être remises en culture (85,9%),

Tableau 1 : Répartition mensuelle des souches isolées dans le réseau RENAGO en 2013

	Total souches reçues (nb)	IAF	SNR* (nb)	Total souches étudiées (nb)	SNR* (%)	Total souches étudiées (%)
<b>Janvier</b>	113	23	12	101	10,6%	89,4%
<b>Février</b>	103	19	10	93	9,7%	90,3%
<b>Mars</b>	111	28	10	101	9,0%	91,0%
<b>Avril</b>	110	15	21	89	19,1%	80,9%
<b>Mai</b>	114	14	24	90	21,1%	78,9%
<b>Juin</b>	116	20	21	95	18,1%	81,9%
<b>Juillet</b>	139	20	21	118	15,1%	84,9%
<b>Août</b>	120	24	13	107	10,8%	89,2%
<b>Septembre</b>	125	25	15	110	12,0%	88,0%
<b>Octobre</b>	128	29	13	115	10,2%	89,8%
<b>Novembre</b>	116	24	21	95	18,1%	81,9%
<b>Décembre</b>	89	23	13	75	14,6%	84,3%
	<b>1384</b>	<b>264</b>	<b>194</b>	<b>1189</b>	<b>14,0%</b>	<b>85,9%</b>

\*Souches non réparties : pas de subculture

Pour chacune des souches remises en culture nous avons évalué la sensibilité aux antibiotiques par détermination des CMI de 6 antibiotiques : tétracycline, ciprofloxacine, spectinomycine, cefixime et ceftriaxone sur l'ensemble de l'année et pénicilline (de janvier à mars) ou

azithromycine (d'avril à décembre). Le remplacement de la pénicilline par l'azithromycine en cours d'année a été effectué pour répondre à l'intérêt grandissant pour cette molécule et aux nouvelles recommandations européennes pour le traitement des infections génitales basses non compliquées (ceftriaxone 500 mg/IM plus azithromycine (2g/PO) [Unemo M.,European STI Guidelines Editorial Board. Euro Surveill.2012].

Les E-tests sont réalisés par diffusion en milieu gélosé sur géloses polyvitex® avec un inoculum Mac Farland 0.5 et les valeurs des CMI sont définies après une double lecture (technicien et biologiste) puis interprétées par les biologistes du CNRG. Les valeurs sont saisies dans l'automate de lecture des antibiogrammes (SIRscan®) et transférées dans le système informatique de gestion du laboratoire. Tous les résultats sont adressés par courrier, en moins d'une semaine après réception de la souche, au laboratoire transmetteur et à l'InVS. En parallèle, le compte rendu est envoyé au laboratoire transmetteur par télécopie.

### III. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

---

#### *III.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections*

##### **III.1.1. Les réseaux de partenaires**

###### **Le réseau RENAGO**

La surveillance de l'évolution des gonococcies et de la résistance du gonocoque aux antibiotiques est basée sur l'expertise des souches isolées dans les laboratoires du réseau RENAGO. Ce réseau, créé en 1986, est animé conjointement par le CNRG et l'InVS et regroupe des laboratoires volontaires répartis dans toute la France métropolitaine. L'objectif de ce réseau est de suivre l'évolution des gonococcies en France à travers le recueil de données épidémiologiques et d'étudier la sensibilité des souches aux antibiotiques.

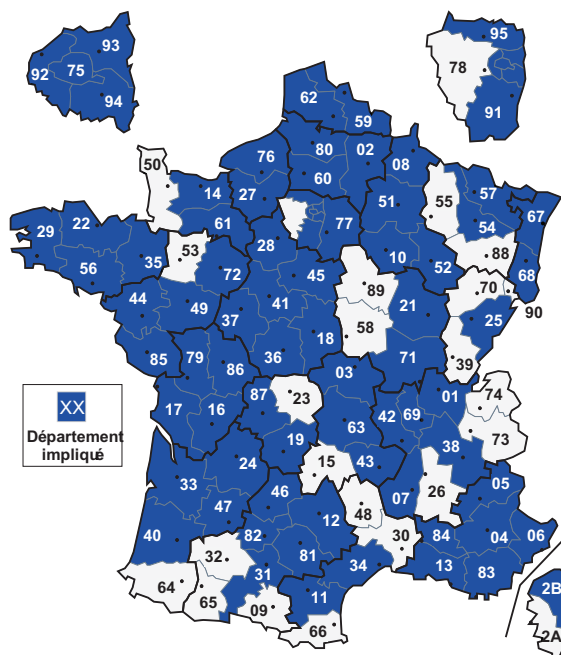
Depuis 2012, la surveillance épidémiologique et la surveillance microbiologique ont été dissociées afin de ne pas dépasser les capacités techniques du CNRG tout en assurant un volume suffisant pour dépister l'émergence de résistances et, en parallèle, une somme de données suffisante au monitoring de la gonococcie.

Seuls les laboratoires participants à la surveillance microbiologique envoient leurs souches mais le CNRG reste bien entendu à la disposition des laboratoires exclus de la surveillance microbiologique, et de tout autre laboratoire de biologie médicale, pour les cas particuliers comme les gonococcies disséminées ou les résistances émergentes aux antibiotiques.

Pour l'année 2013, les détails du réseau RENAGO sont donc les suivants:

- Pour la surveillance épidémiologique (Figure 1) :
  - 118 laboratoires de biologie médicale volontaires participant à la surveillance en envoyant les fiches épidémiologiques à l'InVS
  - répartition par type d'activité : 3/4 de laboratoires privés et 1/4 de laboratoires publics
  - répartition géographique : toute la France métropolitaine
  - estimation de la couverture du réseau : environ 4 à 5 % des laboratoires de biologie médicale en France
  - représentativité : répartition homogène en fonction de la densité de la population

Figure 1: Répartition des 118 laboratoires participants à la surveillance épidémiologique sur le territoire français (Source : InVS 2012)

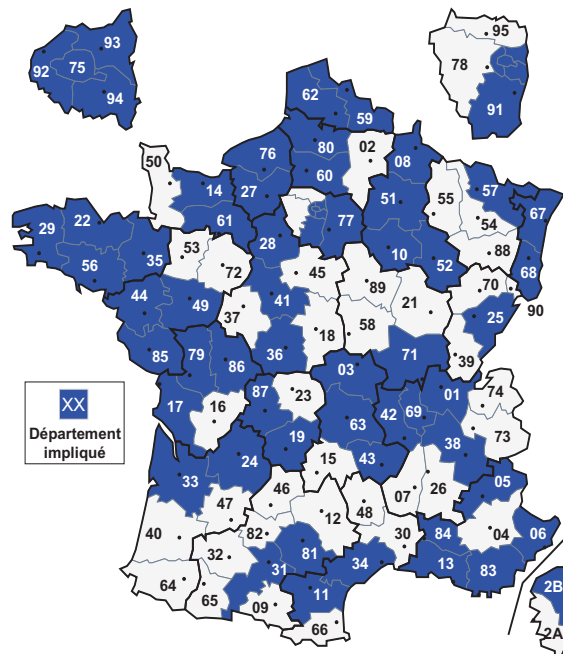


La surveillance épidémiologique est standardisée grâce au remplissage de fiches de renseignement à remplir (cf. annexe). Chaque laboratoire doit recueillir, pour chaque cas de gonococcie, les données suivantes : sexe, âge, type de médecin prescripteur, structure de consultation, site de prélèvement et motif du prélèvement (existence d'une symptomatologie ou partenaire infecté), lieu de contamination (France ou autre pays), technique d'identification ou de détection du gonocoque ainsi que la recherche de bêta-lactamase.

Ce système permet de recueillir des informations qui sont centralisée par l'InVS puis analysées par l'InVS et le CNRG pour en extraire des données statistiques.

- Pour la surveillance microbiologique (Figure 2) :
  - 78 laboratoires inclus dans les 118 de la surveillance épidémiologique, envoyant leurs souches au CNRG. En 2013, seuls 60 de ces laboratoires ont adressés des souches de gonocoques.
  - répartition par type d'activité : 3/4 de laboratoires privés et 1/4 de laboratoires publics
  - répartition géographique : toute la France métropolitaine
  - estimation de la couverture du réseau : un peu plus de 2% des laboratoires de biologie médicale en France
  - représentativité : répartition homogène en fonction de la densité de la population, ce qui limite les biais de sélection et doit permettre de suivre correctement l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques et l'éventuelle émergence de résistances

Figure 2: Répartition des 78 laboratoires participants à la surveillance microbiologique sur le territoire français (Source : InVS 2012)



La surveillance microbiologique est elle aussi standardisée, et le CNRG effectue donc exactement les mêmes CMI pour l'ensemble des souches envoyées. Il est toutefois évident qu'en cas de résistance inhabituelle ou tout autre cas particulier, des investigations complémentaires (génotypage, détection moléculaire des gènes de résistance, recherche du support de la résistance,...) peuvent être entreprises.

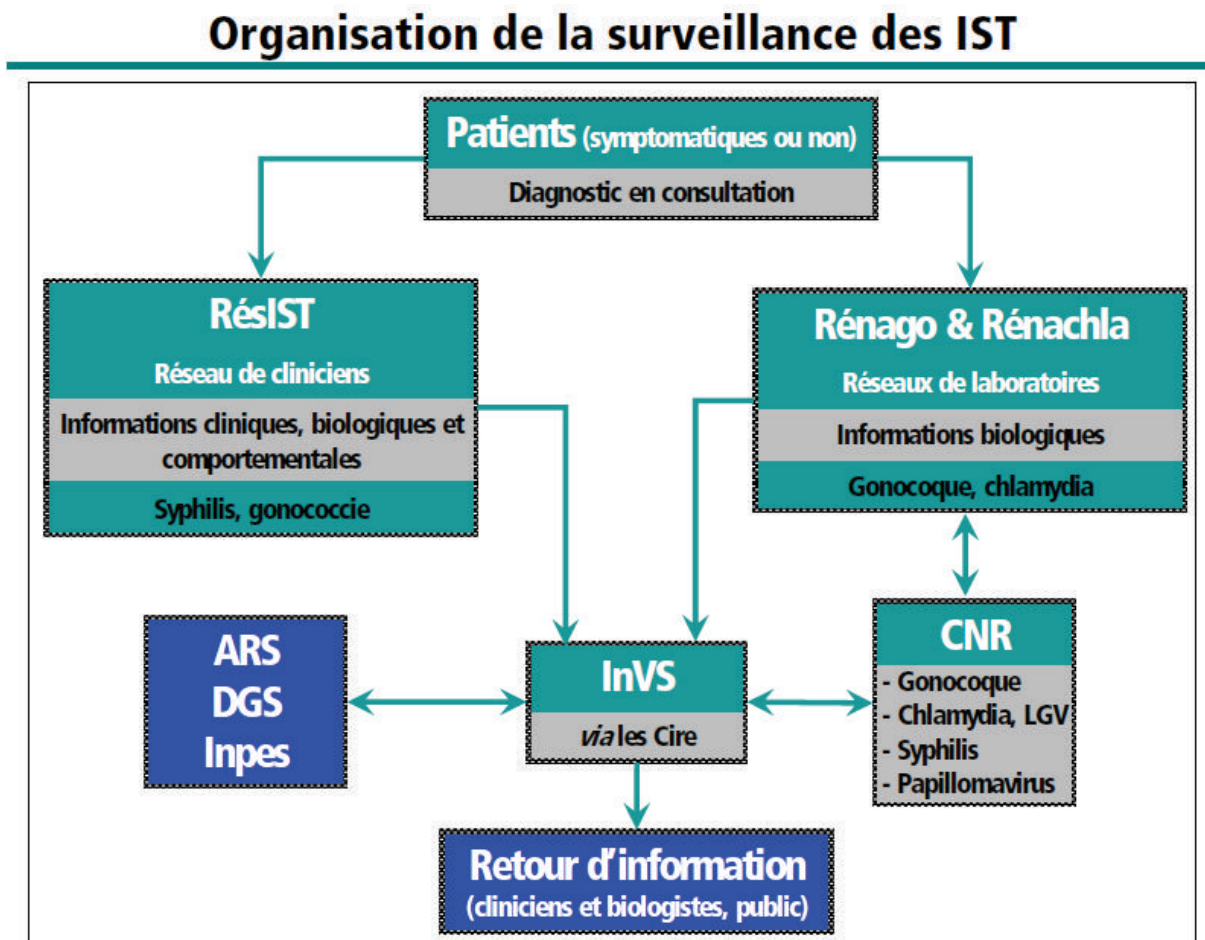
Ce réseau est également mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de gonococcies (formes généralisées, infantiles, ano-rectales, pharyngées,...) ou une évolution épidémique de l'infection dans une population ou une région particulières. Toute forme inhabituelle d'infection gonococcique doit donc être signalée pour que le CNRG et l'InVS puissent analyser ces éléments et prendre éventuellement les mesures adéquates.

Le CNRG suit très attentivement l'évolution de la résistance aux antibiotiques sur le territoire français et reste vigilant face à l'éventuelle émergence de souches multi-résistantes qui peuvent poser des problèmes thérapeutiques.

### Autres collaborations

- Réseau RésIST, un réseau de cliniciens exerçant dans différents lieux de prise en charge des IST (CIDDIST, consultations hospitalières ou libérales) et qui assure le suivi de la Syphilis, de la LGV et de la gonococcie depuis 2004 (Figure 3)
- CNR des *Chlamydia* et CNR de la Syphilis (Figure 3)
- Réseau de surveillance des IST de l'ECDC (Catherine ISON)

Figure 3: Schéma de l'organisation des réseaux de surveillance des IST en France (Source : InVS 2011)



ARS : Agences régionales de santé ; CNR : Centres nationaux de référence ; DGS : Direction générale de la santé ; Inpes : Institut national de prévention et d'éducation pour la santé ; LGV : lymphogranulomatose vénérienne.

### III.1.2. Définition de l'échantillon de souches isolées

La très grande majorité des souches de gonocoques étudiées par le CNRG provient des laboratoires du réseau RENAGO. Il s'agit donc majoritairement de souches provenant de prélèvements effectués en ambulatoire dans des laboratoires privés et, dans une moindre mesure, de souches issues de prélèvements effectués dans des hôpitaux ou dans des dispensaires comme les CIDDIST. Cependant, le CNRG peut être amené à étudier des souches isolées dans des laboratoires ne faisant pas partie du réseau si celles-ci présentent des caractéristiques particulières (résistances aux antibiotiques recommandés en traitement de première intention, infections chez les jeunes enfants, infections disséminées...)

### III.1.3. Distribution des différents types d'agents caractérisés

Le recueil des données épidémiologique est géré par l'InVS qui reçoit toutes les fiches épidémiologiques des laboratoires du réseau. Au 11 mars 2014, le nombre de fiches reçues s'élevait à 3209 (données non encore consolidées). En 2012, le nombre de fiches était de 2826 à la même période. On observe donc une progression d'environ 13,5% entre 2012 et 2013 mais ces informations doivent encore être consolidées car le nombre total de fiches a finalement été de 3000 en 2012, du fait des envois tardifs par les laboratoires du réseau (source : InVS\_Dr Guy La Ruche). Cette progression semble refléter une véritable augmentation des gonococcies car le nombre de cas diagnostiqués/dépistés uniquement par PCR (TAAN) paraît se stabiliser après avoir beaucoup augmenté entre 2009 et 2012. Alors que près de 85% des infections gonococciques de la femme n'étaient diagnostiquées que par PCR en 2012, cette technique seule ne représente que 61,7% des cas en 2013. L'isolement de gonocoque uniquement par culture est en revanche en progression, ce qui paraît quelque peu paradoxal puisque la culture n'est pas une technique très sensible sur les prélèvements vaginaux. Chez l'homme, en revanche la majorité des gonococcies reste diagnostiquée par culture (51,2%) et la PCR n'est le seul outil diagnostic que dans 21,4% des cas (Tableau 2).

Tableau 2: Distribution des cas de gonococcies diagnostiqués par PCR en fonction du sexe en 2013

Sexe	Technique	Nb	%
<b>Hommes</b>	Culture seule	1134	51,2%
	PCR seule	473	21,4%
	PCR et culture	571	25,8%
	Autre/non précisé	36	1,6%
	Total	2214	100,0%
<b>Femmes</b>	Culture seule	245	24,8%
	PCR seule	610	61,7%
	PCR et culture	123	12,4%
	Autre/non précisé	10	1,0%
	Total	988	100,0%

Les données en fonction des différents critères d'évaluation sont détaillées dans les tableaux ci-après.

#### ➤ Répartition en fonction du sexe

Parmi les 3209 souches actuellement déclarées, 2214 (69%) ont été isolées chez des hommes et 988 (30,8%) chez des femmes, répartition identique à l'année précédente (respectivement 68,7 et 31,1% des cas). Pour 7 fiches (0,2%), le genre n'était pas renseigné.

Le sexe ratio H/F est toujours de 2,2:1. Les infections gonococciques sont donc plus de deux fois plus souvent diagnostiquées chez l'homme que chez la femme, ce qui conforte les données observées ces dernières années en Europe (ECDC). L'augmentation de la proportion de gonococcies chez les femmes observée ces dernières années se stabilise autour de 30% (31,1% en 2012, 22% en 2011 et 14,5% en 2010).



### ➤ Répartition en fonction de l'âge

Globalement les 15-34 représentent la classe d'âge la plus atteinte par la gonococcie, mais on note un rajeunissement de la population touchée par rapport à l'année 2012. Ce phénomène est observé depuis plusieurs années mais s'est accéléré récemment.

Chez l'homme, la classe d'âge des 25-34 ans représentait 52,3% des cas observés en 2012 alors qu'en 2013, ce sont les 20-29 ans qui sont majoritaires (54%). Au sein de ce groupe, les 20-24 ans sont passés de 8% en 2012 à 29% en 2013 (Tableau 3).

Chez la femme, le rajeunissement est observé également mais ce sont des populations encore plus jeunes qui sont touchées. En 2012, la majorité des femmes infectées (67%) avait entre 20 et 29 ans alors qu'en 2013, l'infection affecte majoritairement les 15-24 ans. Tout comme chez l'homme, les populations les plus jeunes ont fortement augmenté puisque la classe d'âge 15-19 ans représente 29% des cas en 2013 contre seulement 1.5% en 2012.

Tableau 3: Distribution des cas de gonocoques par classes d'âges en fonction du sexe en 2013

Age	Hommes (nb)	H (%)	Femmes (nb)	F (%)
<b>0-4 ans</b>	1	0,0%	1	0,1%
<b>5-9 ans</b>	0	0,0%	0	0,0%
<b>10-14 ans</b>	2	0,1%	10	1,0%
<b>15-19 ans</b>	153	7,0%	284	29,1%
<b>20-24 ans</b>	625	28,7%	361	37,0%
<b>25-29 ans</b>	536	24,6%	147	15,1%
<b>30-34 ans</b>	313	14,4%	55	5,6%
<b>35-39 ans</b>	205	9,4%	31	3,2%
<b>40-44 ans</b>	139	6,4%	24	2,5%
<b>45-49 ans</b>	85	3,9%	17	1,7%
<b>50-54 ans</b>	53	2,4%	14	1,4%
<b>55-59 ans</b>	34	1,6%	14	1,4%
<b>60-64 ans</b>	17	0,8%	10	1,0%
<b>65 ans et +</b>	15	0,7%	8	0,8%
<b>Total</b>	2178	100,0%	976	100,0%

### ➤ Répartition en fonction du site de prélèvement

Chez l'homme, la gonococcie siège principalement au niveau urétral. La majorité des gonocoques est donc isolée au niveau de l'urètre ou du premier jet urinaire (81.5%) (Tableau 4). La proportion de souches isolées au niveau ano-rectal (7.7%) est à nouveau en augmentation après une baisse assez nette observée en 2012 (5,8% et 5,9% en 2011 et 2010 puis 3,4% en 2012). La proportion des isoléments de gonocoques au niveau du pharynx, stable ces dernières années (1,1% en 2012 et 1,3% en 2011) est également en augmentation (2,3%), mais reste certainement sous-évaluée car la recherche d'une localisation pharyngée n'est pas fréquente bien que l'utilisation des préservatifs lors des rapports bucco-génitaux soit très rare.

Chez la femme, le gonocoque est principalement responsable de cervicites et la majorité des souches de gonocoques reste isolée au niveau col/vagin (92.7%). Après une nette augmentation en 2012, la proportion des isolats au niveau de l'urètre ou de l'urine est redescendue aux taux généralement observés (3.3% et 3.7% en 2011 et 2013 contre 6,6% en 2012). La proportion des autres sites d'isolement reste très faible et n'évolue pas.

Tableau 4: Distribution des sites de prélèvement en fonction du sexe en 2013

<b>Sexe</b>	<b>Site</b>	<b>Nb</b>	<b>%</b>
<b>Hommes</b>	Urètre/urine	1805	81,5%
	Col/vagin	3	0,1%
	Anus	171	7,7%
	Pharynx	50	2,3%
	Autres	179	8,1%
	Non précisé	6	0,3%
	Total	2214	100,0%
<b>Femmes</b>	Urètre/urine	37	3,7%
	Col/vagin	916	92,7%
	Anus	6	0,6%
	Pharynx	4	0,4%
	Autres	21	2,1%
	Non précisé	4	0,4%
	Total	988	100,0%

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

Chez l'homme, l'infection est généralement symptomatique (95.3% des cas renseignés) et la mise en évidence du germe correspond le plus souvent au diagnostic étiologique d'une urétrite ou, plus rarement, d'une ano-rectite (Tableau 5).

Chez la femme, le caractère symptomatique de l'infection est beaucoup plus difficile à apprécier car, dans plus de la moitié des cas, cette donnée n'est pas renseignée. Lorsque l'information est notifiée, les symptômes sont présents dans 52.8% des cas. Ces données sont cohérentes puisque l'infection est généralement peu ou pas symptomatique chez les femmes. Par ailleurs, les dépistages systématiques chez les femmes jeunes se multiplient et il est donc probable que la plupart des cas non précisés correspondent également à des femmes asymptomatiques.

Globalement, ces chiffres sont proches de ceux observés ces dernières années et on ne remarque donc pas d'évolution du caractère symptomatique de l'infection par le gonocoque. La part des dépistages par rapport aux prélèvements à visée diagnostique semble stable.

Tableau 5: Distribution des cas en fonction de la symptomatologie et du sexe en 2013

Sexe	Symptomatologie	Nb	%
<b>Hommes</b>	Oui	1452	65,6%
	Non	72	3,3%
	Non précisé	690	31,2%
	Total	2214	100,0%
<b>Femmes</b>	Oui	244	24,7%
	Non	218	22,1%
	Non précisé	526	53,2%
	Total	988	100,0%

### ➤ Répartition en fonction de l'existence de partenaires infectés

Malgré un questionnaire épidémiologique précis, il est toujours très difficile de savoir, pour les biologistes encore plus que pour les cliniciens, si les partenaires des patients sont infectés ou non. Cette donnée n'a donc été renseignée que dans 3,9% des cas en 2013 et est par conséquent difficilement exploitable. Lorsque l'information est disponible, on note que la moitié des patients ont connaissance d'un partenaire infecté (Tableau 6).

Tableau 6: Distribution des cas de gonococcies en fonction de la déclaration d'un partenaire infecté et du sexe en 2013

Partenaire infecté	Nb	%
Oui	126	3,9%
Non	131	4,1%
Non précisé	2952	92,0%
Total	3209	100,0%

### ➤ Répartition en fonction de l'existence et du type d'IST associées

Tout comme la notion de partenaire infecté, la présence d'IST associées est difficile à évaluer car non renseignée dans 45% des cas.

Lorsque l'information est disponible, on note que la gonococcie est associée à une autre IST dans 40,8% des cas chez l'homme et 61,3% des cas chez la femme (Tableau 7).

Tableau 7: Distribution des cas de gonococcies associées à une autre IST en fonction du sexe en 2013

Sexe	IST associées	Nb	%
<b>Hommes</b>	Oui	448	20,2%
	Non	649	29,3%
	Non précisé	1117	50,5%
	Total	2214	100,0%
<b>Femmes</b>	Oui	406	41,1%
	Non	256	25,9%
	Non précisé	326	33,0%
	Total	988	100,0%

Les co-infections sont quasi-exclusivement liées à *Chlamydia trachomatis* chez la femme (98,9% des cas). Chez l'homme, les co-infections à *C. trachomatis* sont également prédominantes (82,5%) mais on observe également des co-infections avec le VIH ou la syphilis (*Treponema pallidum*) (respectivement 10,5% et 7% des cas) (Tableau 8).

