



Actualités sur le diagnostic microbiologique des IST

Dr Agathe GOUBARD



CNR des
gonocoques



Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Intervenant : GOUBARD Agathe

L'orateur ne souhaite pas répondre

- Consultant ou membre d'un conseil scientifique
- Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents
- Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations
- Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

OUI NON

OUI NON

OUI NON

OUI NON

IST généralités

- **Monde :**

- > 1 million de cas/ jour
- 357 millions infections/ an : Trichomonas, Chlamydia, Gonocoque & Syphilis (15-49 ans)

WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Actualisation Dec. 2015

- **Europe**

- 385 000 cas rapportés en 2013 (Chlamydia, Gonocoque & Syphilis)
- Stabilisation des cas d'infections à Chlamydia mais augmentation du nombre de cas de gonococcies et de syphilis

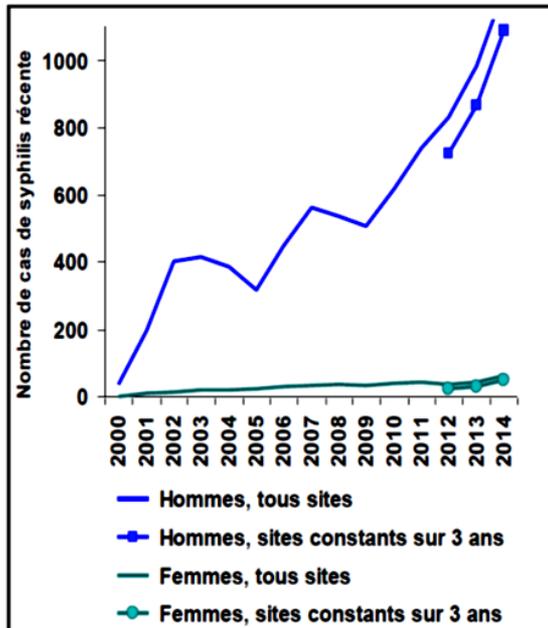
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013.pdf>

- **France :**

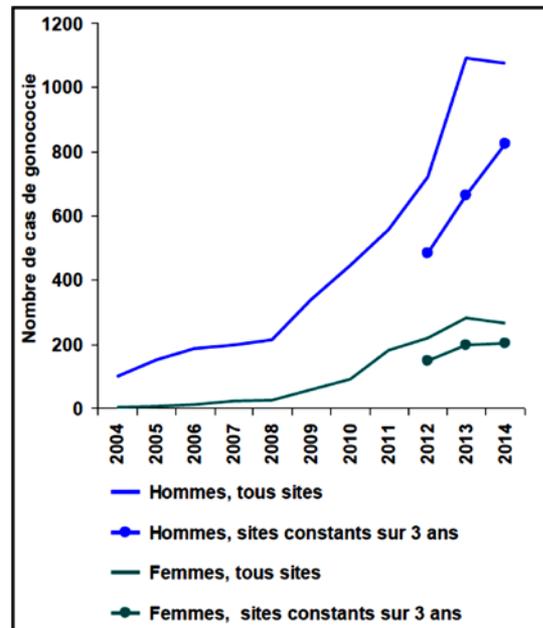
- Absence de déclaration obligatoire pour l'ensemble des IST donc données non exhaustives mais surveillance par réseaux sentinelles volontaires
 - RésIST: cliniciens -Syphilis et gonococcies depuis 2004
 - Rénago: laboratoires – *Neisseria gonorrhoeae* (NG)
 - Rénachla: laboratoires – *Chlamydia trachomatis* (CT)

IST généralités

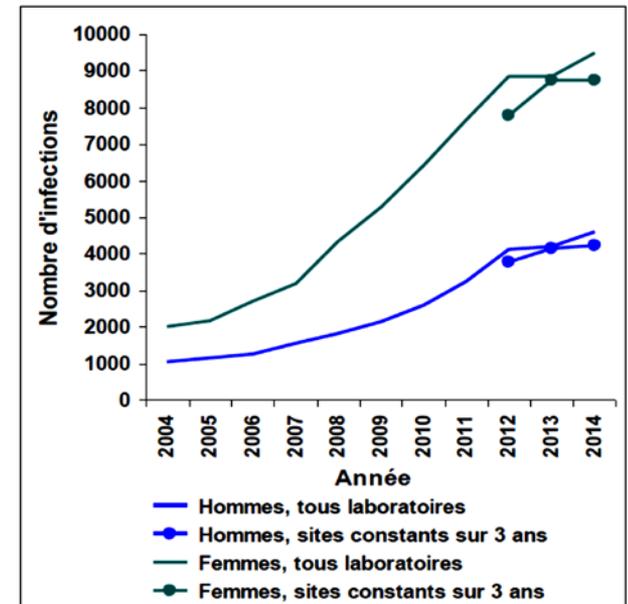
Évolution du nombre de cas de syphilis récente selon le sexe, réseau RésIST, France, 2000-2014



Évolution des nombres de cas de gonococcie, réseau des cliniciens RésIST, France, 2004-2014



Évolution du nombre d'infections uro-génitales à *Chlamydia* et de laboratoires participants selon le sexe, réseau Rénachla, France, 2004-2014



Bulletin épidémiologique données 2014. InVS; Dec. 2015

Augmentation des cas de Syphilis et de gonococcies, surtout chez les HSH
(resp 84% et 62% des cas)

Stabilisation du nombre d'infections Chlamydia mais forte progression des LGV rectales
(HSH : 98%)

IST généralités

- Augmentation du nombre de cas d'IST depuis le début des années 2000
- Infections asymptomatiques ou pauci-symptomatiques
- complications +++ (Salpingites, prostatites, ↓ fertilité, neurosyphilis...)
- Augmentation du risque de transmission du VIH
- Augmentation des résistances (*N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*..)
- Pénurie d'antibiotiques (arrêts commercialisation, peu de nouveaux ATB)

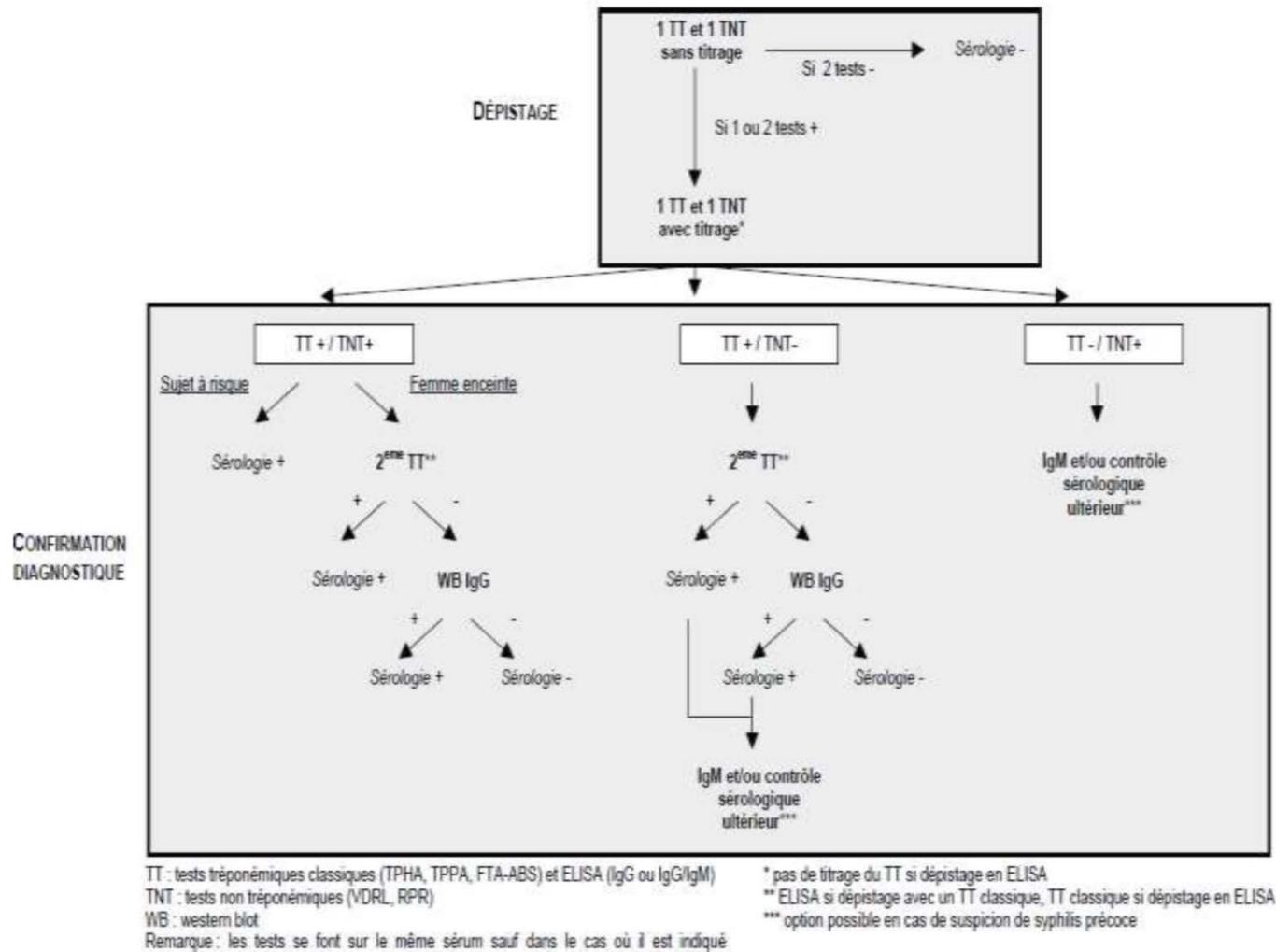