Tableau 8: Distribution du type d'IST associé à la gonococcie en fonction du sexe en 2013

Sexe	IST associées	Nb	%
<b>Hommes</b>	<i>C. trachomatis</i>	363	82,5%
	VIH	46	10,5%
	<i>T. pallidum</i>	31	7,0%
	HPV		0,0%
	Total	440	100,0%
<b>Femmes</b>	<i>C. trachomatis</i>	373	98,9%
	VIH	2	0,5%
	<i>T. pallidum</i>	1	0,3%
	HPV	1	0,3%
	Total	377	100,0%

### ➤ Répartition en fonction de la structure de consultation et du type de prescripteur

D'une façon globale, les gonococcies sont majoritairement diagnostiquées en ville mais les informations émanant du réseau de surveillance sont un peu biaisée car celui-ci est principalement constitué de structures privées

Les hommes consultent majoritairement des généralistes (68,7%), surtout en cabinet privé (63,1%). Plus rarement, ils consultent dans des structures spécialisées de type dispensaire (CIDDIST : 15,8%) (Tableaux 9 et 10).

Les femmes consultent préférentiellement des gynécologues (48,9%) mais aussi des généralistes (32,3%). Ces consultations ont le plus souvent lieu en cabinet privé (32,2%) mais les consultations dans un planning familial restent très fréquentes également (24,6%) (Tableaux 9 et 10).

Tableau 9: Distributions des cas de gonococcies en fonction de la structure de consultation en 2013

Sexe	Structure de consultation	Nb	%	Sexe	Structure de consultation	Nb	%
<b>Hommes</b>	Privé ou clinique	1397	63,1%	<b>Femmes</b>	Privé ou clinique	318	32,2%
	Service hospitalier	228	10,3%		Service hospitalier	174	17,6%
	Ciddist	349	15,8%		Ciddist	106	10,7%
	CDAG	120	5,4%		CDAG	91	9,2%
	CPEF	12	0,5%		CPEF	266	26,9%
	Autres	74	3,3%		Autres	13	1,3%
	<i>dont Prison</i>	50	2,3%		<i>dont Prison</i>	1	0,1%
	Non précisé	34	1,5%		Non précisé	20	2,0%
	Total	2214	100,0%		Total	988	100,0%

Tableau 10: Distributions des cas en fonction de la spécialité du médecin prescripteur en 2013

Sexe	Prescripteur	Nb	%	Sexe	Prescripteur	Nb	%
<b>Hommes</b>	Généraliste	1522	68,7%	<b>Femmes</b>	Généraliste	319	32,3%
	Gynéco	29	1,3%		Gynéco	483	48,9%
	Dermato	163	7,4%		Dermato	76	7,7%
	Urgentiste	142	6,4%		Urgentiste	9	0,9%
	Infectiologue	79	3,6%		Infectiologue	16	1,6%
	Proctologue	48	2,2%		Proctologue		0,0%
	Urologue	22	1,0%		Urologue	1	0,1%
	Gastro-entéro	10	0,5%		Gastro-entéro		0,0%
	Autres	30	1,4%		Autres	31	3,1%
	Non précisé	169	7,6%		Non précisé	53	5,4%
Total	2214	100,0%	Total	988	100,0%		

### ***III.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux***

#### **III.2.1. Définition de l'échantillon de souches testées**

Les souches de gonocoques pour lesquelles la sensibilité aux antibiotiques a été testée, sont celles qui ont été envoyées par les laboratoires du réseau RENAGO participant à la surveillance microbiologique (60 laboratoires en 2013) et qui ont donné une subculture, ce qui représente 1189 souches (données à consolider).

#### **III.2.2. Définitions utilisées pour définir la résistance**

Depuis l'avènement des antibiotiques, le gonocoque a montré de remarquables capacités d'acquisition et de développement de résistances à tous les antibiotiques utilisés. Les supports génétiques de ces résistances sont multiples et fréquemment associés (Tableau 11). Il apparaît également que, une fois acquis, ces mécanismes sont conservés, même en l'absence de pression de sélection.

Tableau 11: Supports génétiques de la résistance de *N. gonorrhoeae*

Antibiotiques	Gènes	Action	Principales mutations	Références
<b>Pénicillines</b>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	Production de la bêta-lactamase TEM-1		
	<i>penA</i>	Mutations de la protéine liant la pénicilline PBP2	346 ou 340-570	Spratt, 1988 Lee, 2010 Whiley, 2010
	<i>ponA</i>	Mutation de la protéine liant la pénicilline PBP1	L421P	
	<i>pilQ</i>	Mutation de la sécrétine PilQ	N648S, E666K (PilQ2) et F595L (PilQ1)	
<b>Ceftriaxone</b>	<i>porB1b</i>	Imperméabilité par mutation de la porine PIA ou PIB	G120K et A121D ou A121N	Zhao, 2009 Liao, 2011 Unemo 2012
	<i>mtrR</i>	Diminution de production du répresseur MTR	Mutation promoteur (délétion A, insertionT)	
	<i>penA</i>	Mutation dans le répresseur MTR Mutation protéine liant pénicilline PBP2	A39T, G45D, L47P, D79N, T86A H105Y PLP mosaïques avec mutations ponctuelles des acides aminés A501V, A501T, A501P, G545S, P551S, V316T et I312M Prévalence de l'allèle mosaïque XXXIV	
<b>Tétracyclines</b>	<i>tetM</i>	Production de la protéine TetM protectrice du ribosome		Olesky, 2002 Hu 2005
	<i>porB</i>	Imperméabilité par mutation de la porine PIA ou PIB	G120K et A121D ou A121G ou A121N V57M	
	<i>rpsJ</i>	Mutation protéine ribosomale S10		
	<i>mtrR</i>	Diminution production répresseur MTR	A39T ou G45D / R44H	
<b>Quinolones</b>	<i>parC</i>	QRDR Topoisomérase ParC	S87R ou N/E91Q ou G	(Trees 1999)
	<i>gyrA</i>	QRDR DNA gyrase GyrA	S91F/D95G ou A	
<b>Macrolides</b>	<i>mtrR</i>	Diminution production répresseur MTR	Mutation promoteur (délétion A, insertion T)	Cousin, 2003 Roberts, 1999
		Mutation du répresseur MTR	A39T ou G45D / R44H	Luna 2000 Chisom, 2012
	<i>ermA,B,C,F</i>	Méthylation de l'ARNr 23S		
	<i>mefA</i>	Protéine d'efflux du macrolide		
	<i>mphA</i>	Modification enzymatique du macrolide (phosphotransférase)		
	<i>ereA, ereB</i>	Modification enzymatique du macrolide (estérase)		
		Mutation protéine ribosomale L4		
	<i>rpID</i>	Mutation protéine ribosomale L22		
	<i>rpIV</i>	Mutation ARNr 23S	A2059G ou C2611T	
	<i>rpl</i>			
<b>Spectinomycine</b>	<i>rrs</i>	Mutation de l'ARNr 16S	G1064C et C1192U	Galimand 2000 Unemo 2012
	<i>rspE</i>	Mutation protéine ribosomale	Délétion codon 27 et K28E 5S	

Les critères utilisés par le CNRG pour la catégorisation des souches en fonction de leur CMI sont ceux définis par le CASFM. Ils sont rappelés dans les tableaux suivants (Tableaux 12 et 13).

Tableau 12: Méthode utilisée et gamme de CMI définies pour chaque antibiotique testé

Antibiotiques testés	Pénicilline G	Tétracycline	Ciprofloxacine	Ceftriaxone Cefixime	Spectinomycine
Méthodes utilisées	E-test	E-test	E-test	E-test	E-test
Gamme testée (mg/l)	0,002 - 32	0,016 - 256	0,002 - 32	0,002 - 32 0,016 - 256	0,064 - 1024

Tableau 13: Catégorisation SIR en fonction des valeurs critiques de chaque antibiotique testé

Valeurs critiques (mg/l)	Pénicilline G	Tétracycline	Ciprofloxacine	Ceftriaxone*	Cefixime**	Spectinomycine
<b>Sensible</b>	≤ 0,06	≤ 0,5	≤ 0,03	≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 64
<b>Intermédiaire</b>	> 0,06 - ≤ 1	> 0,5 - ≤ 1	0,06	-	-	-
<b>Résistant</b>	> 1	> 1	> 0,06	> 0,125	-	> 64

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

\*\* Les souches qui présentent une CMI au céfixime > 0,125 mg/L sont considérées comme de sensibilité diminuée d'après les critères du CA-SFM 2013. L'EUCAST ne fixe aucune valeur critique pour cette molécule qui n'est plus recommandée en traitement.

Au-delà de ces critères, les souches de sensibilité diminuée à la ceftriaxone sont suspectées à partir d'une CMI > 0,032 mg/L. Cette valeur est fixée par la valeur de l'ECOFF (Epidemiological Cutoff value) ≤ 0,032 mg/L et l'observation d'une répartition modale des CMI à la ceftriaxone entre 0,004 et 0,008 mg/L.

Pour la pénicilline et la tétracycline, d'autres définitions ont été utilisées. Ces définitions reposent sur les associations possibles entre les différents mécanismes de résistance et du support génétique de la résistance à ces deux antibiotiques (Tableau 14). On parle de résistances de haut niveau pour les résistances plasmidiques à la pénicilline G (PPNG), à la tétracycline (TRNG), aux deux molécules (PPNG-TRNG).

Tableau 14: Catégorisation des souches en fonction des associations de résistances

Types de résistance	Critères
<b>PPNG</b>	β-lactamase positive et CMI tétracycline <16mg/l
<b>TRNG</b>	CMI tétracycline ≥ 16mg/l et β-lactamase négative
<b>PP/TRNG</b>	β-lactamase positive et CMI tétracycline ≥ 16mg/l



### III.2.3. Résultats : distribution en fonction de critère pertinent

En 2013 le CNRG a testé la sensibilité aux antibiotiques de 1089 souches de gonocoques. Sur l'ensemble des souches reçues, les CMI de 6 antibiotiques ont été déterminées : tétracycline, céfixime, ceftriaxone, ciprofloxacine, spectinomycine et pénicilline ou azithromycine selon la période de l'année.

Seules 149 souches restaient sensibles à tous les antibiotiques testés, soit 12,5% des souches reçues. Tout comme les années précédentes, la majorité des souches testées est donc résistante à au moins un antibiotique ou une classe d'antibiotiques

#### ➤ Evaluation de la sensibilité à la tétracycline

Sur l'année 2013, la proportion de souches sensibles à la tétracycline a diminué par rapport à 2012 (11,4 vs 17% des souches) et a ainsi atteint son plus bas niveau. Les souches présentant une résistance chromosomique de bas niveau (CMI : 1-12 mg/L) sont les plus fréquentes (49,9%). La résistance plasmidique de haut niveau (CMI > 12 mg/L) représente 22,4% des résistances (Tableau 15).

Tableau 15: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* à la tétracycline en 2013

CMI Tétracycline (mg/L)	Nb de souches
0,047	1
0,064	
0,094	1
0,125	4
0,19	13
0,25	54
0,38	62
0,5	47
0,75	87
1	178
1,5	116
2	95
3	120
4	68
6	12
8	4
12	3
16	34
24	98
32	125
48	36
64	11
96	15
128	2
<b>Total</b>	<b>1186</b>

### ➤ Evaluation de la sensibilité à la pénicilline

Pour chaque souche, la production de bêta-lactamase est systématiquement recherchée. Pour cela, deux techniques sont utilisées : la galerie ApiNH® et les disques chromogéniques de céfinase. Sur les 1189 souches étudiées, 133 produisaient une bêta-lactamase, ce qui représente 11,5% des souches.

La CMI de la pénicilline, déterminée par bandelette E-test, n'a par contre été évaluée que pour 421 souches car cet antibiotique a été remplacé par l'azithromycine en cours d'année dans le panel dédié à la surveillance microbiologique.

En 2013, la proportion de souches sensibles à la pénicilline a diminué par rapport à 2012 (20.9% vs 26%) et reste très faible. La majorité des souches présente une sensibilité diminuée à cet antibiotique, c'est-à-dire des valeurs de CMI comprises entre 0,094 et 1 mg/L (67,9%) (Tableau 16).

Globalement, ces valeurs sont en corrélation avec ce qui est observé depuis une dizaine d'années.

Tableau 16: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* à la pénicilline en 2013

CMI pénicilline (mg/L)	Nb de souches
0,002	
0,003	1
0,004	1
0,006	2
0,008	1
0,012	8
0,016	10
0,023	4
0,032	10
0,047	15
0,064	36
0,094	60
0,125	62
0,19	34
0,25	33
0,38	19
0,5	26
0,75	27
1	25
1,5	8
2	2
3	5
4	4
6	1
8	2
12	4
16	6
24	2
32	13
Total	421

### ➤ Evaluation de la sensibilité à la ciprofloxacine

Après une légère diminution en 2012 (39%) par rapport à 2011 (42,9%), la proportion de souches résistantes à la ciprofloxacine atteint à nouveau 43% des souches. Cette résistance est principalement de haut niveau (94,7% des résistances), ce qui correspond à des valeurs de CMI  $\geq 1$  mg/L (Tableau 17).

Tableau 17: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* à la ciprofloxacine en 2013

CMI ciprofloxacine (mg/L)	Nb de souches
0,002	4
0,003	23
0,004	134
0,006	304
0,008	148
0,012	21
0,016	22
0,023	15
0,032	2
0,047	1
0,064	2
0,094	
0,125	
0,19	2
0,25	3
0,38	2
0,5	5
0,75	15
1	22
1,5	20
2	17
3	38
4	56
6	40
8	44
12	33
16	22
24	11
32	182
<b>Total</b>	<b>1188</b>

### ➤ Evaluation de la sensibilité aux céphalosporines : céfixime et ceftriaxone

Depuis 2010, année au cours de laquelle nous avons isolée 2 souches résistantes à la ceftriaxone, aucune souche résistante à cet antibiotique n'a été mise en évidence.

La proportion de souches présentant une CMI au céfixime supérieure à 0,125mg/L, qui avait atteint 3% en 2012 a quasiment diminué de moitié en 2013 et représente 1,68% des souches. Les taux de souches présentant des CMI vis-à-vis de la ceftriaxone légèrement supérieures à ce que l'on observe chez les souches sauvages (CMI  $\geq$  0,032 mg/L) restent stables (5,8% en 2013 vs 8,1% en 2012) (Tableaux 18 et 19).

Tableaux 18 et 19: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* au céfixime et à la ceftriaxone en 2013

CMI céfixime (mg/L)	Nb de souches	CMI Ceftriaxone (mg/L)	Nb de souches
0,016	901	0,002	561
0,023	59	0,003	118
0,032	54	0,004	82
0,047	62	0,006	65
0,064	28	0,008	56
0,094	33	0,012	67
0,125	29	0,016	79
0,19	13	0,023	90
0,25	4	0,032	37
0,38	1	0,047	21
0,5	2	0,064	8
		0,094	2
		0,125	1
<b>Total</b>	<b>1186</b>	<b>Total</b>	<b>1187</b>

### ➤ Evaluation de la sensibilité à la spectinomycine

Jusqu'à présent, aucune souche résistante à la spectinomycine n'a été isolée en France. La répartition des CMI est globalement identique à celle observée les années précédentes (Tableau 20).

Tableau 20: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* à la spectinomycine en 2013

CMI Spectinomycine (mg/l)	Nb de souches
1	1
1,5	4
2	6
3	32
4	263
6	548
8	283
12	49
16	1
<b>Total</b>	<b>1187</b>

### ➤ Evaluation de la sensibilité à l'azithromycine

Depuis le mois d'avril 2013, le CNR a remplacé la pénicilline par l'azithromycine dans le panel de CMI testées. Nous avons une première estimation de la répartition des CMI des souches à cet antibiotique mais peu de comparatif avec les années précédentes car cette molécule n'était alors testée que sur 110 souches par an dans le cadre de la participation au programme de surveillance européen de la sensibilité du gonocoque aux antibiotiques. En 2013, le taux de résistance à cet antibiotique était de 1,3% et 11,3% des souches testées étaient catégorisées intermédiaires (tableau 21).

Tableau 21: Distribution des CMI de *N. gonorrhoeae* à l'azithromycine en 2013

CMI azithromycine (mg/L)	Nb de souches
0,016	3
0,023	11
0,032	25
0,047	58
0,064	83
0,094	90
0,125	106
0,19	121
0,25	98
0,38	61
0,5	16
0,75	2
1	3
1,5	1
2	1
<b>6</b>	<b>2</b>
<b>Total</b>	<b>681</b>

### ➤ Résistances plasmidiques et leur association

Les résistances plasmidiques à la pénicilline (PPNG) restent rares et sont le plus souvent associées à une résistance plasmidique à la tétracycline (PP/TRNG). Cette dernière est d'ailleurs en augmentation par rapport à l'année 2012 (TRNG : 27,25% en 2013 vs 16,7% en 2012) (Tableau 22).

Tableau 22: Répartition des résistances plasmidiques et leur association parmi les souches de *N. gonorrhoeae* étudiées en 2013

Types de résistances	Souches (%)
<b>PPNG</b>	11,47
<b>PP/TRNG</b>	7
<b>TRNG</b>	27,25

### ➤ Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques en fonction des CMI au céfixime

Depuis 2012, nous avons étudié la distribution des CMI des différents antibiotiques testés en fonction des CMI du céfixime. Pour cela, quatre groupes de souches ont été définis selon des valeurs croissantes de CMI au céfixime et, au sein de chaque groupe, nous avons analysé la distribution des CMI des autres antibiotiques étudiés et la production de bêta-lactamase afin de rechercher les corrélations éventuelles (Tableau 23).

Il apparaît tout d'abord que l'augmentation des CMI du gonocoque vis-à-vis du céfixime est liée à une augmentation des CMI vis-à-vis de la ceftriaxone. Ces données sous-tendent le fait que le céfixime est un marqueur de l'augmentation des CMI du gonocoque vis-à-vis des C3G et permet donc de suivre l'apparition progressive des souches de sensibilité diminuée à ces antibiotiques.

Concernant la distribution des CMI de la tétracycline, on observe une prédominance marquée des résistances chromosomiques ( $1 < \text{CMI} < 16$  mg/L) et cette prépondérance s'accroît parallèlement aux CMI du céfixime. Ainsi, les souches présentant une résistance chromosomique à la tétracycline représentent 19,3% des souches du groupe CMI céfixime  $\leq 0.016$  mg/l alors qu'elles représentent 95% des souches du groupe CMI céfixime  $> 0.125$  mg/l.

On note par ailleurs que les souches présentant une résistance plasmidique à la tétracycline (CMI  $> 16$  mg/l) ne sont présentes que chez les souches présentant des valeurs basses de CMI au céfixime (34,1% et 4,7% pour les groupes CMI céfixime  $\leq 0.016$  mg/l et 0.023-0.064 mg/l respectivement). Les souches ayant des CMI élevées vis-à-vis du céfixime semblent n'héberger que des gènes de résistance chromosomique aux cyclines et ne porteraient donc pas de déterminants plasmidiques de résistance aux cyclines.

De même, la résistance plasmidique à la pénicilline, caractérisée par la production de bêta-lactamase, n'est observée que chez les souches ayant des CMI très basses pour le céfixime mais n'est jamais retrouvée chez les souches présentant des CMI plus élevées.

Les souches présentant des CMI élevées vis-à-vis du céfixime que nous avons observées n'hébergent donc pas de déterminants plasmidiques de résistance à la pénicilline ou aux cyclines. Pour ce qui est de la ciprofloxacine, on remarque que la majorité des souches ayant des CMI très basses pour le céfixime est également sensible à la ciprofloxacine. En revanche, dès que les souches présentent des CMI céfixime  $> 0.016$  mg/l, la proportion de souches résistantes à haut niveau à la ciprofloxacine ( $1 < \text{CMI} \leq 32$  mg/l) augmente parallèlement aux CMI pour le céfixime.

Tableau 23: Distribution des CMI des antibiotiques testés en fonction des CMI du céfixime. 2013.

Autres antibiotiques (CMI en mg/l)	CMI céfixime $\leq 0.016$ mg/l	CMI céfixime 0.023-0.064 mg/l	CMI céfixime 0.094-0.125 mg/l	CMI céfixime $> 0.125$ mg
<b>CMI ceftriaxone</b>	<b>0.002-0.003</b> 74.9%	<b>0.008-0.032</b> 91.1%	<b>0.016-0.047</b> 87.1%	<b>0.023-0.094</b> 100%
	<b>1-16</b> 19.3%	<b>1-16</b> 81.7%	<b>1-16</b> 96.8%	<b>1-16</b> 95%
<b>CMI tétracycline</b>	<b>&gt;16</b> 34.1%	<b>&gt;16</b> 5.9%	<b>&gt;16</b> 0%	<b>&gt;16</b> 0%
<b>CMI ciprofloxacine</b>	<b>0.004-0.008</b> 63.6%	<b>3-32</b> 77.3%	<b><math>\geq 32</math></b> 79%	<b><math>\geq 32</math></b> 90%
<b>CMI azithromycine</b>	<b>0.032-0.38</b> 94.9%	<b>0.125-0.38</b> 81.1%	<b>0.125-0.38</b> 84.6%	*
<b>Pénicillinase positive</b>	14.1%	4.5%	0%	0%
<b>Nb total de souches étudiées</b>	903	203	62	20

\*Nombre de souches insuffisant

### III.2.4. Analyse des tendances

#### ➤ Evolution de la sensibilité à la pénicilline et à la tétracycline

Depuis l'apparition des premières résistances à la pénicilline, dans les années 40, et à la tétracycline, dans les années 70, la proportion de souches sensibles n'a cessé de diminuer, y compris ces dix dernières années.

Le pourcentage de souches résistantes à la pénicilline est passé de 62,7% en 2001 à 79,1% en 2013.

La proportion de souches résistantes à la tétracycline a encore plus augmenté, puisqu'elle est passée de 60% en 2001 à 88,6% en 2013, plus haut taux jamais observé jusqu'ici (Figure 4).

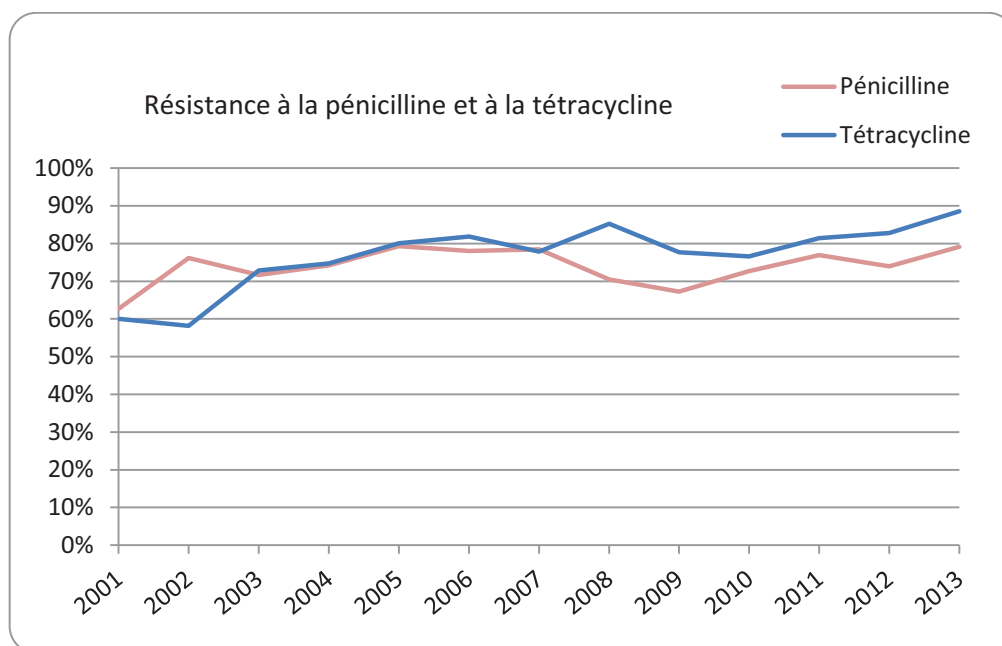


Figure 4: Evolution de la résistance à la pénicilline et à la tétracycline entre 2001 et 2013

➤ **Evolution de la sensibilité à la ciprofloxacine**

Après une très forte augmentation de la résistance observée au début des années 2000 (de 14% en 2001 à 47% en 2006), la proportion de souches résistantes s'est stabilisée autour de 40% depuis 2007 et malgré de petits écarts d'une année sur l'autre, les variations ne sont pas significatives (Figures 5 et 6).