IST = Enjeu majeur de santé publique

Intérêt +++ du dépistage précoce

Développement d 'outils et de stratégies diagnostiques adaptés

Actualités sur le diagnostic sérologique de la Syphilis

Syphilis: Algorithme en vigueur (NABM)



Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de recherche du *Treponema pallidum* (bactérie responsable de la syphilis). HAS. Juin 2015

Syphilis: évolutions des recommandations diagnostiques

HAS

HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

ARGUMENTAIRE

Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de recherche du *Treponema pallidum* (bactérie responsable de la syphilis)

Mai 2015

Déjà plusieurs recommandations d'algorithmes avec un seul test de dépistage

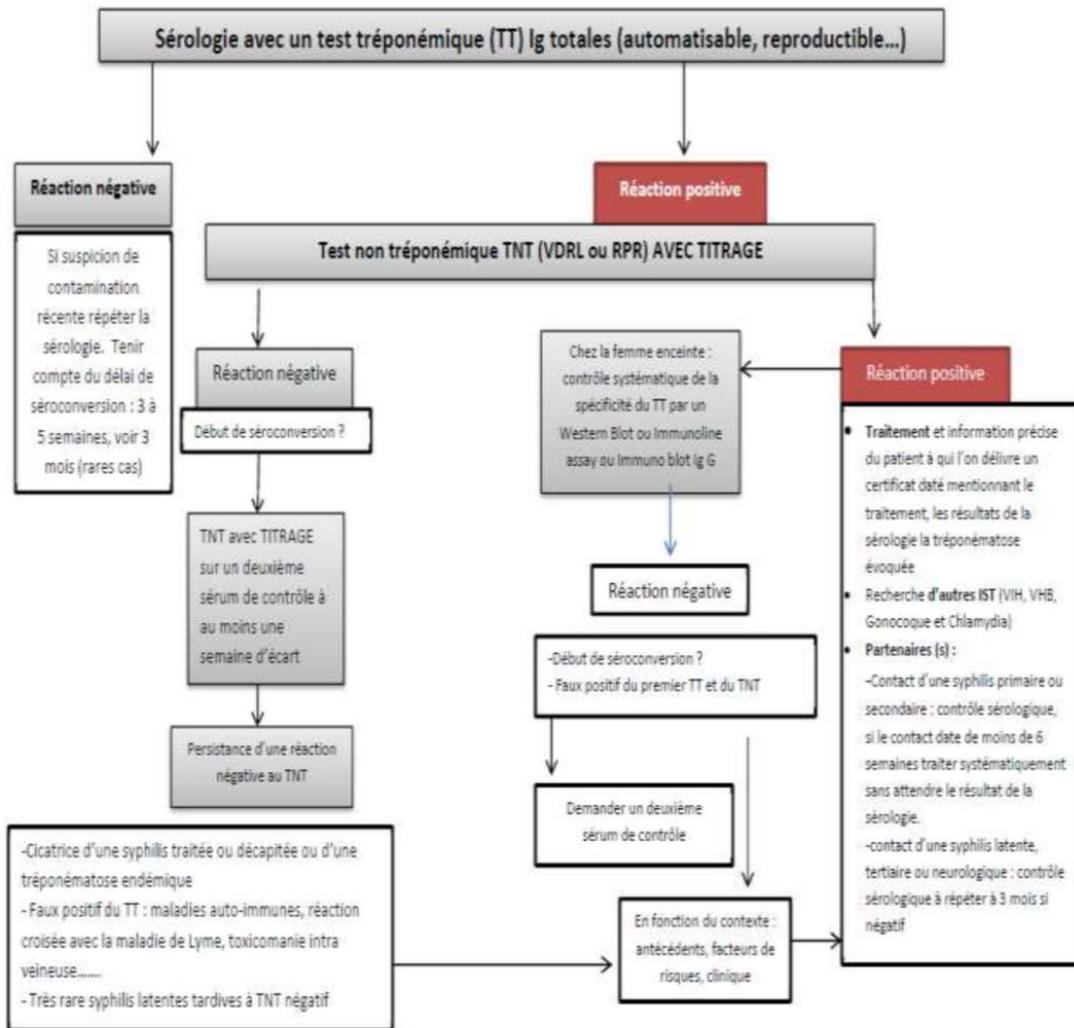
Association of Public Health Laboratory. Laboratory diagnostic testing for Treponema meeting summary report, January 13-15, 2009. Association of Public Health Laboratories, Silver Spring, MD.