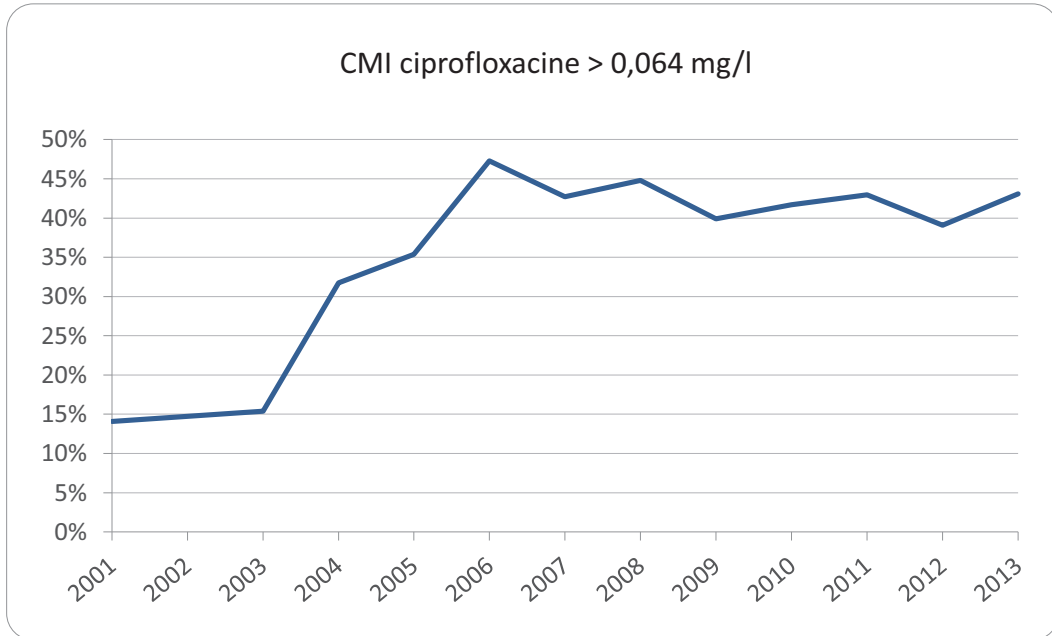


Figure 5: Evolution de la proportion de souches résistantes à la ciprofloxacine entre 2001 et 2013

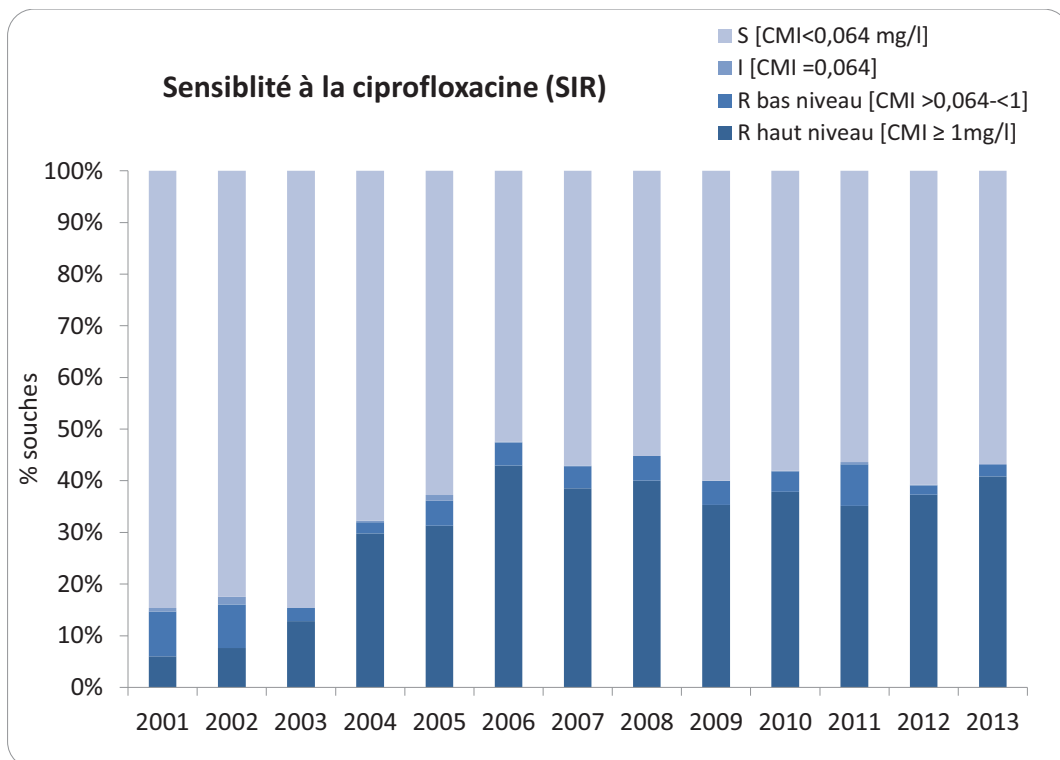


Figure 6: Evolution de la sensibilité à la ciprofloxacine entre 2001 et 2013



Alors que les résistances de bas niveau ( $0.064 < \text{CMI} < 1 \text{ mg/L}$ ) étaient initialement les plus fréquentes, la tendance s'est nettement inversée depuis 2003 et les résistances de haut niveau ( $\text{CMI} > 1 \text{ mg/L}$ ) restent, encore en 2013, nettement majoritaires (94,7% des résistances) (Figure 7).

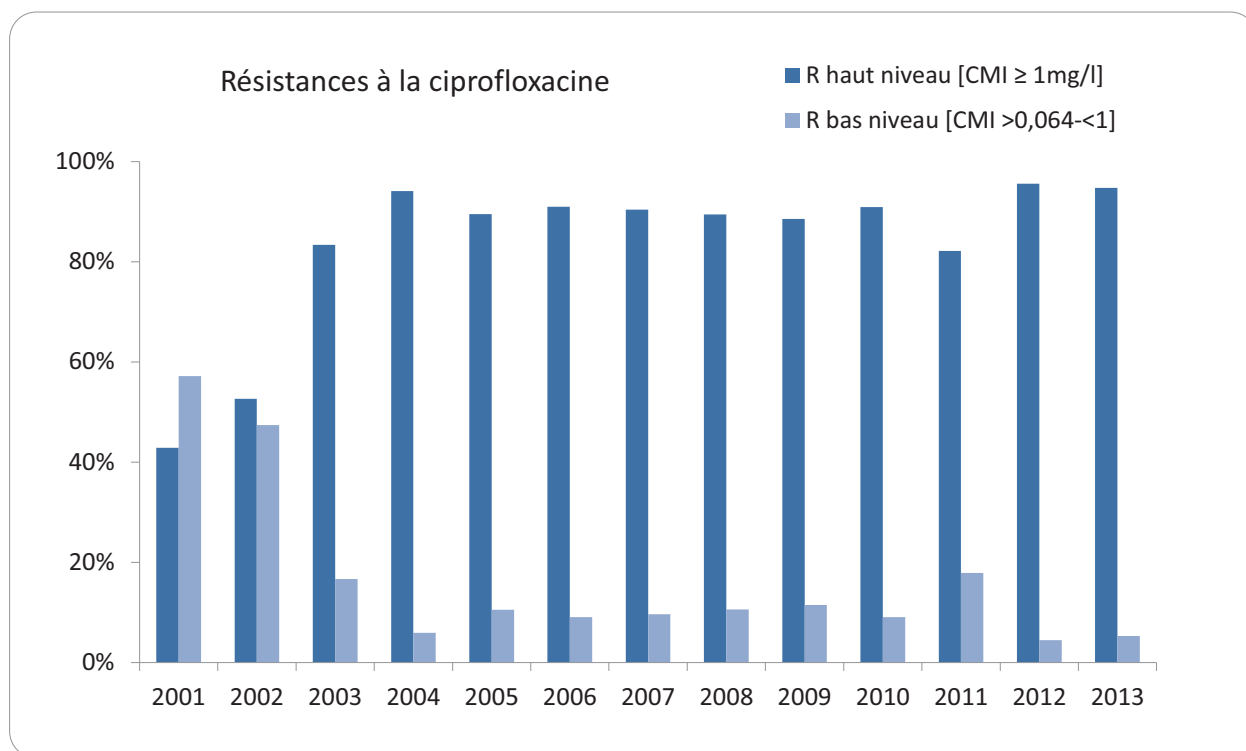


Figure 7: Evolution des résistances (bas niveau et haut niveau) de *N. gonorrhoeae* à la ciprofloxacine entre 2001 et 2013

### ➤ Evolution de la sensibilité aux céphalosporines : céfixime et ceftriaxone

En 2010, deux souches de gonocoque résistantes à la ceftriaxone ont été mises en évidence au CNRG, dont la première souche française décrite (2<sup>e</sup> mondiale) (Unemo et al. *AAC* 2012. Mar;56(3):1273-80).

Nous n'avons depuis isolé aucune souche présentant ce type de résistance. Cependant, il faut noter que les CMI du gonocoque vis-à-vis des C3G, et surtout du céfixime, ont progressivement augmenté entre 2008 et 2012. La proportion de souches dont la CMI au céfixime était supérieure à 0.125 mg/L est ainsi passé de 0.12% en 2008 à plus de 3% en 2012 avec une importante progression entre 2011 et 2012 (de 0,6% à 3% des souches). Pour l'année 2013, on observe en revanche une diminution de la proportion de ces souches, qui passent à 1,68% des souches testées (Figures 8 et 9).

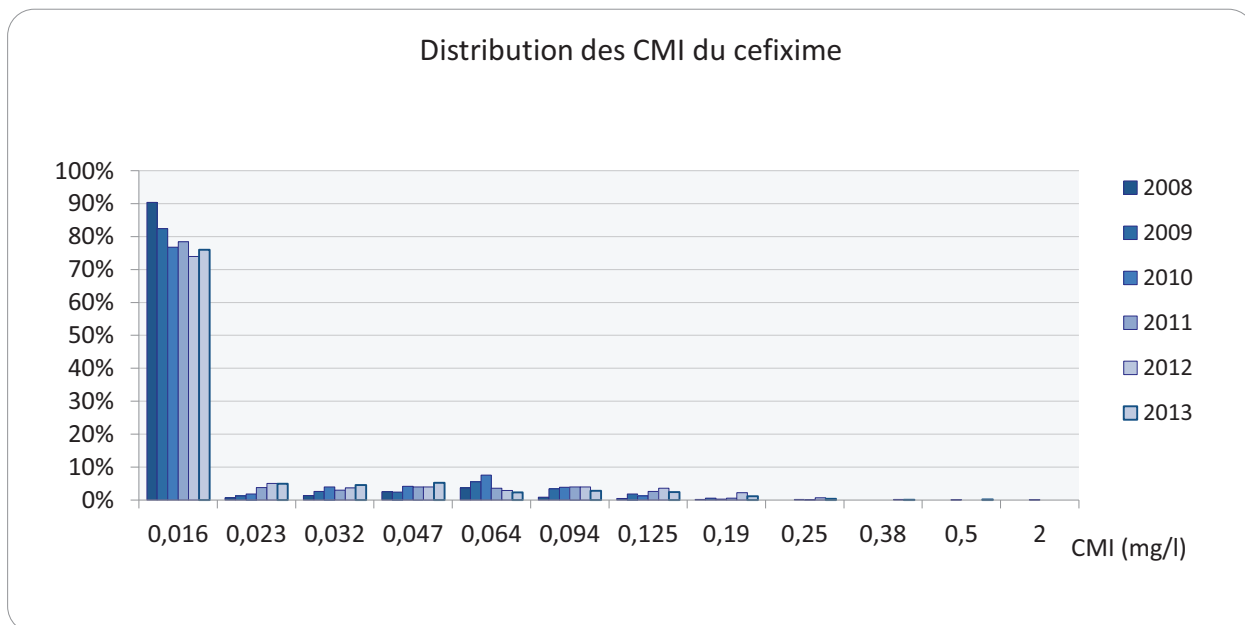


Figure 8: Evolution de la distribution des CMI du céfixime entre 2008 et 2013

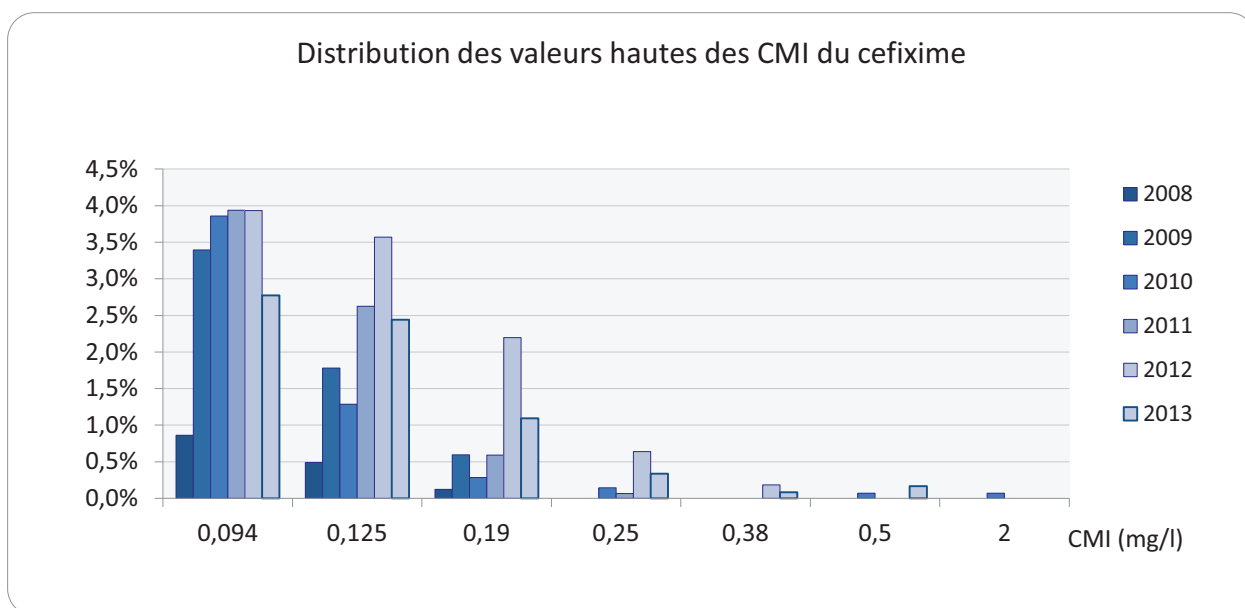


Figure 9: Focus sur l'évolution de la distribution des valeurs hautes des CMI du céfixime entre 2008 et 2013

Concernant la ceftriaxone, la majorité des souches présente des CMI très basses (proches de 0,002 mg/l). La proportion de souches présentant des valeurs de CMI  $\geq 0.032$  mg/l a notablement augmenté entre 2001 et 2010, passant progressivement de 2 à 10% des souches. Depuis 2010, leur proportion est en légère diminution (7,28% en 2011, 8,14% en 2012 et 5,8% en 2013) (Figure 10).

Même si l'augmentation progressive des CMI aux C3G semble s'être stabilisée, le contexte global d'émergence de résistances, tant chez le gonocoque que chez les autres espèces bactériennes, nous incite à rester très vigilants et à suivre de très près l'évolution de la sensibilité de *N. gonorrhoeae* aux céphalosporines.

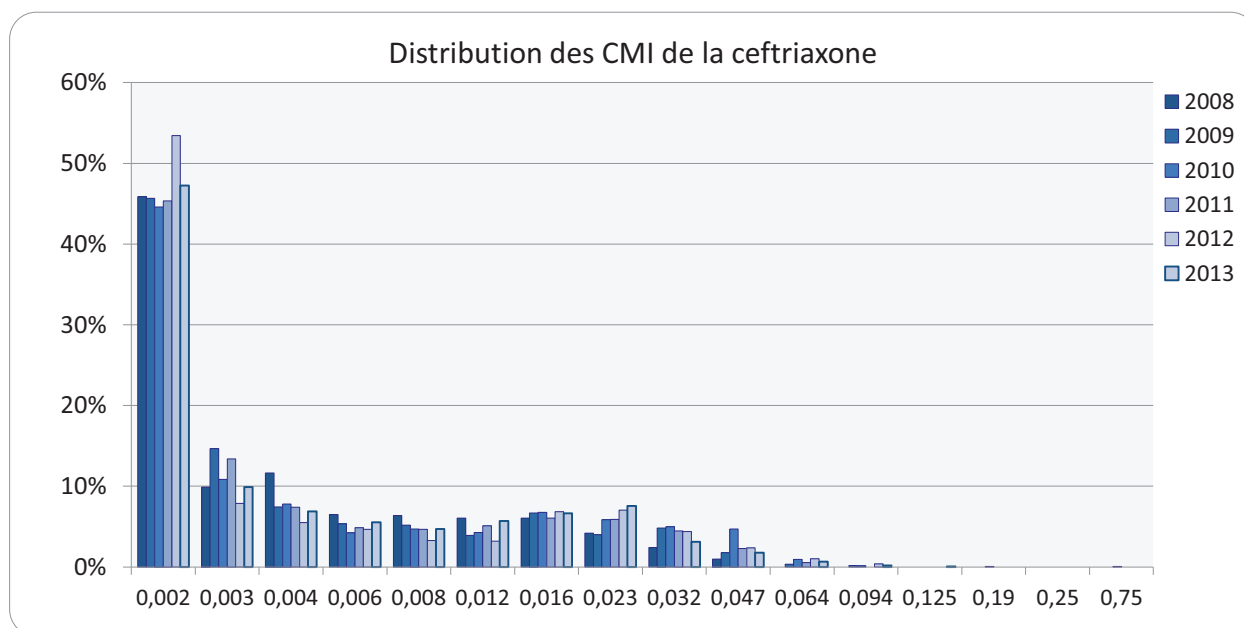


Figure 10: Evolution de la distribution des CMI de la ceftriaxone entre 2008 et 2012

### III.3. Participation aux réseaux de surveillance

Au niveau national, la surveillance repose sur l'ensemble des professionnels de santé qui ont à gérer des infections gonococciques. En cas d'identification d'évènement inhabituel, ils se doivent de contacter les membres du CNRG ou de l'InVS. Des contacts fréquents, par téléphone, courrier et surtout messagerie électronique sont établis entre l'équipe du CNR des gonocoques et l'équipe en charge des IST à l'InVS (Dr G. La Ruche, Dr F. Lot, B. Basselier et autres collaborateurs) qui prennent conjointement les décisions adéquates pour gérer ces évènements.

Depuis 2003, le CNRG participe activement au réseau de surveillance épidémiologique européen des IST. Ce réseau est actuellement sous la responsabilité de l'ECDC (depuis 2009) et collecte les données de 30 pays de l'Union Européenne et de l'espace économique européen.

Le réseau européen repose sur la déclaration volontaire des cas de gonococcies (définis par des critères microbiologiques et cliniques) et la transmission informatisée des données. Il permet ainsi de comparer les différents systèmes de surveillance épidémiologique des IST des pays membres et d'obtenir une vision globale de l'évolution de l'infection au niveau européen. Il possède également un système de veille et d'alerte au niveau européen.

La plupart des laboratoires de ce réseau participent à un contrôle de qualité biennuel d'évaluation de la sensibilité du gonocoque aux antibiotiques pour s'assurer de la qualité des données transmises.

Afin de suivre l'évolution des résistances de *N. gonorrhoeae* aux antibiotiques au niveau européen, les laboratoires participant testent chaque année deux panels de 55 souches consécutives. Dans le cadre de cette étude multicentrique, les CMI des souches sont déterminées pour 8 antibiotiques (pénicilline, tétracycline, céfixime, ceftriaxone, ciprofloxacine, spectinomycine, azithromycine et gentamicine). Les valeurs de CMI et les données épidémiologiques correspondant à chaque souche sont transmises à l'ECDC via TESSy (The European Surveillance System), la base de données qui centralise les informations.

Chaque année, les membres du réseau se réunissent pour faire le point sur les études en cours, suivre les éventuelles alertes émises et planifier de nouveaux projets. En 2013, le Dr P. Sednaoui

a ainsi participé à la réunion annuelle qui a eu lieu le 2 décembre 2013 à Stockholm, sous la présidence de M. Cole et C. Ison (Euro-GASP Co-ordination meeting). Ce colloque avait pour but de planifier les activités et les objectifs de la surveillance européenne pour les années 2014 à 2017. Les thèmes de discussion ont notamment été : les choix d'antibiotiques à tester et les breakpoints à utiliser, le développement de la technique NG-MAST dans l'ensemble des pays, les informations épidémiologiques à collecter dans le système TESSy.

### ***III.4. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance***

En 2013, le CNRG a uniquement participé aux études multicentriques de l'ECDC précédemment décrites.

## **IV. ALERTE**

---

### ***IV.1. Procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS***

Les conditions d'alerte ont été définies en accord avec l'InVS et concernent les cas suivants :

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

Si un de ces cas est identifié ou adressé au CNR, l'InVS est informé dans les plus brefs délais par mail ou par téléphone. Les interlocuteurs privilégiés sont le Dr Guy LA RUCHE et Mme Betty BASSELIER.

Par ailleurs, les différents acteurs du CNRG se réunissent régulièrement (assemblée générale, réunions de recherche, journées IST,...) et dressent le bilan de l'évolution de la pathologie et des résistances du germe.

Le rapport annuel consigne et fait le bilan de toutes les alertes si elles existent.

### ***IV.2. Signalements et/ou alertes de l'année 2013***

Aucun signalement et/ou d'alerte n'a été adressé à l'InVS concernant des souches de gonocoque particulières ou des infections inhabituelles.

Aucune souche résistante à haut niveau n'a été isolée en 2013.

L'augmentation du nombre de cas de gonococcies est suivie de près par le CNRG et l'InVS mais cette recrudescence reste générale et progressive et aucune épidémie localisée n'a été détectée.

### ***IV.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux***

Le CNRG a pour mission de détecter et de signaler tout événement inhabituel. Pour les suspicions de cas groupés, le CNRG est en mesure de génotyper les souches et de les comparer entre elles. Si des formes cliniques inhabituelles ou des résistances nouvelles aux antibiotiques apparaissent, le CNRG peut réaliser des études génomiques plus complètes.

Le CNRG peut également être sollicité par la Police ou la Gendarmerie pour des études de cas touchant des enfants. Au besoin, il peut effectuer la recherche de gonococcies dans l'entourage

des mineurs et réaliser l'étude phénotypique, voire génotypique, des souches afin de les comparer.

En 2013, le CNR n'a pas eu à faire face à une épidémie ou à l'émergence d'un clone résistant aux antibiotiques.

#### ***IV.4. Analyse des tendances et du fonctionnement du système***

La communication avec l'InVS (Dr Guy LA RUCHE et Betty BASSELIER) et avec les laboratoires du réseau fonctionne très bien, que ce soit par échanges téléphoniques ou électroniques.

Les laboratoires coordonnateur et associés ont commencé à travailler conjointement en 2012 et cette collaboration a permis de développer les compétences et les activités du CNRG. Le système mis en place pour la transmission des données, le transport des souches et les échanges entre les différents acteurs des projets est actuellement efficace mais nécessite encore des optimisations, notamment en terme de traçabilité des souches sorties de la collection, qui font partie de nos axes d'amélioration et de politique qualité.