BUT: remplacement de l'association systématique d'un TT et d'un TNT, par un seul test tréponémique sur Ig totales avec une méthode reproductible et automatisable:

- ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- EIA (*Enzyme ImmunoAssays*)
- CMIA (*Chemiluminescent Magnetic microparticle ImmunoAssay*)

Très sensibles + nombreux avantages pratiques liés à l'automatisation

Syphilis: évolutions des recommandations diagnostiques



→ **Un seul TT**

Si TT positif : TNT + titrage (distinction entre syphilis active et cicatrice sérologique)

Si discordance : pas de 2^e TT → contrôle à au moins une semaine d'intervalle

Mise en application: en attente de l'évolution de la NABM

Evaluation of the ADVIA Centaur® Syphilis Assay in Routine Conditions for the Diagnosis of Syphilis

P. Sednaoui, L. Monfort, J. Broyon, A. Goubard
Institut Alfred Fournier, Laboratoire, Paris, France

→ Comparaison techniques manuelles/ELISA automatisé (Antigènes recombinants Tp15 et Tp17) : TPHA/RPR (Biorad et Biomérieux) vs EIA Centaur Siemens

1074 patients prélevés au laboratoire ou centre de dépistage (CDAG ou CiddIST)

		TPHA and RPR consensus	
		POS	NEG
ADVIA Centaur Syphilis	POS	157	2
	NEG	0	913

- Sensibilité : 100%
- Spécificité initiale: 99,78%
- 2 discordants :
 - 1 patient : TPHA/VDRL négatifs mais fond noir positif sur chancres
 - 1 patient : TPHA/VDRL négatifs sans symptomatologie clinique, pas de sérologie de contrôle → réaction non spécifique? FP?
- Spécificité finale: 99,89%

Sensibilité et spécificité +++ à tous les stades de l'infection

Avantages de l'automatisation: gain de temps (résultats dans les deux heures), diminution du risque d'erreur d'identité/techniques manuelles

Pas de corrélation entre la valeur du signal et le titre VDRL ou TPHA
(interprétation du titre à évaluer selon les techniques)

Possible précocité du test/ techniques manuelles: réduction de la fenêtre sérologique (1-2J)?

Actualités sur le diagnostic des IST: Techniques moléculaires TAAN

Nouveaux outils diagnostiques TAAN

- Tests d'Amplification des Acides Nucléiques : TAAN (PCR et autres techniques d'amplification)
 - Duplex (CT/NG)
 - Triplex (CT/NG/MG ou CT/NG/TV)
 - Multiplex
 - Techniques « maison » ou systèmes commercialisés (complets (test+automate) ou partiels (kits seuls))
 - Approches syndromiques ou « globales » (infections uro-génitales)

Master Panel1 For screening cervicitis, urethritis, trichomoniasis and PID	Master Panel2 For screening of bacterial vaginosis	Master Panel3 For detection of candidiasis
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Trichomonas vaginalis</i> - <i>Mycoplasma hominis</i> - <i>Mycoplasma genitalium</i> - <i>Chlamydia trachomatis</i> (CE0086) - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Ureaplasma urealyticum/parvum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Gardnerella vaginalis</i> - <i>Bacteroides fragilis</i> - <i>Mobiluncus curtisii</i> - <i>Aptopobium vaginae</i> - <i>Mobiluncus mulieris</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Candida glabrata</i> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Candida parapsilosis</i> - <i>Candida krusei</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Candida dubliniensis</i>
Master Panel4 For detection of trichomoniasis and typing of HSV	Master Panel5 For diagnosis of soft-chancroid, hard-chancroid, ulcer and GBS	
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Trichomonas vaginalis</i> - Herpes Simplex Virus 1 - Herpes Simplex Virus 2 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Cytomegalovirus</i> (CMV) - <i>Treponema pallidum</i> - <i>Haemophilus ducreyi</i> - Group B <i>Streptococcus</i> (GBS) - <i>Lymphogranuloma venereum</i> (LGV) 	

FTD Urethritis basic €€ 0123

One tube multiplex for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* and internal control.

FTD Urethritis plus €€ 0123

Two tube multiplex for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and internal control.

FTD STD9 €€ 0123

Two tube multiplex for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, *Gardnerella vaginalis*, herpes simplex virus 1/2 and internal control.

FTD Vaginal swab €€ 0123

Two tube multiplex for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, herpes simplex virus 1, 2, *Treponema pallidum* and internal control.

FTD Gonorrhoeae confirmation €€

One tube multiplex - two separate targets - for detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* and internal control.

FTD Genital ulcer €€

One tube multiplex for detection of herpes simplex virus 1, 2, *Treponema pallidum* and internal control.

Seeplex®STI Master ACE Detection

Fast track® DIAGNOSTIC

Assessment of Coinfection of Sexually Transmitted Pathogen Microbes by Use of the Anyplex II STI-7 Molecular Kit

© B. Berçot,^{a,b,c} R. Amarsy,^{a,b,c} A. Goubard,^d C. Aparicio,^e H. U. Loeung,^e C. Segouin,^f D. Gueret,^a H. Jacquier,^{a,b,c} F. Meunier,^a F. Mougari,^{a,b,c} E. Cambau^{a,b,c}



→ Comparaison avec TAAN ou culture sur 202 échantillons de patient

- *Chlamydia trachomatis* (CT) (CE0086)
- *Neisseria gonorrhoeae* (NG)
- *Trichomonas vaginalis* (TV)
- *Mycoplasma hominis* (MH)
- *Mycoplasma genitalium* (MG)
- *Ureaplasma urealyticum* (UU)
- *Ureaplasma parvum* (UP)

TABLE 1 Performances of molecular detection by Anyplex STI-7 for *N. gonorrhoeae* (NG) and *C. trachomatis* (CT) compared to those by Abbott RT CT/NG assays and for *U. urealyticum* to *U. parvum* and *M. hominis* results compared with cultures from 202 patients^a

Assays compared	Sensitivity	Specificity	PPV ^b	NPV ^c	Concordance	Kappa
NG STI7 vs NG Abbott ^b	90 (86–94)	98.4 (NA)	90 (85.9–94.1)	98.4 (NA)	97.2 (94.9–99.5)	88.4 (84–92.8)
CT STI7 vs CT Abbott	85.1 (80.4–89.9)	97.8 (NA)	95.5 (92.6–98.3)	92.5 (88.9–96.1)	93.4 (90–96.8)	85.1 (80.3–90)
UU or UP vs culture ^d	83.3 (74.9–91.8)	76.5 (66.9–86.1)	62.5 (51.3–73.7)	90.7 (84–97.4)	78.7 (69.2–88.1)	55 (43.5–66.4)
MH vs culture	70 (59.7–80.3)	97 (NA)	77.8 (68.2–87.3)	95.5 (NA)	93.4 (87.7–99.1)	69.9 (59.4–80.5)

^a Values are % (95% confidence interval).

^b PPV, positive predictive value; NA, nonapplicable, when statistical analysis cannot be performed.

^c NPV, negative predictive value.

^d Results of molecular method from UU and UP are compared together with those of cultures because UU and UP cannot be differentiated by cultures.

Sensibilité et spécificité variables selon les germes

Intérêt économique (si coût multiplex = coût duplex)

Difficultés d'interprétation pour certains germes mais Intérêt pour études de prévalence (infections et co-infections)

Nouveaux outils diagnostiques TAAN

- **Intérêts :**
 - Dépistage simultané de plusieurs pathogènes
 - Réduction des coûts (réactifs et temps technique)
 - Gain de temps (dépend du nombre de séries /semaine, des capacités de chargement...)
 - Automatisation (pour systèmes commercialisés)
 - Outils épidémiologiques intéressants (co-infections)

- **Difficultés :**
 - Choix des panels (pathogènes vrais, fonctions de l'épidémiologie locale)
 - Difficultés d'interprétation pour certains germes (Mycoplasmes/absence de quantification)
 - Problème de seuil de détection/sensibilité pour panels avec trop nombreux germes (21??)
 - Problème de coût et de cotations des actes