## **V. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, DE CONSEIL**

---

### ***V.1. Enseignements, formations, accueil de stagiaires***

#### **Enseignements et formations aux professionnels de santé**

##### **➤ Enseignement**

- B. Bercot. Séminaire de Bactériologie aux étudiants du DES de Biologie Médicale. Faculté de Médecine, Université Paris V (2 h/an). Cours sur les MSTs et infections à gonocoques (mai 2013 et novembre 2013)
- B. Bercot. Cours Pasteur Bactériologie Médicale « Neisseria gonorrhoeae » (mai 2013) (2h/an)
- B. Bercot. Cours à l'École des laboratoires IFTAB de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. « Infections à Chlamydiae et gonocoque » (2h/an) (janvier 2013)
- B. Bercot. Séminaire du DES de Dermatologie d'Ile de France « Flore génitale normale et pathologique, gonocoque » (novembre 2013) (20 mn)

##### **➤ Formation médicale initiale et continue**

- E. Cambau & B. Bercot : formation continue quotidienne des internes de Bactériologie au sein du laboratoire de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Vidal.
- P. Sednaoui et A. Goubard : Enseignement Post Universitaire organisé par le laboratoire Biomnis (Site Centre d'Exploration Fonctionnelle) : Actualités sur les IST. (19 juin 2013)
- P. Sednaoui: Enseignement Post Universitaire organisé par le centre hospitalier des Diaconesses. Diagnostic des IST ano-rectales. (17 avril 2013)

## Accueil de stagiaires

### ➤ Laboratoire coordonnateur

#### - ETUDIANTS EN BTS TECHNICIEN DE LABORATOIRE

- Mélanie EISENBERG Mélanie. Stage de première année de BTS (Ecole Pirandello)
- Marion ROULET. Stage de première année de BTS (Ecole ESTBA)
- Maxime PETIT. Stage de première année de BTS (Ecole ESTBA)
- Alexis GADAULT. Stage de première année de BTS (Ecole ESTBA)
- Noémie AMELINE. Stage de deuxième année de BTS (Ecole ENCPB)
- Lucile PANNIER. Stage de deuxième année de BTS (Ecole ESTBA)
- Kamila MEZOUANI. Stage de deuxième année de BTS (Ecole ESTBA)
- Elodie VIERA. Stage de deuxième année de BTS (Lycée Maximilien SORRE)

Dans le cadre de leur formation théorique et pratique, les étudiants apprennent les techniques de microbiologie classique. Ils participent à la prise en charge des prélèvements à visée diagnostique et réalisent les antibiogrammes de gonocoques sous la tutelle des techniciens expérimentés et des biologistes.

### ➤ Laboratoire associé

#### - ETUDIANTS EN MASTER 2 RECHERCHE :

- Maité MICAELO : Master M2 de Microbiologie, Ecologie Microbienne, Pathogénie des Microorganismes, Université Paris XI, Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Châtenay Malabry/ Université Paris XI. « Exploration de la résistance plasmidique aux bêta-lactamines chez *Neisseria gonorrhoeae* » soutenue en juin 2013 (Mention Bien).

- Dorothee GUERET : Master M2 de Microbiologie, Ecologie Microbienne, Pathogénie des Microorganismes, Université Paris XI, Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Châtenay Malabry soutenu en juin 2013: « Epidémiologie moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones chez *Neisseria gonorrhoeae* en France »

#### - ETUDIANTS EN THESE D'EXERCICE

- Maud GITS-MUSELLI : Mémoire de DES de Biologie et Thèse de Médecine soutenue le 24 septembre 2013 (Mention très honorable, félicitations du jury) à la Faculté de Médecine de Bichat-Saint Louis-Lariboisière, Paris VII intitulé « Infections génitales à *Neisseria gonorrhoeae* : intérêt de la technique de typage moléculaire NG-MAST pour différencier rechute et réinfection. »

- Dorothee GUERET : Mémoire de DES de Biologie et Thèse de Médecine soutenue le 8 juin 2013, à la Faculté de Médecine de Bichat-Saint Louis-Lariboisière, Paris VII. « Epidémiologie moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones chez *Neisseria gonorrhoeae* en France »

- ETUDIANT EN MASTER 1

- Laureen ANKRI. Étudiante en 2ème année à SupBiotech (Paris) Ecole en Biotechnologies  
Analyse des gènes penA dans une collection de souches de sensibilité diminuée au C3G

## ***V.2. Guides élaborés***

Les dernières recommandations de l'HAS étant très récentes, aucune modification n'a été apportée en 2013 et le CNRG n'a pas participé à l'élaboration de guide pour la prise en charge des gonococcies durant cette année.

## ***V.3. Modalités de diffusion des données***

Les souches de gonocoque reçues au CNRG sont enregistrées dans le logiciel de gestion du laboratoire coordonnateur sous un code intégrant l'identifiant du laboratoire transmetteur et le numéro de la souche. Les résultats obtenus sont enregistrés dans le système de lecture et d'expertise des antibiogrammes (SIRscan®) puis transférés dans le logiciel de gestion des analyses du laboratoire.

Les comptes-rendus de résultats sont édités en double exemplaire pour chaque souche: une copie pour le laboratoire transmetteur et une copie pour l'InVS. Sur ce compte rendu apparaissent :

- L'entête du CNRG (Laboratoire de l'Institut Alfred Fournier)
- Le code de la souche (délivré par l'InVS)
- Les coordonnées du laboratoire transmetteur et de l'InVS
- Le numéro du dossier CNRG
- La date de réception
- La durée du transport
- La date d'édition
- Le nom et la signature d'un biologiste du laboratoire.

Ces compte-rendus papier, résumant les caractéristiques de la souche et leur interprétation, sont adressés rapidement (délai inférieur à une semaine après réception) au laboratoire transmetteur et à l'InVS. Parallèlement, le compte rendu d'analyse est envoyé par télécopie au laboratoire transmetteur pour réduire le délai d'obtention des résultats.

## **Le site internet**

Les informations concernant le CNRG et ses activités sont disponibles sur le site internet de l'Institut Alfred Fournier (<http://www.institutfournier.org>), en cliquant sur l'onglet CNR des gonocoques de la page d'accueil ou en tapant le mot clef CNR dans la rubrique recherche. (<http://www.institutfournier.org/articlesprevention/60-preventionarticle1/57-cnr-gonocoques>).

Le site est construit sur une page unique sur laquelle sont repris les items suivants :

- Accueil-Présentation
- Missions du CNR
- Modalités d'envoi des souches
- Publications
- contacts
- Liens utiles

Les différentes missions du CNRG ainsi que les conditions d'envoi des souches pour expertise sont détaillées et les fiches d'envoi des souches, principalement utilisées par les laboratoires du

réseau Rénago, sont accessibles en ligne. Les numéros de téléphones ainsi que les adresses mails des différents membres du CNRG sont répertoriés.

Les rapports d'activités du CNRG sont également disponibles (date du dernier rapport mis en ligne : rapport d'activité 2012)

Le site a été mis à jour le 20 mars 2014. Il est prévu de faire une actualisation a minima annuelle, mais le rythme des actualisations pourra être modifié dans le cas où des informations urgentes devraient être portées à la connaissance du public et des professionnels de santé (épidémie importante dans une population donnée, modification des recommandations, changement de modalité d'envoi des souches,...)

#### ***V.4. Activité de conseil aux professionnels***

Le CNRG répond à toutes les demandes d'informations concernant le diagnostic et/ou le traitement des infections gonococciques, émanant de biologistes ou de médecins. Au laboratoire coordonnateur, un biologiste est de permanence tous les jours de 8h30 à 19h et le samedi de 8h30 à 13h. Les biologistes sont également joignables par messagerie électronique.

#### ***V.5. Liste des activités d'expertise***

- Diagnostic des infections à *N. gonorrhoeae*
- Evaluation de la sensibilité des souches aux antibiotiques
- Recueil et expertise des données microbiologiques et épidémiologiques des infections gonococciques en collaboration avec l'InVS
- Evaluation des techniques en développement pour l'identification des souches et des mécanismes de résistance (outils moléculaires, spectrométrie de masse)
- Evaluation de milieux de transport ou de kits de dépistage/diagnostic
- Formation des professionnels de santé sur la prise en charge des patients (diagnostic et/ou traitement)
- Conseil auprès des autorités (sanitaires, judiciaires)

## **VI. TRAVAUX DE RECHERCHE DU CNR**

---

### ***VI.1. Activités de recherche***

Au cours de l'année 2013, trois thématiques majeures ont fait l'objet de travaux de recherche au sein du laboratoire associé du CNR des gonocoques :

- résistance plasmidique aux bêta-lactamines
- résistance aux fluoroquinolones
- typage moléculaire par NG-MAST

Ces travaux ont été réalisés sur les souches de gonocoques issues de la collection hébergée par le CNRG à l'institut Alfred Fournier. Ils ont fait l'objet de communications et sont en voie de publication.



## **TRAVAIL N°1**

### **EXPLORATION DE LA RESISTANCE PLASMIDIQUE AUX BETA\_LACTAMINES CHEZ *N. GONORRHOEAE***

Ce travail a été mené au cours du Master 2 recherche de M. Micaëlo.

Dans un contexte où les infections à *N. gonorrhoeae* (NG) sont en recrudescence avec une émergence mondiale de souches résistantes, en particulier aux  $\beta$ -lactamines, l'étude de la résistance plasmidique aux  $\beta$ -lactamines est une première étape dans l'étude du résistome des souches de gonocoque.

Les résistances acquises aux  $\beta$ -lactamines chez NG sont de 3 types, soit des résistances par mutations chromosomiques entraînant une modification de la cible des  $\beta$ -lactamines que sont les PLP (protéines liant la pénicilline), soit des modifications de la perméabilité, soit un mécanisme enzymatique par hydrolyse de la  $\beta$ -lactamine (9% des souches en 2012 en France). La résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines est due à la production d'une  $\beta$ -lactamase de classe A de type TEM-1. En 2010, en Asie, au Japon et en Thaïlande, il a été décrit l'émergence de la  $\beta$ -lactamase TEM-135 pour la première fois dans des souches de gonocoques. Cette TEM-135 qui porte la mutation M182T confère le même profil de résistance aux  $\beta$ -lactamines que TEM-1.

Les gènes *bla*<sub>TEM</sub> des  $\beta$ -lactamases peuvent être trouvés sur différents plasmides chez NG. Les souches productrices de  $\beta$ -lactamases, isolées pour la première fois aux Etats-Unis en 1976, possédaient un plasmide qui fut appelé Asian plasmide (ou pJD4). Il a été décrit que ce plasmide Asian (7,4 Kb) serait l'ancêtre commun de tous les autres plasmides qui en sont dérivés, soient les plasmides African (5.5 Kb), Toronto/ Rio (5.2 Kb), New Zealand (9.3 Kb), Nîmes (6.8 Kb) et Johannesburg (4.9 Kb). En effet, ces derniers comportent des zones de délétions ou d'insertions par rapport au plasmide Asian. L'ensemble de ces petits plasmides (<10 Kb) portant *bla*<sub>TEM</sub> sont non conjugatifs et utilisent des plasmides conjugatifs de plus grande taille pour pouvoir diffuser.

### **Objectif**

Aucune étude n'a été faite jusqu'à présent sur l'épidémiologie moléculaire de la résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines chez les souches de NG isolées en France. L'objectif de notre étude était de caractériser les gènes *bla*<sub>TEM</sub> des  $\beta$ -lactamases, leur support plasmidique et d'étudier la clonalité des souches d'intérêt.

### **Matériel et méthodes**

Notre étude a porté sur 177 souches de NG isolées en France entre décembre 2010 et octobre 2012 (5 en 2010, 127 en 2011 et 45 en 2012) et reçues au centre national de référence des gonocoques (CNR). Ces souches étaient toutes productrices de  $\beta$ -lactamase (test à la céfinase positif). La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par Etest® a été réalisée par le CNR selon la technique recommandée par le Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie.

L'étude des gènes *bla*<sub>TEM</sub> (860 pb) a été effectuée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces OT3 et OT4, décrit dans la littérature. Le séquençage a été réalisé à l'aide de deux amorces sens (OT3 et OT1) et deux amorces anti-sens (OT2 et OT4) afin d'obtenir la totalité du gène *bla*<sub>TEM</sub>.

Les plasmides de petite taille (<10 Kb) décrits dans la littérature comme portant le gène *bla*<sub>TEM</sub> ont été extraits grâce au kit Qiagen® et séquencés selon le principe de la PCR-mapping.

Le génotypage des souches a été réalisé par la technique de référence NG-Multiantigen Sequence Typing (NG-MAST) qui repose sur l'amplification et le séquençage de fragments internes de deux gènes *tbpB* et *porB* codant des protéines de la membrane externe. En vue du génotypage des souches d'intérêt par technique NG-MAST, les gènes *porB* et *tbpB* ont été amplifiés à partir de l'ADN bactérien des différents isolats de NG. Le génotype de chaque souche a été obtenu à partir du blast des séquences sur le site [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net).

### **Résultats**

Les 177 souches étudiées étaient résistantes à la pénicilline G (test à la céfinase positif) mais aucune n'était résistante aux céphalosporines de troisième génération (C3G : céfixime et ceftriaxone).

Les séquences du gène *bla*<sub>TEM</sub> des 177 souches étudiées ont été comparées à une séquence de référence du gène *bla*<sub>TEM</sub> (numéro GenBank AAB40517.1) codant pour une  $\beta$ -lactamase de type TEM-1B décrite sur un plasmide pJD4 de NG (numéro GenBank U20374.1).

L'analyse des séquences protéiques des 177 enzymes TEM retrouve 152 TEM-1 (86%), 14 TEM-135 (8%) et 11 nouveaux variants de TEM-1 (6%). Les nouveaux variants comportaient une nouvelle mutation soit en position 14 dans le peptide signal (8 souches), soit en position 228 (2 souches) soit en position 269 (1 souche) (Tableau).

Les plasmides ont été analysés pour 23 isolats parmi les 177 étudiés (14 TEM-135, 5 nouveaux variants de TEM-1 et 4 TEM-1 prises comme témoins). Dans notre étude, les plasmides portant le gène *bla*<sub>TEM</sub> sont de 3 tailles différentes, soit 5,2 Kb, soit 5,5 Kb, soit 7,4 Kb. Après résultat du séquençage des plasmides, trois différents types de plasmides ont été observés : (i) les plasmides codant une  $\beta$ -lactamase TEM-1 ou une autre TEM mutée (en P14S, P14L, Q269K, ou G228S) sont de type African de 5,5 Kb, (ii) les plasmides codant une  $\beta$ -lactamase TEM-135 étaient soit un plasmide de type Toronto/ Rio de 5.2 Kb, soit un plasmide de type Asian de 7.4 Kb (Tableau).

Afin de savoir si ces 23 isolats, étudiés pour le support plasmidique de TEM, étaient issus d'un même clone, le génotypage de ces isolats a été réalisé par NG-MAST. Très peu de souches présentaient des ST (sequence types) identiques et au total, il existait 19 clusters différents sur les 23 isolats testés. En ce qui concerne les 14 souches portant la  $\beta$ -lactamase TEM-135, celles-ci appartenaient à 11 clusters différents. Les deux souches présentant la mutation P14S avaient toutes les deux le même ST (5268). Les 4 souches, prises comme témoins ayant une  $\beta$ -lactamase de type TEM-1, appartenaient toutes à des ST différents entre elles et différents des autres souches étudiées (Tableau).

**Tableau : Synthèse des résultats des gènes *bla*<sub>TEM</sub>, du plasmide portant *bla*<sub>TEM</sub> et des ST des 23 souches étudiées**

Souches de NG	Allèle TEM	Plasmide portant <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (taille en Kb)		NG-MAST ST
S3				ST ND-A
S19				ST 5060
S51		5.2	Type Toronto/ Rio	ST 5624
S93				ST 758
S188				ST 1737-like
S27	TEM-135	5.5	ND	ST 1292
S111				ST 4995
S113				ST 4995
S36				ST 2485
S63				ST 3873
S104		7.4	Type Asian	ST ND-B
S182				ST ND-B
S119				ST ND-C
S20				ST ND-C
S18	TEM P14S			ST 5268
S49				ST 5268
S54	TEM Q269K			ST 3109
S172	TEM G228S			ST ND-D
S177	TEM P14L	5.5	Type African	ST 4915-like
S2				ST 5526-like
S4	TEM-1			ST 3307
S11				ST ND-E
S1				ST 1288

NG, *Neisseria gonorrhoeae* ; *bla*<sub>TEM</sub>, gène codant la  $\beta$ -lactamase TEM ; ST, Sequence Type ; NG-MAST, *Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence type, technique de génotypage de référence pour NG ; ND, non déterminé.

### **Discussion**

Dans notre étude, conformément à ce qui est décrit dans la littérature concernant les  $\beta$ -lactamases de NG, TEM-1 est la plus fréquemment retrouvée. Cependant, 25 TEM sur les 177 étudiées possèdent des mutations protéiques qui diffèrent par rapport à TEM-1. Huit souches ont une mutation dans le peptide signal au niveau de l'acide aminé situé en position 14 (7 de type P14S et une de type P14L) jamais décrite à ce jour chez NG. Il a été décrit que des mutations dans le peptide signal pourraient augmenter la sécrétion de la  $\beta$ -lactamase. Notre étude rapporte également que 8% des isolats français sont producteurs de la  $\beta$ -lactamase TEM-135 qui correspond à une TEM-1 dont l'acide aminé situé en position 182 a été modifié (M182T). Seules

des  $\beta$ -lactamases de type TEM-1 avaient été décrites chez NG mais en 2010 deux études asiatiques ont rapporté l'existence de  $\beta$ -lactamases de type TEM-135 chez le gonocoque. La mutation M182T ne confère aucune augmentation des CMI aux  $\beta$ -lactamines. Cependant, elle est fréquemment rapportée en association avec d'autres mutations de TEM chez des souches d'entérobactéries codant une  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE). Il est à noter qu'aucune BLSE n'a encore été décrite chez NG.

Contrairement aux souches de sensibilité diminuée aux C3G qui appartiennent de façon prépondérante à un même ST (ST 1407) en Europe, les souches produisant la  $\beta$ -lactamase TEM-135 ne sont apparemment pas clonales car elles appartiennent, sauf pour deux d'entre elles, à des ST différents. Il semblerait qu'il n'y ait pas de propagation de ces souches car les TEM-135 décrites en Asie sont trouvées dans des souches de ST différents de nos souches françaises. Ceci pourrait suggérer que la mutation M182T pourrait être une mutation apparue *de novo* dans TEM-1 sous la pression de sélection des  $\beta$ -lactamines. Par contre, si les  $\beta$ -lactamases de type TEM-135 sont effectivement apparues sous la pression de sélection des  $\beta$ -lactamines, on peut se demander pourquoi ce phénomène est si récent chez NG, les premières descriptions ne datant que de 2010.

Alors que la ceftriaxone reste le traitement de référence en Europe pour la gonorrhée, on observe des modifications récentes de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 située sur les plasmides de NG ainsi que l'émergence de souches résistantes aux C3G par mutations chromosomiques depuis 2009. Dans ce cadre, il reste plus que jamais nécessaire d'étudier et de surveiller les mécanismes de cette résistance aux antibiotiques afin d'adapter au mieux les recommandations thérapeutiques et de diminuer ainsi le risque de diffusion des souches résistantes.

## **TRAVAIL N°2**

### **EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA RESISTANCE AUX QUINOLONES CHEZ *NEISSERIA GONORRHOEAE***

Ce travail a été mené au cours du Master 2 recherche et de la thèse de doctorat en médecine de D. Gueret.

Les gonococcies sont des pathologies très anciennes mais demeurent toujours un important problème de santé clinique et publique en France et dans le monde. La problématique actuelle des infections à gonocoque se décline en trois grands points : cette pathologie est en recrudescence, les résistances augmentent et on assiste à un changement des méthodes de diagnostic faisant craindre un jour de ne plus disposer de souches de gonocoque mais seulement de son ADN.

Sur le plan microbiologique, le gonocoque est un germe exigeant et fragile, sa culture et on isolement peuvent s'avérer difficiles. Ces dernières années se sont développées des techniques de diagnostic par biologie moléculaires : les Techniques d'Amplification des Acides Nucléiques (TAAN). Ces techniques sont globalement plus sensibles que la culture. Par contre ces trousseaux ne permettent pas de détecter la sensibilité ou résistance aux antibiotiques.

Or, sur le plan épidémiologique on assiste en France et partout dans le monde à l'émergence et à la diffusion de souches de gonocoque multirésistantes faisant craindre un jour de ne plus avoir de traitement probabiliste pour le gonococcies répondant au critère de l'OMS de moins de cinq pourcents de résistance. Le suivi de la résistance aux antibiotiques et la compréhension des mécanismes de résistances semble plus qu'indispensable pour envisager les traitements de demain.

En France, la résistance aux quinolones s'est développée ces 15 dernières années et a rendu impossible leur utilisation de manière probabiliste. La description des mécanismes moléculaires de résistance aux quinolones chez *N. gonorrhoeae* a été rapportée dans la littérature dans différent pays, mais il n'existait pas de données Françaises.

### **Objectif**

A travers ce travail nous avons voulu dans premier étudier les caractéristiques génotypiques de la résistance aux fluoroquinolones chez des souches de *N. gonorrhoeae* isolées en France. Dans un deuxième temps notre travail a été de développer des techniques de détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones directement à partir de l'ADN du gonocoque contenu dans les prélèvements cliniques sans nécessité de cultiver la souche.

### **Matériel et méthodes**

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur 85 souches bactériennes d'isolats cliniques de l'année 2011 issues de la collection du CNR, présentant une CMI de la ceftriaxone >0,023mg/L. Puis, nous avons analysé 20 souches aussi issues de la collection du CNR en 2011 mais présentant des CMI de la ciprofloxacine plus basses, proche du break point de 0,06 mg/L. Six souches avaient des CMI sensibles et 14 souches des CMI résistantes.

Par ailleurs, dans la seconde partie de notre étude, nous avons travaillé sur des prélèvements et des souches provenant de 20 patients ayant à la fois une culture positive à *N. gonorrhoeae* et une technique de TAAN positive Panther (Gen-Probe) ou *m2000* (Abbott). Les prélèvements cliniques pour les TAAN comprenaient : 10 premiers jets d'urine, 1 prélèvement urétral et 13 auto-prélèvements vaginaux.

Pour l'étude moléculaire des mécanismes de résistance aux quinolones, nous avons développé différentes techniques d'analyse des gènes d'intérêt dans la résistance aux quinolones. Nous avons développé une PCR d'amplification de la Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) de *gyrA* et de *parC* suivie d'une technique de séquençage rapide par pyroséquençage. Cette technique par pyroséquençage a pour principaux intérêts sa rapidité et son coût. Les gènes

*gyrB* et *parE* ont été analysés dans leur région de QRDR grâce au développement d'une PCR et d'un séquençage. La recherche du gène codant l'acétyltransférase (*aac(6')-Ib-cr*) a été réalisée par PCR classique. Les gènes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*) et les gènes *qepA* ont été recherchés par PCR en temps réel multiplex HRM (High Resolution Melt, courbe de fusion à haute résolution) à la Plate-forme Régionale de Biologie Innovante au CHU de Reims.

Le génotypage des souches a été réalisé par la technique de référence NG-MAST qui repose sur l'amplification et le séquençage des gènes *thpB* et *porB*. Le génotype de chaque souche a été obtenu à partir du blast des séquences sur le site [www.ng-mast.net](http://www.ng-mast.net).

Pour le développement des techniques de détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones directement à partir du prélèvement clinique nous avons optimisé les techniques de PCR et séquençage de *gyrA* et *parC* mises au point pour notre étude épidémiologique pour permettre leur fonctionnement sur l'ADN de gonocoque contenu dans les prélèvements cliniques.

## **Résultats**

Une des problématiques actuelles concernant le gonocoque est l'émergence de la résistance aux C3G, c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier des souches présentant une sensibilité diminuée aux C3G. D'après le résultat des CMI, toutes ces souches étaient aussi résistantes aux quinolones avec un haut niveau de résistance pour 81 d'entre elles (95,3%) CMI de la ciprofloxacine  $\geq 32$ mg/L, ce qui implique que les quinolones ne peuvent pas être une alternative thérapeutique dans ce cas. Ces résultats sont concordants avec les données actuelles de la littérature décrivant l'émergence de souches multi-résistantes de gonocoque.

Sur le plan moléculaire, dans *GyrA* et *ParC*, nous avons retrouvé des sites de mutations identiques à ceux décrits dans la littérature : au niveau de la sérine en position 91 (Ser91) et de l'acide aspartique en position 95 (Asp95) dans la protéine *GyrA* et au niveau de l'acide aspartique en 86 (Asp86), des deux sérines en 87 et 88 (Ser87, Ser88) et de l'acide glutamique en 91 (Asp91) dans *ParC*. Parmi les 85 souches de sensibilité diminuée aux C3G, 80% des souches avaient le même génotype avec les substitutions Ser91Phe et Asp95Gly dans *GyrA* et Ser87Arg dans *ParC*. Ce génotype est aussi le plus fréquemment décrit dans la littérature internationale. Par contre, 11,76% de ces souches présentaient un nouveau phénotype non décrit dans la littérature.