TAAAN et prélèvements poolés

Infections à *Chlamydia trachomatis* :

5257

Recherche d'ADN ou d'ARN de *Chlamydia trachomatis* par amplification génique *in vitro* sur tout type d'échantillons à partir de sites possiblement infectés

B 85

La recherche de *Chlamydia trachomatis* s'inscrit principalement dans le cadre :

- du diagnostic étiologique et du suivi d'efficacité thérapeutique d'une infection génitale symptomatique haute ou basse ou d'une rectite ;
- du diagnostic étiologique et du suivi d'efficacité thérapeutique d'une conjonctivite ou d'une pneumopathie néonatale ;
- du dépistage des infections génitales asymptomatiques dans des circonstances particulières :
 - dépistage des personnes à risque ;
 - bilan d'hypofertilité ;
- du diagnostic étiologique et du suivi d'efficacité thérapeutique des arthrites réactionnelles.

Un seul site est à analyser sauf dans les cas suivants :

- selon le comportement sexuel : en cas de rapport sexuel anal et/ou pharyngé : rechercher *C. trachomatis* dans les deux ou trois sites : association prélèvements génital, rectal, et/ou pharyngé ;
- si la symptomatologie clinique fait évoquer un syndrome de Fiessinger Leroy Reiter : rechercher *C. trachomatis* dans deux ou trois sites : génital, conjonctival, articulaire ;
- dans l'exploration d'une infection haute, rechercher la bactérie au niveau du col et/ou du haut appareil génital (endomètre, liquide de Douglas, biopsie des trompes, par exemple) : un ou deux sites ;
- dans l'exploration d'une épидидymite, d'une prostatite, d'une infertilité d'origine masculine : rechercher la bactérie dans le premier jet d'urine et dans le sperme ;
- dans l'exploration de la lymphogranulomatose vénérienne (LGV), rechercher dans le ganglion satellite et les éventuelles ulcérations.

Une seule cotation de l'acte 5257 par patient.

Seul le TAAAN chlamydia est inscrit à la nomenclature

→ Problèmes de cotation (et de coût)

→ Prélèvements poolés??

Nomenclature des actes de biologie médicale Avril 2016

TAAAN: prélèvements poolés

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2000, p. 1679-1680
0095-1137/00/\$04.00+0
Copyright © 2000, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 38, No. 4

Acta Derm Venereol 2007; 87: 140-143

INVESTIGATIVE REPORT

Pooling Samples: the Key to Sensitive, Specific and Cost-effective Genetic Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in Low-Resource Countries

Elena SHIPITSYNA¹, Kira SHALEPO¹, Alevtina SAVICHEVA^{1,2}, Magnus UNEMO^{2,3} and Marius DOMEIKA²
¹Laboratory of Microbiology, DO Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, St Petersburg, Russia; ²Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala, and ³Department of Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Sweden

Pooling of Urine Specimens for Detection of Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections by PCR in a Low-Prevalence Population: Cost-Saving Strategy for Epidemiological Studies and Screening Programs

SERVAAS A. MORRÉ,¹ CHRIS J. L. M. MEIJER,¹ CHRISTIAN MUNK,² SUSANNE KRÜGER-KJAER,² JEANETTE F. WINTHER,² HANS O. JØRGENSENS,³ AND ADRIAAN J. C. VAN DEN BRULE^{1*}

¹Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam; ²Department of Pathology, University Hospital Vrije Universiteit, Amsterdam; ³Institute of Cancer Epidemiology, Danish Cancer Society, Institute of Cancer Epidemiology, Danish Cancer Society, Gentofte, Denmark

Table I. Characteristic detection of *Chlamydia trachomatis* in Petersburg, Russia

Parameter
Individual cervical samples
Individual pools tested (n)
Positive pools (n)
Samples or pools inhibited
Samples to be tested totally
Positive samples revealed (n)
Cost to detect one positive ^a
Estimated prevalence (95% CI)
Cost savings for population screening (%)
Cost savings for diagnosis of individual samples (%)
Sensitivity (%)
Specificity (%)

^aSum of 300 pools and individual samples from positive pools (80 × 5).
^bSum of 150 pools and individual samples from positive pools (69 × 10).
^cNumber of samples tested × price per test/number of positive detected.
CI: confidence interval

Privilégier des pools de 5 prélèvements
→ Réduction des coûts sans perte de sensibilité

A évaluer avec chaque technique

Ne répond pas aux normes d'accréditation des laboratoires (ISO15189)

Intérêt pour les pays à faibles ressources et pour le screening des population à faible prévalence

Specimens collected and pooled for the detection of asymptotically infected individuals in a low-prevalence population

	Data for specimens that were:		
	Tested Individually	By 5	By 10
Number of specimens	650	650	650
Number of positive specimens	5	10	10
Number of positive pools	130	65	65
Number of positive samples	25	23	23
Number of positive pools (95% CI)	26	26	25
Number of positive samples (95% CI)	100	96.1	96.1
Number of positive pools (95% CI)	100	100	100
Number of positive samples (95% CI)	4.0	4.2 ^a	4.3 ^a
Number of positive pools (95% CI)	2.5-5.8	2.5-6.0	2.5-6.0
Number of positive samples (95% CI)	80	90	90
Individual case finding (%)	60.5	54	54

^a Estimated by *p* (1).
^b Cost savings estimates are based on the reduced number of tests.

TAAN: prélèvements poolés pour un même patient

- Intérêts:

- Réduction des coûts (réactifs et temps technique)

- Problèmes

- Techniques:

- Problème de validation des méthodes selon le site (validées sur prélèvements génitaux, quid des autres sites?)
- Problème de seuil de détection/sensibilité dilution du prélèvements
- Spécificité des sondes selon sites (NG/ *Neisseria* commensales au niveau pharyngé)
- Dépistage sur pool puis sur tous les prélèvements si positif? (respect de la nomenclature)

- Interprétation

- Difficultés d'interprétation pour certains germes (Mycoplasmes/plvt pharyngé)
- Difficultés de prise en charge (CT souche LGV vs souche non L, gonocoque et pb de diffusion des ATB au niveau pharyngé, etc)

Intérêt principalement économique

Difficultés d'interprétation et de prise en charge
(sauf col+urètre chez femme?)

Non applicable en diagnostic/dépistage

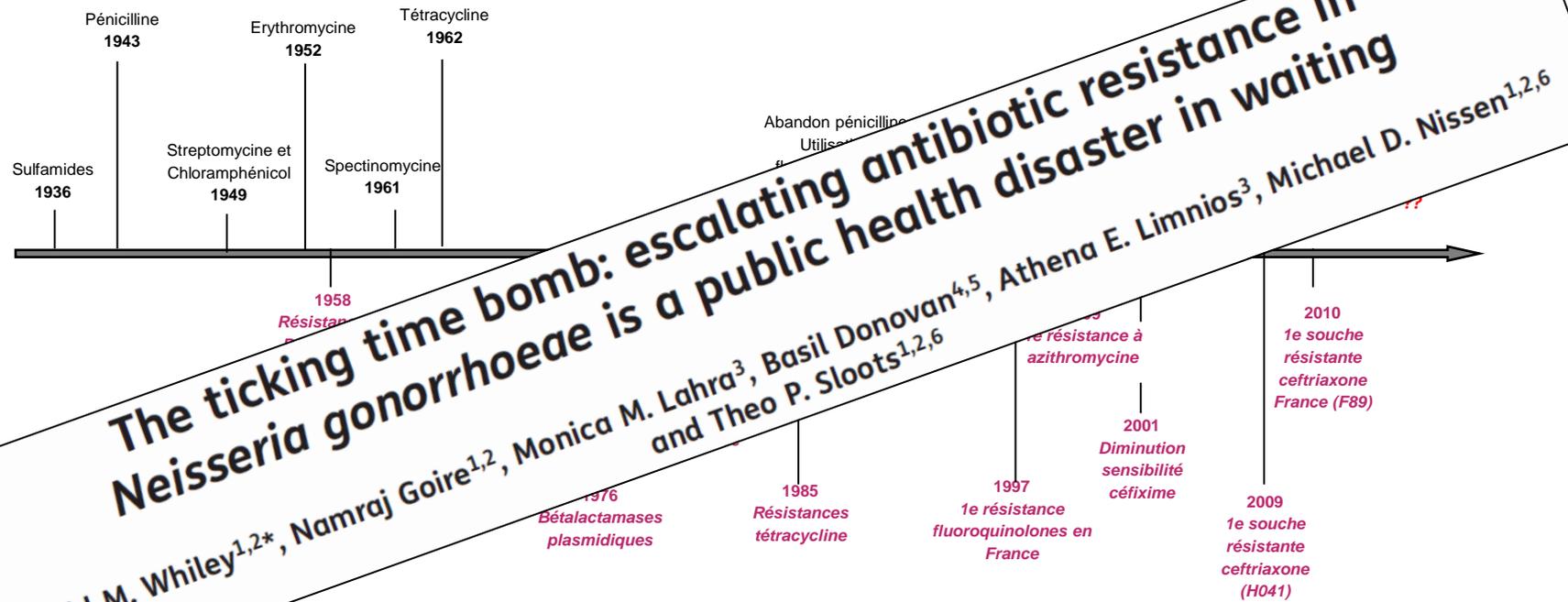
Intérêt +++ d'une évolution rapide de la nomenclature

Actualités sur le diagnostic des IST:

Détection moléculaire de la résistance Exemple du gonocoque

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance

Historique des traitements anti-gonococciques (haut) et de l'évolution des résistances du gonocoque (bas).