Peu d'études ont recherché des modifications dans les QRDR de *GyrB* et *ParE*. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de mutations dans les gènes *gyrB*. Dans *ParE*, nous avons retrouvé une mutation rare Pro439Ser (numérotation d'*E. coli*) dans 2 souches (CMI ciprofloxacine de 1,5 et 8 mg/L). Cette mutation avait été rapportée une fois dans la littérature par une autre équipe suédoise chez des souches isolées au Bangladesh. Cette mutation se trouve bien dans la zone de QRDR en comparaison à *E. coli* et à proximité de la mutation Leu445His décrite chez *E. coli*. Dans nos souches, cette mutation est associée à 2 autres mutations dans *GyrA* rendant impossible la mesure de l'impact de cette mutation dans *ParE* sur les CMI. Il faut cependant noter que pour l'une des souches portant cette mutation, la CMI de la ciprofloxacine (1,5mg/L) était identique à celle observée pour une autre souche portant les mêmes mutations dans *GyrA* sans la mutation dans *ParE*. Ainsi, nous pouvons penser que cette mutation a peu d'impact clinique, ce qui est concordant avec ce qui avait été rapporté dans la littérature par l'équipe de Lindback en 2002.

La recherche de gènes plasmidiques (*aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *qnr*) a été effectuée chez des souches présentant un haut niveau de résistance aux quinolones car, bien que ces gènes confèrent un bas niveau de résistance, chez les entérobactéries ils ont été le plus souvent décrits chez des souches multi-résistantes aux antibiotiques, en particulier présentant un haut niveau de résistance aux quinolones. Cette recherche est restée négative pour les 85 souches. Néanmoins la fréquence de ces gènes étant relativement faible, il faudrait probablement tester d'autres souches avant d'être formel sur leur absence.

Nous avons ensuite, appliqué la technique du NG-MAST pour nos souches de sensibilité diminuée au C3G, afin de caractériser leur appartenance à des complexes clonaux. Nous avons

retrouvé 16 ST type différents mais dont un prédominant le clone ST 1407 qui était présent chez 34% des souches. Ce clone a déjà été décrit dans la littérature à plusieurs reprises et diffuse actuellement en Europe. Il correspond à des souches avec une diminution de la sensibilité au céfixime, une augmentation des CMI de la ceftriaxone et de l'azithromycine et une résistance aux quinolones. Nous avons aussi individualisé un deuxième groupe, le clone 3168 qui était présent chez 8 souches. Il faut noter que ce clone avait seulement été décrit chez des souches isolées en Inde et il a été retrouvé chez les souches présentant le génotype Phe91 Asn95 dans GyrA et Arg87 Pro88.

L'augmentation du dépistage des infections à NG par biologie moléculaire fait craindre un jour de ne plus voir la souche de gonocoque mais seulement son ADN. Dans la littérature comme dans notre étude, le principal mécanisme de résistance aux quinolones étant l'acquisition de mutations dans les QRDR de GyrA et ParC, nous avons développé deux techniques de détection de la résistance aux quinolones directement à partir de l'ADN du gonocoque contenu dans des prélèvements cliniques par PCR-séquençage de ces zones. Pour cela nous avons optimisé nos PCR développées dans la revue épidémiologique pour qu'elles fonctionnent sur l'ADN du gonocoque contenu dans les prélèvements. Nous avons ensuite analysé les prélèvements des 20 patients présentant à la fois une culture positive à *N. gonorrhoeae* et un prélèvement positif en TAAN. Nous avons trouvé 10 séquences sauvages dans *gyrA* et *parC* à la fois à partir de l'extrait d'ADN du prélèvement et sur de l'ADN extrait de culture de *N. gonorrhoeae* chez les mêmes patients. Pour les 10 autres échantillons d'extrait d'ADN issu de prélèvement clinique, nous avons trouvé des mutations dans des positions similaires à celles retrouvées dans la littérature et chez les souches. Il s'agissait des substitutions en Ser91 et Asp95 de GyrA et Ser87 et Glu 91 de parC. Les résultats de séquence réalisée sur l'ADN extrait de culture ont montré les mêmes résultats.

Au total, nous avons retrouvé 100% d'homologie entre les séquences obtenues à partir de l'ADN issu des souches isolées en culture et les séquences obtenues à partir de l'ADN extrait du prélèvement clinique chez un même patient. De plus les CMI de la ciprofloxacine étaient concordantes avec les résultats génotypiques. Tous les patients avec des souches résistantes aux quinolones avaient des génotypes présentant des mutations dans *gyrA* et/ou *parC* et inversement toutes les souches avec des CMI de la ciprofloxacine sensibles ne présentaient pas de mutation ni dans la QRDR de *gyrA*, ni dans celle de *parC*.

Une fois le séquençage classique mis en place, nous avons testé le séquençage par pyroséquençage. Pour cela nous avons repris les conditions de pyroséquençage que nous avons développées pour les cultures, et nous les avons optimisées afin qu'elles donnent de bons résultats avec de l'ADN extrait de prélèvements cliniques. La technique a été testée sur 4 souches et a rapporté des résultats tout à fait satisfaisants.

### **Discussion/ Conclusion**

Comme il a déjà été montré dans d'autres pays, à travers ce travail nous pouvons dire que le principal mécanisme de résistance aux quinolones chez les souches de gonocoque françaises repose sur l'acquisition de mutations dans les QRDR des gènes *gyrA* et *parC*. Les souches françaises de *N. gonorrhoeae* résistantes aux quinolones présentent les mêmes sites de mutation. Ce mécanisme est connu pour être un processus graduel avec un impact graduel sur le niveau de résistance<sup>1</sup>. Nous faisons la même constatation dans notre étude, pour la majorité des souches, on observe une progression linéaire entre le nombre de mutations et l'augmentation des CMI. Si on considère la totalité des souches étudiées, on observe que toutes les souches résistantes présentaient au moins une mutation au sein de la QRDR de GyrA et/ou ParC et, *a contrario*, aucune souche sensible n'y présentait de mutation. La mutation dans le codon Ser91 de la protéine GyrA semble être la première étape nécessaire dans l'évolution vers la résistance. Les mutations dans ParC arrivent dans un second temps. Les hauts niveaux de résistance semblent s'expliquer par l'acquisition de plusieurs mutations dans les gènes *gyrA* et *parC* entraînant des substitutions d'acides aminés avec comme points clefs Ser91 et Asp95 dans GyrA associés à

Ser87 dans ParC. Cela est en concordance avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature. Cependant, Il faut noter que certaines souches présentant des CMI élevée sans mutation dans ParC et d'autre part, certaines souches présentaient des CMI de la ciprofloxacine différentes malgré des génotypes similaires dans les QRDRs des gènes *gyrA* et *parC*. Ces phénomènes ne s'expliquent ni par l'apparition de mutations dans les QRDRs des gènes *gyrB* ou *parE*, ni par l'acquisition de gène plasmidique de résistance, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance non étudiés ici comme une surexpression d'un système d'efflux ou une diminution de la perméabilité.

Au vu de la répartition des ST Type du NG-MAST, nous pouvons penser qu'il existe 2 mécanismes d'émergence de la résistance aux quinolones : un premier mécanisme par diffusion clonale de souches résistantes et un second par sélection de mutants sous traitement.

Par ailleurs, dans ce travail nous avons développé deux techniques d'étude des QRDR de GyrA et ParC directement à partir de l'ADN du gonocoque contenu dans les prélèvements cliniques : par PCR séquençage classique par Sanger et PCR pyroséquençage. Ces deux méthodes se sont montrées fiables, nous avons retrouvé une concordance de 100% entre le séquençage à partir de l'ADN contenu dans le prélèvement clinique et celui obtenu à partir de l'ADN de la souche isolée d'un autre prélèvement chez le même patient. L'apparition de mutation dans *gyrA* et *parC* étant le principal mécanisme de résistance aux quinolones nous pouvons dire que ces techniques permettent d'évaluer la sensibilité aux quinolones de manière génotypique. Ces méthodes sont un gain de temps car elles ne nécessitent pas le délai de culture de la souche et de réalisation de l'antibiogramme. Un autre point intéressant est qu'elles peuvent être réalisées sur tous les types de prélèvements génito-urinaires : prélèvement urétral, premier jet d'urine, auto-prélèvement vaginal. Nous ne suggérons pas que ces techniques puissent remplacer la culture et la réalisation de l'antibiogramme de *N. gonorrhoeae* chez les patients ayant une suspicion de gonorrhée, mais elles peuvent être utiles en cas d'impossibilité d'isoler la souche, surtout dans des contextes de dépistages comme au CDAG ou pour les laboratoires qui utilisent uniquement des méthodes moléculaires pour la détection des gonocoques.



### **TRAVAIL N°3**

#### **INFECTIONS GENITALES A *NEISSERIA GONORRHOEAE* : INTERET DE LA TECHNIQUE DE TYPAGE MOLECULAIRE NG-MAST POUR DIFFERENTIER RECHUTE ET REINFECTION.**

Ce travail a été mené au cours de la thèse de doctorat en médecine de M. Gits-Muselli

L'incidence des infections sexuellement transmissibles à *Neisseria gonorrhoeae* (NG) est en augmentation avec une estimation mondiale par l'OMS à 106 millions de cas en 2012. Parallèlement, la diminution de sensibilité de NG aux céphalosporines de troisième génération est un problème émergent. L'objectif de notre étude était de réaliser un génotypage des souches de NG isolées chez des patients présentant une infection génitale récidivante afin d'identifier les souches circulantes dans ces populations à risque et différencier entre récurrence et réinfection.

#### **Méthodes:**

Notre étude a porté sur 200 souches de NG (179 prélèvements urétraux, 7 prélèvements cervicaux, 14 prélèvements rectaux) isolés chez 84 patients (80 hommes) ayant consulté au moins à deux reprises pour une infection génitales à NG entre 2004 et 2012 à l'Hôpital St Louis, Paris. Les récurrences ont été définies par des infections génitales avec des isolats de NG de même séquence type (ST) survenant dans un intervalle de moins de 6 mois. Les réinfections sont caractérisées par des infections récidivantes avec des NG de ST différents. Le typage moléculaire a été réalisé par la technique de référence NG-MAST.

#### **Résultats:**

L'âge moyen dans notre population était de 30 ans, avec 60% d'hommes homosexuels (HSH) et 40% hétérosexuels. Les co-infections avec le VIH ou *Chlamydia trachomatis* ont été observées dans 22.6% et 29% des cas, respectivement. Cent deux ST différents ont été caractérisés dont 37 étaient indéterminés. Les ST les plus fréquemment représentés étaient : ST2992 (12%), ST2 (8.5%), ST225 (6%), ST1407 (5%), ST766 (2,5%) et ST40 (2,5%). Les ST2992, ST225 et ST1407 étaient surreprésentés dans la population HSH, le ST2 n'a été retrouvé que dans la population hétérosexuelle. Les réinfections avec un isolat de ST différent étaient les plus fréquentes (78,6%). Lors de récurrences (21,4%), 2 ST étaient majoritaires : les ST2992 et ST2 associés respectivement aux patients HSH et aux hétérosexuels. Les récurrences sont apparues comme plus fréquentes dans la population hétérosexuelle suggérant un probable défaut d'utilisation de protection entre partenaires sexuels ainsi qu'un probable sous diagnostic du partenaire contact.

#### **Conclusion:**

Notre étude souligne l'intérêt du génotypage de NG par la méthode NG-MAST pour distinguer entre récurrence et réinfection. Bien qu'elle ne permette pas de distinguer entre rechutes réelles et récurrences, cette méthode pourrait nous indiquer quelles mesures de prévention sont adéquates dans la population consultant pour un deuxième épisode d'infection NG.

## ***VI.2. Publications et communications***

### ***(i) Publications nationales***

#### **ANNEE 2013**

- Epidémiologie actuelle des IST bactériennes en France. G. La Ruche, V. Goulet, A. Bouyssou, P. Sednaoui, B. De Barbeyrac, N. Dupin, C. Semaille. Presse Med 2013. 42 (4 pt 1) : 432-9

#### **ANNEE 2014**

##### **- Travaux parus**

- Evolution de la résistance du gonocoque en France de 2001 à 2012. G. La Ruche, A. Goubard, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille, P. Sednaoui. BEH 2014.  
[http://www.invs.sante.fr/beh/2014/5/pdf/2014\\_5\\_2.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2014/5/pdf/2014_5_2.pdf)

##### **- Travaux soumis**

- Résistance du gonocoque en France : état des lieux. A. Goubard, G. La Ruche, B. Berçot, E. Cambau, P. Sednaoui. (soumis à l'EMC Biologie médicale)
- Biologie des agents infectieux responsables des infections sexuellement transmissibles. JD Zeitoun, A. Goubard. (soumis à l'EMC Gastro-entérologie biologie et clinique)

### ***(ii) Publications internationales***

#### **ANNEE 2013**

- Résistance du gonocoque en France : état des lieux. A. Goubard, G. La Ruche, B. Berçot, E. Cambau, P. Sednaoui. (soumis à l'EMC Biologie médicale)
- Biologie des agents infectieux responsables des infections sexuellement transmissibles. JD Zeitoun, A. Goubard. (soumis à l'EMC Gastro-entérologie biologie et clinique)

#### **ANNÉE 2014**

##### **- Travaux parus**

- Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci ? G. La Ruche, P. Sednaoui, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille. Lancet infect Dis. 2014. 14(3) : 184-5

##### **- Travaux soumis**

- Emergence of gonococcal resistance to cephalosporins in France. G. La Ruche, A. Goubard, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille, P. Sednaoui. (en révision favorable pour Eurosurveillance)

- Evaluation of the Anyplex™ II STI-7 (TOCETM technology) for the diagnosis of Sexually Transmitted infections. B. Berçot, R. Amarsy, D. Gueret, A. Goubard, H. Jacquier, F. Meunier, F. Mougari, E. Cambau (soumis au JCM)
- Detection of *Treponema pallidum* by Polymerase Chain Reaction in ulcers: what is the best target? A. Gayet-Ageron, B. Charton, P. Sednaoui, G. Getaz-Jimenez, M. Tangomo, T. Ferry, S. Lautenschlager, M. Cavassini, Thomas Perneger, Hélène Salord and the Swiss-French Collaborative Study Group on Tp-PCR.

### ***(iii) Communications nationales***

#### **ANNEE 2013**

- Evaluation du kit STI-7: détection de 7 pathogènes responsables de MST. B. Berçot\*, A. Rishma, D. Gueret, F. Meunier, F. Mougari, E. Cambau. 9ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Lille, poster P167, 7-8 février 2013.
- Etude descriptive de la population des patients mineurs de la consultation de dépistage anonyme et gratuit de l'Institut Alfred Fournier. W. Tosini, R. Lefrançois, C. Pizzocolo F. Castano I. Faure, G. Pahlavan C. Walfard, P. Charbonneau, P. Sednaoui J. M. Bohbot B. Halioua. Journées de dermatologie de Paris. 10-14 Décembre 2013.
- Les comportements à risque d'IST et d'infection à VIH au cours du 3<sup>e</sup> âge. W. Tosini, F. Castano, I. Faure, R. Lefrançois, G. Pahlavan, C. Pizzocolo, C. Walfard, P. Charbonneau, P. Sednaoui, J. M. Bohbot, B. Halioua. Journées de dermatologie de Paris. 10-14 Décembre 2013.
- Exploration de la résistance plasmidique aux bêta-lactamines chez *Neisseria gonorrhoeae*. M. Micaëlo\*, B. Berçot, H. Jacquier, G. La Ruche, P. Sednaoui, A. Goubard, E. Cambau. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, Poster 563, 21 novembre 2013.
- Epidémiologie moléculaire de la résistance aux quinolones chez *Neisseria gonorrhoeae*. D. Gueret\*, T. Guillard, B. Berçot, G. La Ruche, A. Goubard, E. Cambau. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Communication n°122, 21 novembre 2013.

#### **ANNEE 2014**

- Evaluation du kit FluoroType® NG et CT (Hain) pour le diagnostic d'Infections Sexuellement Transmissibles. B. Berçot, F. Mougari, R. Amarsy, F. Meunier, E. Cambau. 10<sup>ème</sup> Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris, poster, 31 mars-1<sup>er</sup> avril 2014-04-13

#### **(iv) Communications internationales**

##### **ANNEE 2013**

- Evolution of gonococcal strain susceptibility to antibiotics in France: data from a national sentinel surveillance network, 2001-2012. G. La Ruche, P. Sednaoui, B. Bercot, E. Cambau, A. Goubard\*. International Meeting on Emerging Diseases (IMED). Vienne, Hot topics session, Oral presentation n°17.008, 15-17 février 2013.
- Diagnostic Accuracy of Polymerase Chain Reaction Targeting *Treponema pallidum* in Ulcers. A. Gayet-Ageron<sup>1</sup>, P. Sednaoui<sup>2</sup>, T. Ferry<sup>3</sup>, L. Toutous Trelu<sup>1</sup>, S. Lautenschlager<sup>4</sup>, M. Cavassini<sup>5</sup>, D. Alves<sup>5</sup>, S. Emonet<sup>1</sup>, J. Schrenzel<sup>1</sup>, T. Perneger<sup>1</sup> and the Swiss-French Collaborative Study Group on *Tp*-PCR. Eurogyn. Florence.4-7 novembre 2013

##### **ANNEE 2014**

- Molecular typing by NG-MAST of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from recurrent genital infections. M Gits-Muselli, B Berçot, F Lassau, M Janier, E. Cambau. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014
- Beta-lactams plasmid-mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in France. M. Micaëlo, H. Jacquier, E. Cambau, A. Goubard, P. Sednaoui, G. La Ruche, B. Berçot. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014
- Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in France Gueret D, Guillard T, Berçot B, La Ruche G, Goubard A, Sednaoui P, Cambau E. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014

#### **(v) Conférences sur invitations**

##### **ANNEE 2013**

- *Neisseria gonorrhoeae*: PCR et culture. B. Berçot. Journées Internationales de Biologie, CNIT La défense, Paris, 14 novembre 2013.

##### **ANNEE 2014**

- Country presentation: National gonococcal surveillance programme: results and challenges. A. Goubard. Back to back STI and HIV Network Meeting. Dubrovnik, 20-22 mai 2014
- PCR gonocoque : cibles amplifiées, contrôle des positifs en PCR et nomenclature. B. Berçot. Journées scientifiques organisées par Abbott Diagnostic «Maladies Infectieuses : Innovations et Perspectives». Paris, 5 juin 2014

## ***(vi) Publications et communications didactiques***

### **ANNEE 2013**

- Dépistage des IST sur autoprélèvement vaginal .P. Sednaoui et A. Goubard. Emission Allo Docteur. Mars 2013.
- La superbactérie du sexe qui n'en est pas une. B. Berçot, E. Cambau et F Lassau. <http://www.lepoint.fr>. 24/05/2013 et 19/11/2013
- Sexe : l'hyperbactérie H041 résiste aux antibiotiques. B. Berçot, E. Cambau et F Lassau. <http://www.terrafemina.com> 21/05/2013
- « Superbactérie : faut-il paniquer ? » Edito sur la souche H041. A. Goubard et E. Barakat. Tribune Santé. Septembre 2013.

## **VII. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire et environnementaux**

---

La gonococcie est une infection strictement humaine. Il n'y a pas de transmission par l'animal ni par l'environnement ou l'alimentation. Le CNRG n'est donc pas amené à coopérer avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire ou environnementaux.

## VIII. Programme d'activités 2014-2015

---

Le laboratoire coordonnateur du CNRG est très engagé dans la surveillance épidémiologique et microbiologique des infections gonococciques et a pour mission principale de contrôler l'évolution de la sensibilité des souches aux antibiotiques. Dans le contexte actuel d'émergence de résistances, il devra rester vigilant et réactif face à la survenue ou à l'augmentation de résistances, notamment vis-à-vis des céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération, de la spectinomycine et de l'azithromycine.

Le laboratoire associé devra quant à lui poursuivre la caractérisation des mécanismes de résistance aux antibiotiques et le génotypage des souches à des fins aussi bien diagnostiques qu'épidémiologiques (étude de cas groupés, comparaison des génotypes en France et en Europe).

Pour les deux années à venir, le programme du CNRG sera donc de pérenniser et améliorer les missions en place depuis plusieurs années, de finaliser les travaux engagés par la publication des résultats obtenus et de développer les thématiques de recherche sur les supports génétiques de la résistance du gonocoque et sur l'épidémiologie moléculaire des souches.

Un des objectifs majeurs du CNRG est également d'obtenir l'accréditation Cofrac. Les démarches qualités sont d'ores et déjà initiées mais le CNRG devra renforcer sa politique qualité pour assurer :

- La gestion documentaire de tous les protocoles mis en place
- La traçabilité des lots de réactifs utilisés
- L'habilitation du personnel
- La multiplication de contrôles de qualité interne

Ces éléments s'inscrivent dans la démarche qualité globale des laboratoires du CNRG tout en respectant les spécificités des CNR, notamment en ce qui concernent les techniques expérimentales.

### ➤ *Contribuer à la surveillance épidémiologique*

#### ○ **En collaborant aux études épidémiologiques**

En France, la majorité des données épidémiologiques sur les gonococcies est issue des déclarations des laboratoires du réseau RENAGO. Le CNRG, sur le site de l'Institut Alfred Fournier, joue un rôle majeur puisqu'il représente à lui seul plus de 20% des souches étudiées et environ 15% des signalements épidémiologiques. Il est donc essentiel que le CNRG continue à participer activement au recueil des données démographiques et, en partenariat avec l'InVS, analyse ces données pour suivre l'évolution des infections gonococciques.

Le CNRG doit centraliser et analyser tous les signalements d'événements inhabituels pour évaluer les risques et les mesures à mettre éventuellement en place. Ces événements peuvent concerner l'expression clinique de la maladie, sous forme de gonococcie généralisée ou infantile par exemple, ou d'une évolution épidémique de l'infection dans une population ou une région particulières.

- **En assurant une surveillance de la sensibilité des gonocoques aux anti-infectieux au niveau national en s'appuyant sur le réseau RENAGO**

Le CNRG doit tout d'abord de veiller à la transmission des souches par les laboratoires du réseau et donc à l'optimisation du transport des souches. Les milieux de transport solides (TGV) ont été remplacés en fin d'année 2013 par des milieux liquides, qui permettraient une meilleure viabilité du gonocoque et donc un le pourcentage de souches remises en culture plus important. Ces modifications, d'ores et déjà effectives vont devoir faire l'objet de procédures écrites, qui seront disponibles en téléchargement sur notre site internet afin que les laboratoires du réseau puissent uniformiser leurs pratiques et gérer leur système documentaire.

La menace d'émergence de souches résistantes à nos dernières lignes de traitement empirique renforce la nécessité de surveiller la sensibilité des souches aux antibiotiques de référence mais également de revoir la pertinence des molécules testées.

- **En participant aux systèmes de surveillance européens**

Le CNRG participe activement au réseau de surveillance épidémiologique européen des IST depuis 2003 et compte renouveler sa participation pour les années à venir. Pour la période 2014-2015, le CNRG devra donc réitérer son adhésion au système de surveillance européen (TESSy) qui centralise les données de 30 pays de l'Union Européenne et de l'espace économique européen. Le CNRG prévoit par ailleurs de poursuivre sa participation aux réunions de coordination du programme européen de surveillance (Euro-GASP Co-ordination Meeting). Ces réunions permettent de planifier les actions et protocoles à mettre en place pour assurer une surveillance optimale et standardisée.

#### ➤ *Evaluer les techniques d'identification*

Actuellement, les kits de diagnostic moléculaire par PCR multiplex remplacent progressivement les panels actuellement utilisés et le CNRG, de par le recrutement particulier des patients qui consultent dans les structures hébergeant les CNR, est un site de choix pour évaluer la performance de ces nouveaux outils diagnostiques. Pour l'heure, aucune étude de ce type n'est planifiée mais il est fort probable que ce genre de travail soit mené au cours des deux prochaines années.

#### ➤ *Détecter de nouveaux phénotypes de résistance en contribuant à l'identification des mécanismes de résistance et développer les techniques de typage des souches de *N. gonorrhoeae**

Il est aujourd'hui indispensable de caractériser les supports moléculaires des résistances afin non seulement de comprendre leurs origines et d'évaluer leur potentiel de dissémination, mais aussi de préparer des tests diagnostiques de détection moléculaire de la résistance.

Des travaux de recherche fondamentaux pourront être poursuivis dans le cadre de la nouvelle UMR en Microbiologie IAME « Infection, Anti-infectieux, Evolution, Modélisation » (contrat quadriennal 2014-2019) qui résulte de la fusion de l'Unité EA 3964 du Pr. Bruno FANTIN (« Emergence de la résistance bactérienne in vivo »), de l'Unité INSERM U722 du Pr. Erick DENAMUR (« Ecologie et évolution des micro-organismes »), et de l'Unité UMR738 du Pr. France MENTRE (« Modèles et méthodes pour l'évaluation de la thérapeutique des maladies »). Le Laboratoire associé au CNR est rattaché à l'équipe 2 « Ecologie, Evolution et Thérapeutique de la virulence et de la résistance chez les bactéries » dirigée par le Pr. Eric DENAMUR.

Les projets sont pour l'année 2014 et les années à venir seront :

- d'explorer la résistance à l'azithromycine chez *Neisseria gonorrhoeae* : travail en cours dans le cadre d'un master 2  
Anna Belkacem : Master M2 de Microbiologie, Ecologie Microbienne, Pathogénie des Microorganismes, Université Paris XI, Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Châtenay Malabry / Université Paris XI.
- d'explorer les souches de sensibilité diminuée aux C3G circulant en France : génotypage et caractérisation des PLP et de leur mosaïcisme
- de mettre en place de la technique de typage MLST qui résulte de l'amplification et du séquençage de 7 gènes de ménage de *N. gonorrhoeae*
- d'étudier la pathogénicité de souches de *N. gonorrhoeae* responsable d'infections généralisées (endocardites, ostéo-arthrites,...)
- de mettre en place le séquençage à haut débit de souches d'intérêt de *N. gonorrhoeae*
- de comparer sur le plan moléculaire les génomes d'intérêt, étude du core-génome et du pan-génome.



# Annexes

## Annexe 1: MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

---

### 1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés :

- Isolement, identification, recherche de bêta-lactamase et détermination des CMI's aux antibiotiques essentiels à la surveillance de l'évolution de la résistance (pénicilline, céfixime, ceftriaxone, spectinomycine, tétracycline, ciprofloxacine, azithromycine, gentamicine) de toutes les souches de gonocoques adressées par les laboratoires du réseau national de surveillance des gonocoques (RENAGO)
- Identification, détermination de la sensibilité aux antibiotiques et toute autre analyse (sérotypage, génotypage, recherche des gènes de résistance, etc) des souches particulières isolées dans le réseau RENAGO ou dans tout autre laboratoire (résistance aux antibiotiques, infection systémique, etc)
- Surveillance de l'évolution de la résistance aux antibiotiques par l'étude phénotypique voire génotypique des souches reçues et l'analyse des données microbiologiques globales
- Détection de nouveaux phénotypes de résistance et identification des mécanismes de résistance (développement des outils moléculaires nécessaires à l'exploration des souches)
- Développement des techniques discriminantes de typage des souches de *N. gonorrhoeae* (NG-MAST et MLST) pour comparer la distribution des souches en France et dans d'autres pays et comparer des souches entre elles, notamment pour les suspicions de cas groupés
- Participation au réseau RENAGO et animation de celui-ci
- Constitution et entretien de la collection de souches de gonocoques
- Développement des techniques de diagnostic, d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques (outils moléculaires, spectrométrie de masse)
- Alerte des autorités sanitaires (InVS, HAS), en cas d'émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques ou d'apparition d'une souche épidémique
- Activité de conseil auprès des autorités sanitaires, des médecins et des biologistes
- Valorisation des travaux par des publications, communications, guides de prescription
- Formation des professionnels (enseignements au sein des écoles de formation et des facultés, animation de formations continue des professionnels de santé, participation à des conférences et des congrès)
- Diffusion des conseils et information des professionnels de santé sur la prise en charge diagnostique et thérapeutique de la gonococcie

- Collaboration avec d'autres équipes scientifiques
- Participation à des expertises nationales et internationales, en collaborant avec les instances en charge de ces expertises (InVS, DGS, HAS, GTA, ANSM, EUCAST, ECDC)
- Participation à des contrôles de qualité nationaux et supranationaux
- Participation à l'organisation de contrôles de qualité nationaux

Globalement, depuis la nouvelle mandature 2012-2016, le CNR coordonnateur gère l'étude phénotypique de la résistance des souches et le laboratoire associé étudie le résistome de ces souches.

Le laboratoire coordonnateur s'occupe de la réception des souches, de leur identification et de l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques. L'équipe fait le lien entre l'InVS, le réseau Rénago et le CNR associé. Les résultats des analyses sont transmis aux laboratoires envoyant leurs souches ainsi qu'à l'InVS et les souches d'intérêt sont adressées au CNR associé qui a mis en place des outils permettant de suivre l'évolution de la résistance du gonocoque aux antibiotiques et le génotypage des souches.

L'équipe du CNR associé a ainsi pu appréhender la résistance du gonocoque aux  $\beta$ -lactamines (Master 2, Maité Micaelo, 2013), aux quinolones (Master 2, Dorothée Guéret, 2013), et cette année, à l'azithromycine (Master 2, Anna Belkacem, 2014) ainsi que l'exploration de la clonalité des souches par la technique de typage moléculaire NG-MAST, technique de référence pour le gonocoque (Thèse d'exercice, Maud Gits-Muselli, 2013). Le laboratoire associé possède donc désormais les outils moléculaires et une vision plus précise de l'épidémiologie moléculaire des souches de *N. gonorrhoeae* circulant en France. De ces travaux se dégagent des thématiques de recherche qui sont dans l'axe de recherche de l'équipe Inserm IAME (équipe de recherche classée A+ dont le laboratoire associé fait partie) sur le plan de l'évolution des souches et de l'étude de l'acquisition des résistances.

## ***1.2. Descriptif de l'équipe du CNR***

### **Laboratoire coordonnateur**

- Le CNRG est intégré dans le laboratoire de biologie médicale de l'Institut Alfred Fournier qui est un centre de santé spécialisé dans le dépistage, le diagnostic et le traitement des IST.
- Organigramme du laboratoire de biologie médicale : Directeur : Dr P. Sednaoui, Directeurs adjoints : Mmes L. Monfort et A. Goubard. Techniciens qualifiés : 10 ETP. Infirmières : 2,5 ETP. Secrétaires : 4 ETP. Aide laboratoire : 1 ETP.
- Le personnel dédié aux activités du CNRG est

### **Laboratoire associé Groupe Hospitalier Lariboisière-St Louis- Fernand Vidal**

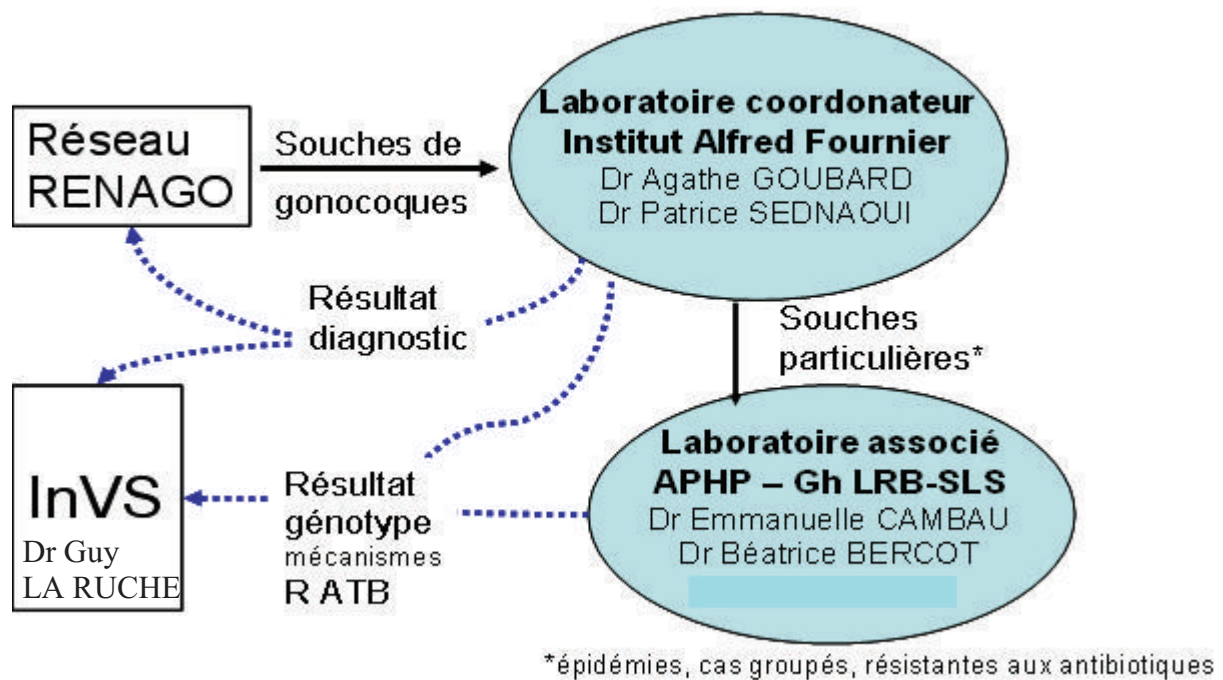
- Le Laboratoire associé est intégré dans le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Bactériologie-Virologie-Hygiène qui assure le diagnostic et la surveillance des infections des patients consultants ou hospitalisés au Groupe Hospitalier Lariboisière-St Louis-Fernand Vidal. Il comprend 4,5 ETP biologistes et 20 ETP techniciens.
- Le personnel qui participera au CNR des gonocoques est composé de 2 médecins hospitalo-universitaires (temps partiels, financement AP-HP) : Pr Emmanuelle CAMBAU, Dr Béatrice BERCOT et de deux techniciens à temps partiel dont une

technicienne spécialisée en biologie moléculaire sur un financement AP-HP et l'autre qui sera recruté en CDD sur un financement demandé à l'InVS (0.5 ETP).

#### La quotité de personnel demandé pour financement par l'InVS

- Un biologiste pour le laboratoire coordonnateur: 1/20e ETP pour le Dr Goubard
- Une technicienne qualifiée : 0.60 ETP pour le laboratoire coordonnateur et 0.5 ETP pour le laboratoire associé.

## Organisation du CNR des gonocoques



### **1.3. Descriptif des locaux et de l'équipement du CNR**

#### **1.3.1. Locaux**

##### **Laboratoire coordonnateur**

- L'ensemble des locaux du laboratoire se répartit sur environ 300 m<sup>2</sup>, hors salles de prélèvements, incluant un espace dédié au CNR.
- Le CNR est situé dans le laboratoire de microbiologie de l'Institut Alfred Fournier.
- 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.

### **Laboratoire associé**

- L'ensemble des locaux du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Vidal, site Lariboisière-Fernand Vidal, est situé au 2ème étage du bâtiment CIVIALE de l'hôpital Lariboisière à l'adresse du 2 rue Ambroise Paré, pour une surface d'environ 964 m<sup>2</sup>
- Le CNR est situé dans le laboratoire de microbiologie.
- Les activités du CNR se déroulent :
  - dans les laboratoires de sécurité 2 consacrés à la bactériologie pour les subcultures éventuelles.
  - dans des pièces (39 m<sup>2</sup>) consacrées aux manipulations génétique (biologie moléculaire : identification, détection de mutation...).

### **1.3.1. Equipement**

#### **Laboratoire coordinateur (Institut Fournier, Paris)**

Le laboratoire est équipé du matériel nécessaire à la réalisation des techniques de diagnostic microbiologique phénotypique et génotypique :

- 4 hottes de sécurité microbiologique classe B
- 3 incubateurs CO<sub>2</sub>
- 4 microscopes, centrifugeuses
- système expert pour antibiogrammes (Sirscan 2000)
- thermo-cycleurs
- Automate de biologie moléculaire pour la détection combinée de *N. gonorrhoeae* et *C. trachomatis* (Panther®GenProbe)
- 2 congélateurs à très basse température dont un a été remplacé en 2009 (conservation en double des souches de Gonocoques)
- informatique médicale et imprimantes

#### **Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Vidal)**

Le laboratoire est équipé du matériel nécessaire à la réalisation des techniques microbiologiques et moléculaires

- postes de sécurité microbiologique
- incubateurs (30 et 37°C) et CO<sub>2</sub>
- Équipement complet de bactériologie centrifugeuses, colorateurs, microscopes
- Equipement pour antibiogramme en milieu solide avec lecteur automatisé d'antibiogramme en diffusion de type SIRSCAN (IA)
- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG)
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosy Thermos)
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR
- 1 plateforme (extracteur automatisé et amplification en PCR temps réel) M2000 pour la détection *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* (Abbott)
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules)
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cyclyer)
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator
- 1 système Diversilab pour génotypage par REP PCR (Biomérieux)
- 2 séquenceurs 16 capillaires AppliedBiosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires)
- 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 Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV
- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (MicroflexBruker)

- 1 autoclave de destruction

#### ***1.4. Descriptif de la démarche qualité du laboratoire***

- Accréditation

Pour répondre à la norme ISO 15189, la démarche qualité du laboratoire de l'Institut Alfred Fournier a débuté en 2010. Le processus a été initié par la voie B, passant par Bioqualité. Nous sommes désormais pourvus d'une certification Bio Qualité valable jusqu'en 2016.

Par ailleurs, notre dossier d'entrée dans la démarche d'accréditation a été envoyé au COFRAC en mai 2013.

Notre dossier de demande d'accréditation initiale sera envoyé en juin 2014 pour un premier audit prévu début 2015.

Pour favoriser l'accréditation de la microbiologie et augmenter la traçabilité de ses activités, le laboratoire coordonnateur s'est équipé d'un module de bactériologie sans papier et d'un module « work-flow » en 2013. 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. Les dates, heures, natures des analyses effectuées et noms des personnes ayant effectuées les différentes opérations sont donc connus à tout instant. Pour chaque prélèvement, y compris les souches de gonocoques, les milieux ensemencés sont prédéfinis et toutes les étapes de l'analyse microbiologique sont pré-établies dans le logiciel. Toutes les étapes de l'analyse microbiologique 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.

Pour les prochaines années, plusieurs autres objectifs qualités ont été fixés. L'un d'entre eux concerne le maintien de l'exactitude de nos résultats par l'élargissement de notre taux de participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité ou à des programmes de comparaison inter-laboratoires. Nous sommes ainsi abonnés à plusieurs programmes d'évaluation de la qualité reprenant la quasi-totalité de nos paramètres.

Pour la microbiologie, nous participons au programme d'évaluation Biologie Prospective, qui prévoit 4 contrôles par an. Actuellement, les techniques utilisées au CNR sont évaluées par l'utilisation périodique (deux séries deux fois par an) de souches de contrôles issues des banques de l'ECDC. Nous testons ainsi nos galeries d'identifications, la recherche de pénicillinase (par galerie ou technique chromogénique en disque) et les antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé (disques et bandelettes E-tests). Nous procédons par ailleurs à des contrôles inter-laboratoires en échangeant des souches avec le CNR associé. Il est toutefois prévu d'augmenter la périodicité des contrôles internes, de les appliquer également à nos techniques de biologie moléculaires et d'améliorer la traçabilité des échanges de souches, et des résultats correspondants, entre nos deux laboratoires.

- Contrôles de qualité externes supranationaux

Le CNR participe à un contrôle de qualité externe 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'European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) aux centres experts des IST de la plupart des pays européens.

1- *UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (UK NEQAS) for genital pathogens: (4/an)*

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

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

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

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

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

## Annexe 2: CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

---

### 2.1. Liste des techniques disponibles

#### *Techniques de diagnostic*

##### - Microscopie

Le laboratoire est équipé de tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la coloration de Gram (coloration automatisée ou manuelle) et à la lecture des examens directs effectués sur les prélèvements ou les cultures. De plus, le CNR dispose d'une équipe expérimentée dont l'œil averti sait parfaitement reconnaître le gonocoque.

##### - Cultures en milieux solides et liquides

La culture du gonocoque est délicate et nécessite un savoir-faire et surtout le respect rigoureux des conditions de culture en termes d'atmosphère, d'exigences nutritives et de délai.

Le délai entre la réception de l'échantillon et la mise en culture doit être le plus court possible car la viabilité du germe en milieu de transport est limitée. Les milieux utilisés sont la gélose chocolat avec complément isovitalax ou la gélose VCAT (Biomérieux). Les géloses sont alors incubées à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (8%) pendant 18 à 24h.

La culture en milieu liquide n'est pas recommandée pour ce germe.

##### - Amplification génique

Le laboratoire coordonnateur dispose d'un automate de biologie moléculaire dédié au diagnostic combiné et à l'identification du gonocoque et de *C. trachomatis* (Aptima combo2 GenProbe). Tous les tests positifs sont confirmés par l'amplification d'un 2<sup>ème</sup> gène spécifique d'espèce.

Le laboratoire associé dispose aussi d'une plateforme pour le diagnostic moléculaire de *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* (extracteur automatisé et amplification en PCR temps réel M2000 de chez Abbott)

#### *Techniques d'identification*

##### - Techniques phénotypiques classiques (caractères cultureux, morphologiques et biochimiques)

###### a- Examen microscopique

La microscopie permet la visualisation directe du gonocoque, après coloration de Gram, par mise en évidence des diplocoques à Gram négatif « en grain de café ».

###### b- Culture

Les gonocoques sont des bactéries fragiles (très sensibles à la dessiccation) et exigeants.

Une atmosphère humide, enrichie de CO<sub>2</sub> (5-10 %) est indispensable pour la croissance.

###### c- Identification

Les souches sont identifiées selon la morphologie des colonies et leurs caractéristiques biochimiques : oxydase positive (test chromogénique en disque), glucose positif, mais maltose et saccharose négatifs (Api NH® et rapid NH®).

L'identification par analyse en spectrométrie de masse en MALDI-TOF est également mise en place au laboratoire associé.



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

### **- Techniques phénotypiques de routine**

Le CNR pratique sur chaque souche reçue un antibiogramme par diffusion et une étude des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode E-test selon les conditions suivantes :

1/ gélose chocolat Polyvitex®

2/ inoculum en solution de tampon phosphate M/15 pH 7,2 au standard McFarland 0,5

3/ lecture après 18-24 heures d'incubation à 35-37°C en atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>

4/ Les concentrations critiques (c, C) et les diamètres critiques (D, d) pour *N. gonorrhoeae* sont précisés dans le communiqué annuel du CA-SFM: <http://www.sfm.asso.fr/>,

5/ Les 6 antibiotiques testés sont la pénicilline, l'amoxicilline, l'association amoxicilline-acide clavulanique, la céfalotine, l'érythromycine, l'acide nalidixique et le chloramphénicol.

6/ la production d'une bêta-lactamase : Le test API NH permet de détecter ce mécanisme, mais le temps de lecture court en diminue la sensibilité. Cette résistance est quelquefois aisée à détecter avec un disque humidifié imprégné de nitrocéfine ou céphalosporine chromogène. La synergie observée par comparaison des diamètres d'inhibition entre l'amoxicilline (AMX) et sa combinaison avec l'acide clavulanique (AMC) peut aussi être une preuve indirecte.

7/ détermination des CMI en milieu gélosé avec des E-tests (cf. recommandations du CASFM). Actuellement, 6 antibiotiques de référence sont testés (pénicilline, tétracycline, ceftriaxone, céfixime, ciprofloxacine et spectinomycine) mais le remplacement de certaines molécules sera à discuter.

### **- Techniques phénotypiques pour l'évaluation de l'activité de nouveaux antibiotiques**

La détermination de CMI se fera par E-test pour les antibiotiques en cours de commercialisation pour lesquels les bandelettes existeront ou par dilution en milieu solide avec un inoculateur de Steers.

## ***2.2. Liste des marqueurs épidémiologiques***

### ***Techniques génotypiques***

- Genotypage par méthode NG-MAST dans un premier temps et suivant les recommandations internationales (Unemo et Dillon 2011)

- Génotypage par MLST en seconde intention

- Détection des principaux gènes de résistance

## ***2.3. Collections de souches, antigènes ou immuns-sérums de référence***

### ***Description des souches***

Toutes les souches reçues par le CNRG depuis 1986 et qui ont pu être remise en culture sont conservées en bouillon glycérolé à -80°C en duplicate, dans deux congélateurs distincts.

### ***Conditions de mise à disposition des collections***

Conditions de mise à disposition de ces collections : sur demande écrite au CNR.

## **2.4. Liste des techniques recommandées par le CNR**

### **- Prélèvements**

Prélèvements à visée diagnostique

- Prélèvements génitaux : urétral, premier jet d'urine, vaginal (endo-exocol), ano-rectal
- Autres prélèvements : pharyngé, oculaire, articulaire, hémoculture, etc

Prélèvements de dépistage pour les patients à risques et chez les femmes de moins de 25 ans: prélèvements génitaux uniquement

- Premier jet d'urine chez l'homme
- Auto-prélèvement vaginal chez la femme

### **- Transport**

Le gonocoque est un germe très fragile. Les prélèvements et les souches doivent donc être transportés le plus rapidement possible au laboratoire (24h) et dans des milieux de transport adaptés :

- écouvillons en milieu liquide (type Eswab)
- écouvillon en milieu gélosé (Amies charbon)
- écouvillon en milieu spécifique pour PCR (selon recommandation fournisseur)

Pour l'envoi de prélèvements, les échantillons sont placés directement dans le milieu de transport. Pour l'envoi de souches, les colonies sont prélevées à l'écouvillon à partir d'une culture pure et fraîche (18-24h d'incubation).

Le transport se fait préférentiellement à 4°C.

### **- Culture de *N. gonorrhoeae***

Le gonocoque est une bactérie exigeante qui requiert des milieux enrichies en facteurs de croissance (chocolat polyvitex). L'isolement du germe, parfois présent en faible quantité, dans des prélèvements souvent polymicrobiens nécessite l'utilisation de géloses rendues sélectives par l'adjonction d'antibiotiques (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime). Cependant, une faible proportion de gonocoques ne pousse pas sur milieu sélectif. Pour la recherche de gonocoque à partir des prélèvements, il est donc recommandé d'utiliser deux milieux enrichis, l'un sélectif et l'autre non. Pour les réisolements de souches pures, la culture est préférentiellement effectuée sur gélose enrichie non sélective. L'incubation se fait à 37°C en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et doit être prolongée jusqu'à 72h.

### **- Identification phénotypique de *N. gonorrhoeae***

L'identification peut être réalisée par différentes techniques commercialisées : galeries d'identification, cartes d'identification pour systèmes automatisés, spectrométrie de masse.

### **- Réalisation des antibiogrammes**

La production de bêta-lactamase doit être systématiquement recherchée par une technique chromogénique.

Pour l'antibiogramme, il est recommandé d'utiliser la diffusion en milieu gélosé.

A partir d'une culture fraîche, réaliser une suspension en solution saline équivalente au standard McFarland 0.5.

Ensemencer une gélose chocolat polyvitex par écouvillonnage ou inondation.

Molécules à tester (recommandations Casfm):

Céfixime, Ceftriaxone, spectinomycine, tétracycline, ciprofloxacine

**- Conservation des souches**

Les souches de gonocoques se conservent par congélation à -80°C dans des tubes à microbilles.

**- Tests d'amplification des Acides Nucléiques (TAAN)**

Les prélèvements doivent être placés dans des milieux de transport/conservation spécifiques à chaque technique et précisés par le fournisseur.

Le CNRG ne propose aucune recommandation spécifique quand l'utilisation d'un automate en particulier. Pour garantir la fiabilité et la sensibilité des techniques, il est préconisé de se reporter aux recommandations du fournisseur.

La spécificité de ces techniques quant à elle conditionnée par le site de prélèvement et la prévalence du gonocoque dans les populations testées. Ces méthodes peuvent en effet donner des réactions croisées avec les autres *Neisseria*, *N. meningitidis* et *Neisseria* commensales de la flore pharyngées. Il est généralement préconisé de confirmer tout résultat positif par l'amplification d'une seconde séquence cible. Cette confirmation est indispensable sur les prélèvements autres que génitaux, notamment pharyngés mais reste recommandée sur les prélèvements génitaux en cas d'absence de signes cliniques et dans les populations à faible prévalence.

## Annexe 3: RESUMES DES PUBLICATIONS-COMMUNICATIONS

### (i) Publications nationales

#### ANNEE 2013

- **Current epidemiology of bacterial STIs in France. G. La Ruche, V. Goulet, A. Bouyssou, P. Sednaoui, B. De Barbeyrac, N. Dupin, C. Semaille. Presse Med 2013. 42 (4 pt 1) : 432-9**

Sexually transmitted infections (STIs) remains a major problem of public health in France. Voluntary networks of physicians (RésIST) and laboratories (Rénago, Rénachla, lymphogranuloma venereum: LGV network) produce indicators showing the evolution of the main bacterial STIs. In 2010, the main findings were the following. The number of gonococcal infections has increased throughout the decade 2000 to 2010. The decrease in susceptibility of gonococcal strains to first-line antibiotics (extended-spectrum cephalosporins) needs to keep great attention. The number of screening and diagnosis of chlamydial urogenital infections also continues to rise in both sexes, particularly due to increased screening among young people. The relatively stable number of cases of early syphilis and of rectal LGV needs to be confirmed over the coming years. Both of these STIs affect overwhelmingly homo/bisexual men. There is still a high level of HIV co-infection with LGV and syphilis, and to a lesser extent with gonorrhea. We observe that condom use is still inadequate, especially during oral sex.

#### ANNEE 2014

##### - Travaux parus

- **Evolution de la résistance du gonocoque en France de 2001 à 2012. G. La Ruche, A. Goubard, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille, P. Sednaoui. BEH 2014. [http://www.invs.sante.fr/beh/2014/5/pdf/2014\\_5\\_2.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2014/5/pdf/2014_5_2.pdf)**

#### **Contexte**

Depuis la fin des années 1990, une recrudescence mondiale des gonococcies et une augmentation des résistances aux antibiotiques ont été constatées. Les multirésistances pourraient aboutir à une impasse thérapeutique. Cet article décrit l'évolution des résistances du gonocoque aux antibiotiques en France sur une période de 12 années (2001-2012) ainsi que les facteurs associés à la baisse de sensibilité aux céphalosporines.

#### **Méthode**

La surveillance des infections à gonocoque est réalisée grâce au réseau Rénago de laboratoires volontaires qui collectent des données épidémiologiques. Les souches sont adressées au Centre national de référence qui détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour six antibiotiques.

#### **Résultats-**

Entre 2001 et 2012, le nombre de gonococcies a régulièrement augmenté. La sensibilité de 8 649 souches a été étudiée pendant cette période. La proportion de souches résistantes a fluctué autour de 13% pour la pénicilline, a augmenté jusqu'à 56% en 2012 pour la tétracycline et a augmenté et est restée élevée autour de 42% pour la ciprofloxacine. La proportion de souches résistantes pour le céfixime (CMI >0,125 mg/L) a quadruplé entre 2011 (0,7%) et 2012 (3,0% ; p<0,001). Seules 2 souches sur 8 649 avaient une CMI de la ceftriaxone >0,125 mg/L, toutes deux en 2010. La baisse de sensibilité pour les céphalosporines augmente avec l'âge des patients et est plus fréquente pour les souches pharyngées.

## Conclusion

L'augmentation des résistances au céfixime pourrait témoigner d'une application insuffisante de la recommandation nationale d'utiliser la ceftriaxone en première intention dans le traitement probabiliste des urétrites et cervicites. Une surveillance renforcée des souches pharyngées est proposée.

### ➤ Travaux soumis

- **Résistance du gonocoque en France : état des lieux. A. Goubard, G. La Ruche, B. Berçot, E. Cambau, P. Sednaoui. (soumis à l'EMC Biologie médicale)**

Depuis la fin des années 1990, les infections gonococciques sont en recrudescence dans le monde. En France, la gonococcie est la deuxième cause d'infection sexuellement transmissible après les infections à *Chlamydia trachomatis* et les cas se sont multipliés ces dernières années. Depuis l'avènement de l'antibiothérapie, la gonococcie est une infection curable dont les complications se sont raréfiées. Cependant, le gonocoque possède d'excellentes capacités d'adaptation et a su développer des résistances à tous les antibiotiques utilisés en thérapeutique. Les taux actuels de résistance à la pénicilline, à la tétracycline et aux fluoroquinolones rendent impossible la prescription probabiliste de ces antibiotiques. Plus récemment sont apparues des diminutions de sensibilité voire des résistances aux dernières lignes de traitement, les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, et les options thérapeutiques deviennent limitées. Au regard de l'histoire des traitements utilisés et de l'évolution des résistances du gonocoque à ces antibiotiques, nous allons devoir faire face à l'émergence et à la dissémination de souches multi-résistantes. La prévention des gonococcies, la prévention des résistances et la surveillance microbiologique des souches de gonocoque sont donc devenues des enjeux majeurs de santé publique. Il est donc essentiel de maîtriser la consommation des antibiotiques et de relancer le développement de nouvelles molécules et les recherches sur la vaccination pour garantir la prise en charge de ces infections et en limiter les complications.

- **Biologie des agents infectieux responsables des infections sexuellement transmissibles. JD Zeitoun, A. Goubard. (soumis à l'EMC Gastro-entérologie biologie et clinique)**

La syphilis est liée à une bactérie non cultivable spiralée de la famille des spirochètes, appelée *Treponema pallidum*. Le diagnostic peut-être fait par l'examen direct au microscope à fond noir d'un frottis de sérosité de chancre. Dans tous les cas, la sérologie est indispensable et elle servira aussi pour le suivi après traitement. En France, elle fait appel à un TPHA et un VDRL. Le gonocoque est un cocci à Gram négatif fragile qui développe des résistances de plus en plus nombreuses aux antibiotiques. Le diagnostic se fait sur un prélèvement local, avec la possibilité de faire une PCR mais surtout une culture qui permet en sus d'obtenir un antibiogramme. *Chlamydia trachomatis* est une bactérie intracellulaire dont la pathogénie dépend du sérovar. Le diagnostic peut faire appel à la sérologie dans les formes invasives mais surtout par PCR sur prélèvement local. L'herpès est lié aux virus HSV-1 et HSV-2, ce dernier étant plus fréquemment impliqué dans les infections anorectales. Le diagnostic est le plus souvent retenu sur la clinique mais une confirmation peut être obtenue par une culture virale ou une PCR effectuée sur un prélèvement local.

## ***(ii) Publications internationales***

### **ANNEE 2014**

#### **Travaux parus**

- **Decreased susceptibility to cephalosporins among gonococci ? G. La Ruche, P. Sednaoui, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille. *Lancet infect Dis*. 2014. 14(3) : 184-5. (Pas d'abstract : lettre à l'éditeur)**

#### **Travaux soumis**

- **Emergence of gonococcal resistance to cephalosporins in France. G. La Ruche, A. Goubard, B. Berçot, E. Cambau, C. Semaille, P. Sednaoui. (soumis à *Eurosurveillance*)**

Resistance to cephalosporins may lead to untreatable gonococcal infections. We describe the evolution of the resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antibiotics in France over the last 12 years. We also analyse the factors associated with decreased susceptibility to cephalosporins. In France, surveillance of gonococcal infections is achieved through a network of voluntary laboratories. Strains were sent to the National Reference Laboratory to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for six antibiotics. Between 2001 and 2012, the number of gonococcal infections increased steadily. The susceptibility of 8,649 strains was studied during this period. The proportion of strains with reduce susceptibility to cefixime (MIC>0.125 mg/L) quadrupled between 2011 (0.7%) and 2012 (3.0%, p<0.001). Only two of the 8,649 strains collected between 2001 and 2012 had a MIC of ceftriaxone >0.125 mg/L, both in 2010. Decreased susceptibility to cephalosporins increased with older age and was more common in pharyngeal strains. Increased resistance to cefixime may indicate that the national ecommendation to use ceftriaxone as a first line treatment for cases of urethritis and cervicitis has not been fully implemented. Enhanced surveillance of pharyngeal strains is strongly suggested.

### ***(iii) Communications nationales***

#### **ANNÉE 2013**

- **Etude descriptive de la population des patients mineurs de la consultation de dépistage anonyme et gratuit de l'Institut Alfred Fournier. W. Tosini, R. Lefrançois, C. Pizzocolo F. Castano I. Faure, G. Pahlavan C. Walfard, P. Charbonneau, P. Sednaoui J. M. Bohbot B. Halioua. Journées de dermatologie de Paris. 10-14 Décembre 2013.**

#### **Introduction:**

Dans le cadre des missions de prévention du CDAG, les médecins sont confrontés à la prise en charge des Mineurs qui relèvent théoriquement en matière de soins de l'autorité parentale conformément à l'article 371-2 du Code civil. Nous avons souhaité analyser les comportements et les résultats des tests de dépistage du VIH, des hépatites et des IST chez les patients mineurs qui se sont rendus au CDAG de l'Institut A. Fournier.

#### **Matériel et Méthodes:**

Etude rétrospective des dossiers clinico-biologiques des patients de moins de 18 ans ayant consulté dans le cadre du CDAG entre le 1er janvier et le 30 mai 2013. Une étude comparative avec les patients âgés de plus de 18 ans a été réalisée afin d'identifier les facteurs de risque.

#### **Observations:**

Parmi les 6635 consultants, 157 (2,4%) étaient Mineurs. Cette démarche faisait suite à une relation non protégée dans 63,1% des cas. Il s'agissait majoritairement de femmes (70,7%). Parmi les 46 hommes, 17,4% étaient homo ou bisexuels. 13,4% des Mineurs avaient moins de 15 ans, 32,5% 16 ans et 54,1% 17 ans. 77,7% d'entre eux se rendaient pour la première fois dans un centre de dépistage. 68,8% ont déclaré qu'ils n'auraient jamais réalisé un dépistage de manière non anonyme. Un viol a été invoqué chez 2 patientes. 4,3% des filles avaient des antécédents d'IVG, 43,5% n'avaient aucune contraception. 9 (2 hommes et 7 femmes) (5,7%) avaient des antécédents d'IST. 54,1% ont déclaré avoir une couverture vaccinale vis-à-vis du VHB. La prévalence de la séropositivité VIH est de 0,66% (1/151) (0,49 % au CDAG en 2012). Aucun test n'a été positif pour le VHB (0/32), le VHC (0/11) et la syphilis (0/30). Un dépistage systématique par PCR sur un autoécouvillonnage vaginal, a retrouvé 13 (17,6%) chlamydioses et 6 (8,1%) gonocoques.

#### **Discussion:**

Le nombre important d'IST dépistées chez les patients mineurs confirme l'intérêt du CDAG. L'anonymat et la gratuité leur permettent d'éviter que leurs parents soient informés. La faible prévalence de la couverture contraceptive ainsi que les antécédents d'IVG justifient une optimisation de la coordination entre CDAG et les structures CPEF (Planning Familial).

#### **Conclusion:**

La proportion importante de patients mineurs souffrant d'IST et à risque de grossesse est une situation particulièrement préoccupante qui peut être en partie un reflet d'un système d'éducation sexuelle insuffisant. L'anonymat qui est la clef de voûte du CDAG présente un intérêt très important pour les Mineurs.

- **Les comportements à risque d'IST et d'infection à VIH au cours du 3<sup>e</sup> âge. W. Tosini, F. Castano, I. Faure, R. Lefrançois, G. Pahlavan, C. Pizzocolo, C. Walfard, P. Charbonneau, P. Sednaoui, J. M. Bohbot, B. Halioua. Journées de dermatologie de Paris. 10-14 Décembre 2013.**

### **Introduction:**

A l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle, la sexualité du Troisième âge a acquis le droit de citer et ne s'inscrit plus dans le non-dit, l'interdit ou la renonciation.

### **Matériel et Méthodes:**

Etude rétrospective des dossiers clinico-biologiques des patients de plus de 64 ans ayant consulté au CDAG entre le 1er janvier et le 30 mai 2013. Une étude comparative avec les patients des autres classe d'âge est en cours afin d'identifier les facteurs de risque et les spécificités de cette population

### **Observations:**

Parmi les 6635 consultants, 74 soit 1,1% étaient des Seniors majoritairement de sexe masculin (85,1%). Parmi ces derniers 14,3% étaient bisexuels et 22,2% homosexuels. 67,6% avaient entre 65 et 69 ans, 27% entre 70 et 75 ans et 5,4% plus de 76 ans. Le motif de consultation était une prise de risque sexuelle (97,3%) avec un/une partenaire occasionnel(le) dans 48,6% des cas. Le nombre moyen de partenaires varie en fonction du sexe et du type de sexualité : 5,1 femmes et 13 hommes pour les bisexuels masculins, 10,8 hommes pour les homosexuels masculins, 2,2 femmes pour les hétérosexuels masculins et 5,3 hommes pour les femmes . Dans 11.6% des cas, le rapport a eu lieu avec une prostituée. Au cours d'une relation avec un ou une partenaire occasionnel(le), le préservatif n'a jamais ou parfois été utilisé en cas de pénétration vaginale/ anale et de fellation dans respectivement 36% et 88% des cas, Chez ceux ne se protégeant pas systématiquement, 7.7% étaient intolérants au préservatif, 3.8% avait pris de l'alcool, 3.8% n'avait pas de préservatifs tandis que certains se disaient rassuré(e)s car le/la partenaire avait été estimé(e) sans facteurs de risque (34.6%) ou avait été déjà dépisté(e) (13.5%). Des antécédents d'IST ont été rapporté dans 35,1% des cas (18 gonococcies, 8 chlamydioses, 3 herpes génitaux, 3 syphilis) . Aucun test VIH (0/71), VHB (0/35) ou VHC (0/26) n'étaient positifs. 2 profils sérologiques syphilitiques étaient perturbés. Il a été dépisté une chlamydie chez un homme.

### **Discussion:**

La levée de certains tabous probablement favorisés par les progrès thérapeutiques dans le domaine de la prise en charge de l'impuissance masculine ont contribué à modifier considérablement la sexualité des Seniors. Ces derniers adoptent des comportements à risque sexuels à risque en raison de l'utilisation peu familière du préservatif avec pour conséquence un risque accru d'IST.

### **Conclusion:**

Même si la proportion importante de patients du troisième âge souffrant d'IST parmi les consultants du CIDDIST/CDAG reste faible, il s'agit d'une population ayant un comportement à risque méritant une vigilance particulière.



- **Exploration de la résistance plasmidique aux bêta-lactamines chez *Neisseria gonorrhoeae*. M. Micaëlo\*, B. Berçot, H. Jacquier, G. La Ruche, P. Sednaoui, A. Goubard, E. Cambau. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris, Poster 563, 21 novembre 2013.**

### **Objetif**

Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* (NG) sont en recrudescence avec une émergence de souches multirésistantes, en particulier aux  $\beta$ -lactamines. La résistance enzymatique aux  $\beta$ -lactamines est due à une  $\beta$ -lactamase de type TEM-1 transmise par des plasmides de petite taille (Asia, Toronto/ Rio et Africa). En France en 2012, 9% des souches produisaient une  $\beta$ -lactamase. Aucune étude n'a été faite sur l'épidémiologie moléculaire de cette résistance. Notre objectif était de caractériser les gènes des  $\beta$ -lactamases, leur support plasmidique et d'étudier la clonalité des souches d'intérêt.

### **Méthodes**

L'étude des gènes blaTEM codant la  $\beta$ -lactamase a été effectuée par PCR et séquençage sur 177 souches avec un test à la céfinase positif et isolées entre 2010 et 2012. Les plasmides ont été extraits grâce au kit Qiagen® et séquencés par PCR-mapping. Le génotypage des souches a été réalisé par la technique de référence NG-MAST.

### **Résultats obtenus**

Parmi les 177 souches étudiées, 152 (86%) avaient le gène de la  $\beta$ -lactamase TEM-1, 14 (8%) souches le gène de la  $\beta$ -lactamase TEM-135 et 11 (6%) souches un nouveau variant de TEM-1. Le variant TEM-135 comporte la mutation M182T, fréquemment rapportée en association avec d'autres mutations de TEM chez des souches d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (BLSE). Les nouveaux variants de TEM-1 comportaient une nouvelle mutation soit en position 14 dans le peptide signal (8 souches), soit en position 228 (2 souches) soit en position 269 (1 souche). L'étude des supports plasmidiques a mis en évidence que les gènes des  $\beta$ -lactamases TEM-135 étaient trouvés sur des plasmides de type Asia ou Toronto/ Rio alors que ceux des autres TEM étaient trouvés sur des plasmides de type Africa. Le génotypage a montré que les souches produisant des variants de TEM-1 n'étaient pas clonales (ST différents).

### **Conclusion**

Bien que TEM-1 soit toujours la  $\beta$ -lactamase la plus fréquente chez NG, 14% des isolats produisent un variant de TEM. Ces variants ont des supports plasmidiques semblables à ceux de TEM-1 et ne sont pas dus à la diffusion de souches clonales. L'observation de mutations nouvelles de TEM peut faire craindre une évolution vers des variants correspondant à des BLSE inactivant les céphalosporines de 3ème génération.

- **Epidémiologie moléculaire de la résistance aux quinolones chez *Neisseria gonorrhoeae*. D.Gueret\*, T. Guillard, B. Berçot, G. La Ruche, A. Goubard, E. Cambau. 33ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, Communication n°122, 21 novembre 2013.**

**Objetif de l'étude :** Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* (NG) sont en recrudescence avec une émergence mondiale de souches résistantes non seulement aux quinolones mais aussi aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G). En France, la résistance aux quinolones concernait plus de 40% des souches en 2011. Notre étude a eu pour objectif d'analyser les caractéristiques moléculaires des souches de NG résistantes aux quinolones isolées en France sélectionnées parmi les souches de sensibilité diminuée aux C3G.

**Méthodes :** Nous avons étudié 85 souches isolées en 2011. La sensibilité aux quinolones a été mesurée par E-Test de ciprofloxacine. Les gènes *gyrA* et *parC* ont été analysés dans la région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) en développant une technique spécifique de pyroséquençage. Les gènes *gyrB* et *parE* ont été séquencés dans leur région de QRDR. La

recherche des gènes plasmidiques *qnr* et *qepA* a été effectuée par PCR en temps réel HRM et la recherche du gène *aac6'IbcI* par PCR.

**Résultats obtenus :** 81 souches (95,3%) présentaient un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones avec une CMI de la ciprofloxacine (CMI Cip)  $\geq$  32mg/L. Cette résistance était liée à la présence de mutations dans les QRDRs des gènes *gyrA* et *parC* avec un génotype prédominant : Ser91Phe + Asp95Gly dans GyrA associé à Ser87Arg dans ParC. Pour 2 souches avec une CMI Cip de 12 et de 24 mg/l, d'autres mutations de GyrA et ParC étaient impliquées. Les gènes *parE* et *gyrB* ont aussi été étudiés et une mutation Pro439Ser dans ParE a été trouvée pour 2 souches (CMI Cip de 1,5 et 8 mg/l). La recherche de gènes de résistance d'origine plasmidique *qnr*, *aac6'IbcI* et *qepA* était négative. L'analyse génotypique par NG-MAST a montré 16 ST différents avec un clone prédominant ST 1407 (34,7%), qui est connu comme un clone multirésistant diffusant actuellement en Europe.

**Conclusion :** Nos résultats montrent que le principal mécanisme de résistance aux quinolones chez NG en France est l'apparition de mutations dans *gyrA* associé à des mutations dans *parC* pour les hauts niveaux de résistance.

#### (iv) *Communications internationales*

##### ANNEE 2013

- **Evolution of gonococcal strain susceptibility to antibiotics in France: data from a national sentinel surveillance network, 2001-2012. G. La Ruche, P. Sednaoui, B. Bercot, E. Cambau, A. Goubard\*. International Meeting on Emerging Diseases (IMED). Vienne, Hot topics session, Oral presentation n°17.008, 15-17 février 2013.**

##### **Background**

An increase in cases of gonorrhoea is observed since the late 1990s in France as in other European countries. The recent emergence of resistance to extended-spectrum cephalosporins (ESCs) raises an important public health problem.

##### **Objective**

This study aims to assess the emergence of antibiotic resistance in France.

##### **Methods**

A network of volunteer laboratories allows following the trends in gonorrhoea. Gonococcal strains isolated are sent to the National Reference Laboratory (NRL) to study susceptibility to several antibiotics by E-test. Until 2011, approximately 200 public and private labs located throughout France participated in the network. Due to the increasing number of strains, the number of labs involved in sending strains has been halved in 2012.

##### **Results**

The number of strains with antibiotic susceptibility results increased tenfold between 2001 and 2011, from 150 to 1,524. With a number of participating labs divided by two, 915 strains were isolated in 2012 (until November). The strains were isolated from men in 88% of cases.

In 2012, 27% of strains were susceptible to penicillin (minimum inhibitory concentration [MIC]  $\leq$  0.064mg/L) (versus 37% in 2001) and 16% were sensitive to tetracycline (MIC  $\leq$  0.5mg/L) (40% in 2001).

The proportion of strains with a high level of resistance to ciprofloxacin (MIC  $\geq$  1 mg/L) has significantly increased since 2004 and has remained high (6% in 2001, 38% in 2012).

No resistance to spectinomycin (MIC >64mg/L) was detected during this period.

In 2010 for the first time, two strains out of 1,400 had a decreased susceptibility to ceftriaxone (MIC >0.125mg/L), but none in 2011 and 2012. The number of strains with reduced susceptibility to cefixime (MIC >0.064mg/L) increased (1.5% in 2008, 5.8% in 2009 and 2010,

7.2% in 2011 and 11.2% in 2012) whereas that of resistant strains (MIC >0.125mg/L) increased in 2012 (0.1% in 2008, 0.6% in 2009 and 2010, 0.7% in 2011 and 3.3% in 2012).

### Conclusion

The decreased susceptibility of gonococcal strains to oral ESC tends to increase, and justifies to reinforce surveillance. Our data support the recommendations of the French Drug Agency recommending the use of ceftriaxone with an adequate dose (500 mg IM in a single dose) as first-line treatment for uncomplicated urogenital gonorrhoea.

**Keywords** *Neisseria gonorrhoeae*; antibiotic susceptibility, extended-spectrum cephalosporins, E-test, sentinel surveillance

- **Diagnostic Accuracy of Polymerase Chain Reaction Targeting *Treponema pallidum* in Ulcers.** A. Gayet-Ageron<sup>1</sup>, P. Sednaoui<sup>2</sup>, T. Ferry<sup>3</sup>, L. Toutous Trellu<sup>1</sup>, S. Lautenschlager<sup>4</sup>, M. Cavassini<sup>5</sup>, D. Alves<sup>5</sup>, S. Emonet<sup>1</sup>, J. Schrenzel<sup>1</sup>, T. Perneger<sup>1</sup> and the Swiss-French Collaborative Study Group on *Tp*-PCR. Eurogyn. Florence.4-7 novembre 2013

Collaborative Study Group on *Tp*-PCR: G. Getaz-Jimenez, B. Martinez de Tejada, D. Nikolic, F. Oria, M. Tangomo, H. Salord

**Background:** Syphilis is increasing since 2000 but its diagnosis remains challenging. We assess the diagnostic accuracy of polymerase chain reaction targeting *Treponema pallidum* (*Tp*-PCR) compared to darkfield microscopy (DFM) or serology in ulcers.

**Methods:** Prospective study conducted between Sep 2011 and Apr 2013 in 5 centres in France and Switzerland among patients presenting genito-oral ulcerative diseases (GUD). All patients were screened for syphilis (serology ±DFM plus *Tp*-PCR). DFM is considered as the gold standard in syphilis diagnosis.

**Results:** 168 patients aged 39 years in mean were recruited (90% men). 36 were HIV-positive (21%). Ulcer appeared after a mean 21 days post-exposure. GUD was genital (59%), ano-rectal (30%) or oral (11%). Syphilis was diagnosed by DFM and/or serology in 57 patients (34%). Other diagnoses were *Herpes simplex* (n=21), *C. trachomatis* (n=12) or *N. gonorrhoeae* infections (n=5), combination of pathogens (n=7), other bacterial infections (n=14) or other causes (n=52). DFM was done in 104 patients and 18 were positive (17%); *Tp*-PCR sensitivity was 94.4% (95%CI: 72.7-99.9) and specificity 91.9% (83.9-96.7); kappa coefficient was 0.76; positive and negative predictive values were respectively 70.8% (48.9-87.4) and 98.8% (93.2-99.9). Serology was done in 154 patients and 55 were positive (36%); 29% with positive *Tp*-PCR had initial negative VDRL/RPR; kappa coefficient was 0.53.

**Conclusions:** These results suggest that may become a convenient alternative to DFM in the diagnosis of syphilis in patients with genital ulcers.

- **Clinical performance of Biorad DX HR-HPV auto assay for detection of high grade cervical intr-épithélial neoplasia** Sednaoui P, Pollini G, Hocquemiller R, Allamelou G, Monfort L. Eurogyn. Florence.4-7 novembre 2013

### Objective:

Evaluate the Clinical performances of Dx HR-HPV Auto Assay (Dx HR-HPV) in comparison to Hybrid Capture 2 (Hc2) for the detection of CIN2/CIN3 using Bio-Rad Dx Prep System and Dx Real-Time System (Dx System).

### **Methods:**

703 women who were referred for colposcopy were included for whom 2 specimens were collected. Dx HR-HPV was performed on Dx Systems using Bio-Rad Dx Collection System and Hologic device. Hc2 was performed on Hologic device. INNO-LIPA HPV Genotyping assay was used for resolving discordances.

Clinical performances were evaluated against colposcopy and histology results and served to determine the presence of disease. In the absence of colposcopically visible lesions, no biopsy performed equated to the absence of disease.

### **Results:**

63 cases were  $\geq$  CIN2 of which 44 CIN3. Of the remaining 89 had CIN1, 38 had no CIN, 89 had Metaplasia, and 424 showed negative colposcopy and no biopsy performed.

Positivity rate of Dx HR-HPV was respectively 64% and 61% for Bio-Rad and Hologic device and 64% for Hc2. Clinical sensitivities of 93.7% and 92.1% for Dx HR-HPV respectively when using the Bio-Rad and Hologic device and 95.2% for Hc2 were established. Similar specificity, PPV and NPV values were observed for both assays.

With Bio-Rad device 5 CIN3 cases were discrepant between tests. 3 of the 4 genotyped samples showed HPV types considered by Bio-Rad Assay. Among them Dx HR-HPV detected 2 samples (HPV 16 and 51) but missed 1 HPV16, whereas Hc2 detected 1 HPV 16 and missed 2 samples (HPV 16 and 51). Of 4 CIN3 discrepant samples with Hologic device, 2 of the 3 genotyped samples showed HPV16. 1 sample was detected by Dx HR-HPV and the other by Hc2.

### **Conclusions:**

Dx HR-HPV Auto Assay showed equivalent clinical performances for the detection of CIN2+ when compared to Hybrid Capture 2. The clinical performances are equivalent when using Bio-Rad or Hologic Device.

Dx HR-HPV Auto Assay offers a complete control process from sample collection to result. It includes, with a difference with Hybrid Capture 2, a cellular control to evaluate the cell adequacy and also a true internal control to monitor extraction efficiency.

Dx Prep System and Dx Real-Time System is a fully automated offer for extraction and amplification. Very easy to use it offers a full traceability of the entire process.

## **ANNEE 2014**

- **Molecular typing by NG-MAST of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from recurrent genital infections. M Gits-Muselli, B Bercot, F Lassau, M Janier, E. Cambau. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014**

### **Objectives:**

Gonorrhea is a bacterial sexually transmitted infection with an increasing incidence, estimated about 106 million people annually (2012) and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* (NG) is an increasingly problem. Since relapse and therapeutic failure are often related to resistance, we aimed to identify high risk populations suffering from recurrent infections. Molecular typing methods can distinguish between recurrence and re-infection.

### **Methods:**

Our study investigated 200 NG clinical isolates from 84 patients (80 males and 8 females) who have consulting at least 2 times for NG infections between 2004 and 2012 at the St Louis's hospital STD Diagnosis Department. Recurrence was determined as an infection with NG isolates of the same sequence types (ST) within less than 6 months whereas re-infection was an infection with a NG isolate with a different ST. NG strains were isolates from 179 urethral, 7 cervical and 14 anal swabs. Molecular epidemiology typing was performed by the reference Multi-Antigen Sequence Typing (NG-MAST) method.

### **Results:**

The mean age was 30 years with 60% patients being MSM, 40% heterosexual. Co-infection with HIV or *Chlamydiae trachomatis* was observed in 22.6% and 29% of cases, respectively. Among the 200 NG isolates, 102 different ST Types were characterized. Thirty seven of them were novel STs undescribed in the NG-MAST databank. The most frequently observed STs were ST2992 (12%), ST2 (8.5%), ST225 (6%), ST1407 (5%), ST766 (2.5%) and ST40 (2.5%). The ST2992, ST225 and ST1407 were overrepresented in the MSM population, and ST2 strains were found only in heterosexual patients.

A recurrent infection was observed in 21.4% cases while a re-infection with another NG isolate was found in 78.6% of the cases. Recurrences were more frequent in the heterosexual population than in the MSM population suggesting a lack of protection increased especially in the heterosexual population. Two majors ST were observed in case of recurrence of NG infection, ST2992 associated to MSM patients and ST2 to heterosexual population.

#### **Conclusion:**

Our study highlights the usefulness of NG genotyping by the MAST method in order to distinguish recurrence and re-infection. Although this cannot distinguish between recurrence and true relapse, this could indicate which preventing measures are adequate with regard to the population consulting for a second episode of NG infection.

- **Beta-lactams plasmid-mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in France. M. Micaëlo, H. Jacquier, E. Cambau, A. Goubard, P. Sednaoui, G. La Ruche, B. Berçot. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014**

#### **Objectives:**

Acquired resistance to  $\beta$ -lactams in *Neisseria gonorrhoeae* is associated to target modification, decrease in permeability and  $\beta$ -lactamase production. Although class A TEM-1  $\beta$ -lactamase was classically described for NG, a recent emergence of TEM-135 (TEM-1 with a M182T substitution) was observed in Asia since 2010. In France, no recent study was conducted on the molecular epidemiology of  $\beta$ -lactamase resistance. The objective of this work was to characterize the genes of  $\beta$ -lactamases and their genetic support and to study their clonality.

#### **Methods:**

177 penicillinase-producing-*N. gonorrhoeae* (PPNG) strains were isolated from December 2010 to October 2012 from different regions in France. The gene  $bla_{TEM}$  was amplified and sequenced using OT3/OT4 and additional internal primers. Plasmid DNA was extracted using the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen®) and was sequenced by PCR-mapping. Molecular epidemiology typing was performed by the reference multi-antigen sequence typing (NG-MAST) method.

#### **Results:**

Among the 177 NG isolates, 152 (86%) carried the  $bla_{TEM-1}$  gene, 14 (8%) the  $bla_{TEM-135}$  and 11 (6%) other TEM alleles not yet described. The alleles  $bla_{TEM-1}$  and  $bla_{TEM-135}$  shared only one base difference, which resulted in the amino acid substitution M182T. The novel TEM alleles are TEM-1 variants exhibiting mutations at position 14 in signal peptide sequence (P14S, P14L; 8 strains), at position 228 (G228S, two strains) or at all plasmid carrying position 269 (Q269K, 1 strain). The complete sequences of all plasmids carrying  $bla_{TEM-135}$ ,  $bla_{TEM-1}$  variants and 4 plasmids  $bla_{TEM-1}$  were compared. The  $bla_{TEM-135}$  alleles were carried on plasmids homologous to the pJD4 (Asian, 7.4-kb) or pDJ7 (Toronto/Rio, 5.2-kb) plasmids described previously. On the contrary, other TEM alleles were carried on pDJ5 (African, 5.5-kb) plasmids. According to NG-MAST, 18 ST types were found and 10 ST were observed for NG producing TEM-135.

#### **Conclusion:**

This work illustrates the recent evolution of plasmid-encoded  $bla_{TEM}$  found from *N. gonorrhoeae* and highlights their localisation in several genetic backgrounds. As the mutation M182T has

been described as a stabilizing mutation, this study suggests a possible emergence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase in NG.

- **Molecular epidemiology of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in France. Gueret D, Guillard T, Berçot B, La Ruche G, Goubard A, Sednaoui P, Cambau E. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelone, 8-11 mai 2014**

#### **Objectives:**

*Neisseria gonorrhoeae* (NG) infections are a major public health problem and the incidence of gonorrhoea is increasing with global emergence of multidrug-resistant strains. In France, resistance rate to quinolones was 43 % in 2011. The aim of the study was to characterize the molecular patterns of quinolone resistance among multidrug-resistant strains.

#### **Methods:**

Eighty-five clinical isolates of NG with a reduced susceptibility to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporins (C3G) and 20 additional clinical isolates with low level of resistance to ciprofloxacin (MICs < 4 mg/L) were investigated for resistance mechanisms to quinolones. Strains were screened by pyrosequencing for the presence of mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDR) in the DNA gyrase *gyrA* and Topoisomerase IV *parC* genes. The *gyrB* and *parE* genes and plasmid mediated resistance to quinolones determinants [*aac(6')Ib-cr*, *qepA* and *qnr* genes] were sought using real-time PCR and HRM. Molecular epidemiology typing was performed by the reference Multi-Antigen Sequence Typing (NG-MAST) method.

#### **Results:**

All 85 isolates with a reduced sensitivity to 3<sup>rd</sup> generation cephalosporin were resistant to fluoroquinolones with MICs of ciprofloxacin ranging from 1.5 to  $\geq 32$ mg/L. Resistance was associated to at least two mutations in the QRDRs of *gyrA* and *parC*. A predominant genotype (80%) was observed with the substitution of Ser91Phe and Asp95Gly in GyrA and Ser87Arg in ParC. Ten isolates harboured a novel genotype with a novel substitution in ParC (Ser88Pro). Mutation in the QRDR of ParE (Pro439Ser) was found for two strains. Detections of *qnr*, *aac6'Ibcr*, *qepA* genes remained negative. Genotyping analysis found 17 different STs. The ST1407, known as a multiresistant clone currently circulating in Europe, was predominant (34.7 %) followed by the ST3168 (11%) previously described in isolates from India.

For the 20 isolates with a low level resistance to ciprofloxacin, the increase in MIC was related to the number of mutations in the QRDRs: CIP MIC was 0.094 mg/L for the strain with one *gyrA* mutation; MIC ranged from 0.19 to 1.5 mg/L for 10 strains with two mutations; MIC ranged from 1 to 4 mg/L for 2 strains harbouring three mutations.

#### **Conclusions:**

Our study shows that resistance of *N. gonorrhoeae* to quinolones in France is based not only on the dissemination of two clones ST 1407 and ST 3168 (in 44.7% cases) but also on unique isolates selected under treatment in 55.3% cases.

## Annexe 4: DETAILS DU CONTROLE DE QUALITE NATIONAL

Cette analyse des résultats de ce contrôle externe de la qualité a été rédigée par Mme Fromage (ANSM). L'ensemble des résultats sera publié dans les Annales du contrôle national de qualité (disponible sur le site de l'ANSM)

### Définition des échantillons

Deux échantillons contenant chacun une souche de *Neisseria gonorrhoeae* lyophilisée ont été proposés. Il était demandé aux laboratoires participants de tester la sensibilité de la souche isolée vis-à-vis de 8 antibiotiques définis et, pour chacun d'eux, d'indiquer par « Oui » ou par « Non », si une CMI était systématiquement effectuée au laboratoire.

En complément de l'antibiogramme, les laboratoires devaient préciser si la souche testée était productrice d'une  $\beta$ -lactamase ou si elle était de sensibilité diminuée aux  $\beta$ -lactamines.

Par ailleurs, dans le cas où cet examen était réalisé en routine dans leur laboratoire, il était demandé aux participants de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de trois bêta-lactamines (pénicilline G, ceftriaxone, céfixime) et d'une fluoroquinolone au choix (ciprofloxacine ou ofloxacine), puis d'interpréter les CMI obtenues en termes de catégorisation clinique (S, I ou R).

Les numéros des échantillons ainsi que les résultats du CNR *Neisseria gonorrhoeae* (Dr B. BERCOT, Paris) et des experts (Pr C. de CHAMPS, Reims et Pr G. LINA, Lyon) - obtenus pour chacune de ces deux souches par la méthode de diffusion en milieu gélosé sont présentés dans le tableau I. Les recommandations techniques du CA-SFM ont été suivies : gélose chocolat PolyVitexensemencée par une suspension McFarland 0,5 (suspension inoculum McFarland 1 diluée au 1/100) et incubation sous 5% CO<sub>2</sub>. La détermination des CMI lorsqu'elle était nécessaire a été réalisée par la méthode du E-Test. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.

La souche du lot 1 était  $\beta$ -lactamase positive, résistante aux fluoroquinolones (résistance « contact » à l'acide nalidixique) et à la tétracycline. La souche du lot 2 était  $\beta$ -lactamase négative mais de sensibilité diminuée aux  $\beta$ -lactamines, résistante aux fluoroquinolones (résistance « contact » à l'acide nalidixique) et à la tétracycline (résistance chromosomique de bas niveau).

### Renseignements cliniques

Les renseignements cliniques qui accompagnaient les échantillons étaient les suivants :  
« Mr Y, âgé de 26 ans, présente quelques jours après un rapport sexuel non protégé, une urétrite aigue purulente. Son médecin traitant lui prescrit un prélèvement urétral avec recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et mycoplasmes uro-génitaux à pratiquer rapidement dans un LBM, avant de débiter le traitement probabiliste comportant une injection IM de 500 mg de ceftriaxone et de 1 g d'azithromycine per os. Le médecin demande au laboratoire d'effectuer un antibiogramme en cas d'isolement de gonocoque. Les cultures au laboratoire sont positives à *Neisseria*. »

## Résultats des experts

**Tableau I -** Antibiogramme des deux souches de *N. gonorrhoeae* : résultats des experts

		<b><i>N. gonorrhoeae</i> (Lot 1)</b>	
<b>N° des échantillons</b>		160, 212, 391, 661, 528, 573, 747, 996	
<b>Antibiotiques</b>	Résultat lu	Résultat transmis	Commentaires
Pénicilline G	R	R	* : résistance exceptionnelle. A l'heure actuelle, aucune souche « R » décrite en France. ** : la détection d'une sensibilité diminuée ou d'une résistance aux fluoroquinolones est effectuée à l'aide d'un disque d'acide nalidixique 30 µg. Si diamètre < 25 mm, mesurer obligatoirement les CMI de l'ofloxacine ou de la ciprofloxacine pour rendre un résultat (absence de diamètres critiques). *** : diamètre < 19 mm et CMI = 24 mg/l
Céfixime	S	S	
Ceftriaxone	S	S	
Spectinomycine	S	S *	
Ciprofloxacine	R	R **	
Ofloxacine	R	R **	
Tétracycline	R	R ***	
Azithromycine	S	S	

		<b><i>N. gonorrhoeae</i> (Lot 2)</b>	
<b>N° des échantillons</b>		129, 250, 276, 488, 510, 845, 927, 935	
<b>Antibiotiques</b>	Résultat lu	Résultat transmis	Commentaires
Pénicilline G	I	I	* : Pour les C3G, en l'absence de diamètres critiques, faire obligatoirement une CMI (détection sensibilité diminuée). ** : résistance exceptionnelle. A l'heure actuelle, aucune souche « R » décrite en France. *** : diamètre d'inhibition = 25 mm (> 19 mm) mais CMI = 1,5 - 2 mg/l. La résistance chromosomique de bas niveau est difficilement détectable par la méthode des disques. Détermination de la CMI recommandée en cas de traitement par les cyclines.
Céfixime	R	R *	
Ceftriaxone	R	R *	
Spectinomycine	S	S **	
Ciprofloxacine	R	R	
Ofloxacine	R	R	
Tétracycline	-	- ***	
Azithromycine	S	S	



**Tableau II** - Antibiogramme des deux souches de *N. gonorrhoeae* / CMI : résultats des experts

Antibiotiques	<i>N. gonorrhoeae</i> (Lot 1)		<i>N. gonorrhoeae</i> (Lot 2)	
	CMI (mg/l)	interprétation	CMI (mg/l)	interprétation
Pénicilline G	4 - 6	R (CMI > 1)	0,38 - 0,5	I (0,06 < CMI ≤ 1)
Céfixime	< 0,016	S (CMI ≤ 0,12)	2	R (CMI > 0,12)
Ceftriaxone	< 0,016	S (CMI ≤ 0,12)	1	R (CMI > 0,12)
Spectinomycine	8	S (CMI ≤ 64)	8	S (CMI ≤ 64)
Ciprofloxacine	0,38 - 0,5	R (CMI > 0,06)	> 32	R (CMI > 0,06)
Ofloxacine	0,75 - 1	R (CMI > 0,25)	> 32	R (CMI > 0,25)
Tétracycline	24	R (CMI > 1)	1,5 - 2	R (CMI > 1)
Azithromycine	0,064	S (CMI ≤ 0,25)	0,125	S (CMI ≤ 0,25)

## Résultats des participants

Les réactifs utilisés dans les laboratoires pour la réalisation de l'antibiogramme du gonocoque et pour la détermination précise des CMI sont détaillés respectivement dans les tableaux III et IV.

Les résultats obtenus par les participants, tous réactifs confondus, sont rapportés respectivement dans les tableaux V et VI selon la souche considérée, tandis que les réponses au questionnaire sur les  $\beta$ -lactamines ( $\beta$ -lactamase ? Sensibilité diminuée aux  $\beta$ -lactamines ?) sont regroupées dans le tableau VII. La réponse attendue apparaît en gras.

Par ailleurs, pour chacun des 8 antibiotiques listés, les réponses des participants à la question « CMI effectuée systématiquement au laboratoire ? Oui/Non » sont rapportées dans le tableau VIII.

Enfin, la distribution des CMI trouvées pour les trois  $\beta$ -lactamines et la fluoroquinolone au choix ([PEN], [CRO], [CFM], [CIP]/[OFX]) ainsi que les interprétations (S, I ou R) en fonction de la CMI trouvée sont rapportées dans les tableaux IX et X, respectivement pour le gonocoque du lot 1 et celui du lot 2.

**Tableau III** - Antibiogramme *N. gonorrhoeae* : réactifs utilisés

Réactifs	effectif
Disques BIORAD	391
Disques i2a	59
Bandelettes E-test BIOMERIEUX	58
Disques OXOID	31
Disques BIOMERIEUX	27
ATB Haemo EU BIOMERIEUX	16
Neosensitabs EURO BIO	15
Bandelettes M.I.C.E OXOID	8
Multidisk SOBIODA	3
Bandelette I2a	2
Vitek 2 BIOMERIEUX	1
Disques MAST DIAG.	1
Sensititre BIOCENTRIC	1
Non précisé	46 *
Total	659

\* : dont 36 laboratoires ayant réalisé uniquement une recherche de  $\beta$ -lactamase

**Tableau IV** - CMI des  $\beta$ -lactamines et des fluoroquinolones : effectifs et bandelettes utilisées

antibiotiques	Bandelettes :				
	E- test Biomérieux	M.I.C.E Oxoid	i2a	Non précisé	total
Pénicilline G	293	71	14	35	413
Ceftriaxone	271	55	11	27	364
Céfixime	91	2	6	3	102
Ciprofloxacine	224	39	12	8	283
Ofloxacine	28	0	1	0	29

**Tableau V** - Antibiogramme *N. gonorrhoeae* lot 1 : résultats des participants

Antibiotiques	lus				transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
Pénicilline G	273	5,5	8,4	<b>86,1</b>	300	3,0	2,3	<b>94,7</b>
Céfixime	126	<b>94,4</b>	0,8	4,8	128	<b>93,0</b>	2,3	4,7
Ceftriaxone	247	<b>98,0</b>	0,0	2,0	271	<b>95,6</b>	1,1	3,3
Spectinomycine	140	<b>95,0</b>	0,7	4,3	141	<b>95,0</b>	0,7	4,3
Ciprofloxacine	233	27,0	8,6	<b>64,4</b>	250	20,4	5,6	<b>74,0</b>
Ofloxacine	111	26,1	17,1	<b>56,8</b>	122	17,2	11,5	<b>71,3</b>
Tétracycline	281	7,8	1,1	<b>91,1</b>	283	7,4	0,7	<b>91,9</b>
Azithromycine	73	<b>98,6</b>	0,0	1,4	75	<b>98,7</b>	0,0	1,3

**Tableau VI** - Antibiogramme *N. gonorrhoeae* lot 2 : résultats des participants

Antibiotiques	lus				transmis			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
Pénicilline G	259	30,9	<b>61,0</b>	8,1	258	18,6	55,8	25,6
Céfixime	114	57,0	5,3	37,7	119	46,2	7,6	<b>46,2</b>
Ceftriaxone	226	42,9	4,4	52,7	231	36,4	9,1	<b>54,5</b>
Spectinomycine	150	<b>96,7</b>	0,0	3,3	146	<b>97,3</b>	0,0	2,7
Ciprofloxacine	248	4,8	0,8	<b>94,5</b>	252	5,1	1,2	<b>93,7</b>
Ofloxacine	155	5,2	0,6	<b>94,2</b>	167	5,4	1,2	<b>93,4</b>
Tétracycline	266	<b>91,4</b>	0,7	7,9	259	<b>90,7</b>	0,8	8,5
Azithromycine	70	<b>85,7</b>	5,7	8,6	68	<b>85,3</b>	5,9	8,8

**Tableau VII** - Questionnaire complémentaire

<i>N. gonorrhoeae</i> lot 1	Réponse attendue	Réponses des 338 participants		
		-	Oui	Non
La souche testée est :				
- productrice d'une $\beta$ -lactamase ?	OUI	12	<b>298</b>	28
- de sensibilité diminuée aux $\beta$ -lactamines ?	NON	70	139	<b>129</b>

<i>N. gonorrhoeae</i> lot 2	Réponse attendue	Réponses des 321 participants		
		-	Oui	Non
La souche testée est :				
- productrice d'une $\beta$ -lactamase ?	NON	4	43	<b>274</b>
- de sensibilité diminuée aux $\beta$ -lactamines ?	OUI	38	<b>217</b>	66

**Tableau VIII** - Réponses à la question « CMI effectuée systématiquement au laboratoire ? »

Antibiotiques	CMI effectuée systématiquement au laboratoire ?		
	Oui	Non	Pas de réponse
Pénicilline G	386	182	92
Céfixime	91	326	243
Ceftriaxone	331	215	114
Spectinomycine	22	390	248
Ciprofloxacine	245	290	125
Ofloxacine	42	360	258
Tétracycline	21	465	174
Azithromycine	50	301	309

**Tableau IX - *N. gonorrhoeae* lot 1 : distribution des CMI et catégorisation clinique en fonction de la CMI**

<b>PENICILLINE G</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
≤ 0,06	1			1	
0,12	1			1	
0,5	3		2	1	
0,75	8		6	2	
1	7		1	5	1
2	48	1		47	
4	73			73	
8	30			30	
16	13			13	
≥32	24			24	
total	208	1	9	197	1

<b>CEFTRIAXONE</b>		Interprétation CMI		
CMI (mg/l)	effectif	I	R	S
< 0,016	80			80
0,016	59		1	58
0,032 - 0,12	44			44
> 0,12	7	1	3	3
total	190	1	4	185

<b>CEFIXIME</b>		Interprétation CMI		
CMI (mg/l)	effectif	I	R	S
< 0,016	19			19
0,016	24			24
0,032 - 0,12	8			8
> 0,12	4		4	
total	55	0	4	51

<b>CIPROFLOXACINE</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
≤ 0,03	3				3
0,06	2			2	
0,12	5			5	
0,25	27			27	
0,38	27			26	1
0,5	46			45	1
0,75	36	1	1	33	1
≥ 1	10			10	
total	156	1	1	148	6

<b>OFLOXACINE</b>		Interprétation CMI		
CMI (mg/l)	effectif	I	R	S
≤ 0,12	1			1
0,5	3		3	
0,75	5		5	
≥ 1	8		8	
total	17	0	16	1

**Tableau X - *N. gonorrhoeae* lot 2 : distribution des CMI et catégorisation clinique en fonction de la CMI**

<b>PENICILLINE G</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
≤ 0,06	3			1	2
0,12	8		6	2	
0,19	10		8	2	
0,25	45		42	2	1
0,38	43		35	5	3
0,5	70	2	63	4	1
0,75	13		12	1	
1	10		9	1	
>1	3			3	
total	205	2	175	21	7

<b>CEFTRIAXONE</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
≤ 0,12	6				6
0,25	7		2	3	2
0,5	19	1	3	13	2
0,75	29	1	7	20	1
1	60		7	52	1
1,5	27	2		25	
2	18	1		17	
> 2	8		1	6	1
total	174	5	20	136	13

<b>CEFIXIME</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
≤ 0,12	1				1
0,25	1			1	
0,5	1			1	
0,75	2		2		
1	2			2	
1,5	7	1		6	
2	24			23	1
> 2	8			8	
total	46	1	2	41	2

<b>CIPROFLOXACINE</b>		Interprétation CMI			
CMI (mg/l)	effectif	pas réponse	I	R	S
0,12	1			1	
2	3			3	
4	6			6	
8	20	1		18	1
12	12			12	
16	16			16	
32	28			28	
> 32	41			41	
total	127	1	0	125	1

<b>OFLOXACINE</b>		Interprétation CMI		
CMI (mg/l)	effectif	I	R	S
8	2		2	
12	2		2	
16	3		3	
32	2		2	
> 32	3		3	
total	12	0	12	0

---