Goubard A. Évolution de la résistance du gonocoque en France - EM|consulte [Internet]. [cited 2014 Dec 29]. Available from: <http://www.em-consulte.com/article/944200>

D'après une figure préparée par Paul Johnson et modifiée par Unemo et Shafer⁷.

Etat des lieux de la résistance

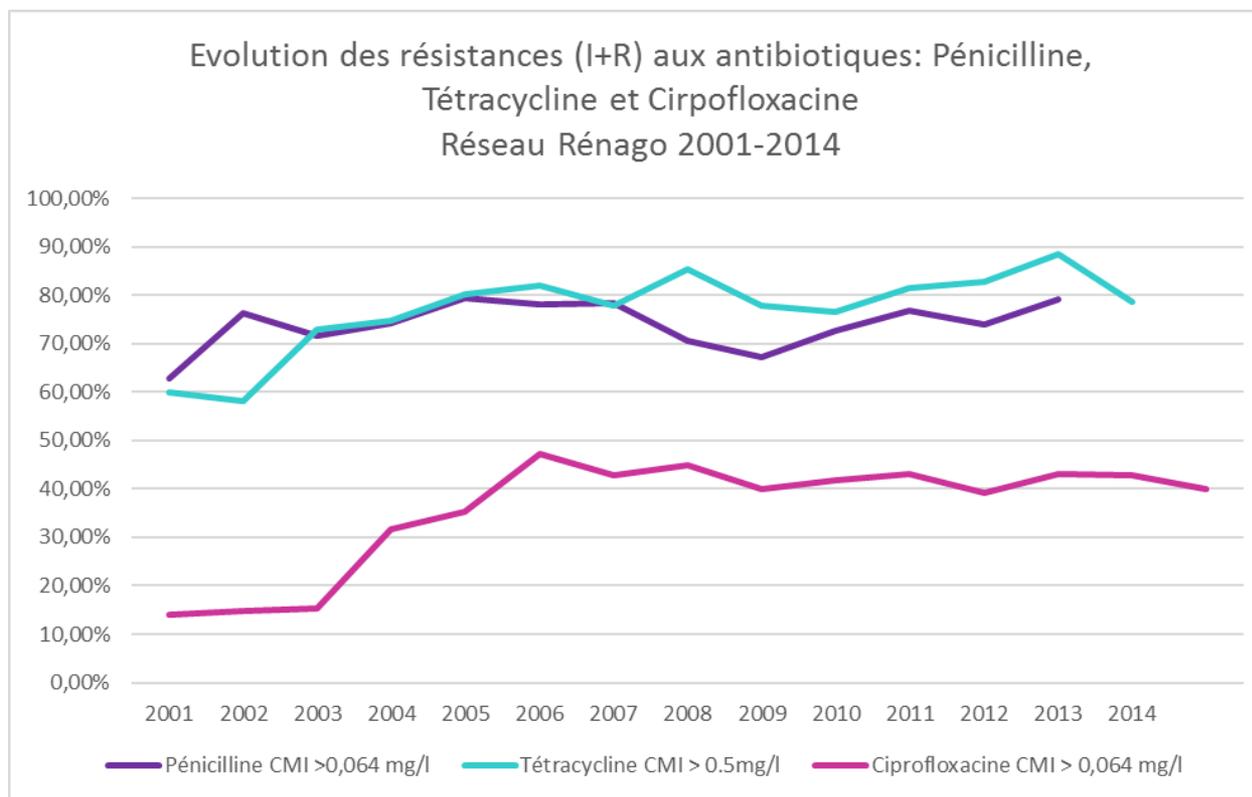
TABLE 1 Resistance determinants and mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* for antimicrobials previously or currently recommended for treatment of gonorrhoea

Antimicrobial class	Resistance determinants/mechanisms
Sulfonamides	Oversynthesis of <i>p</i> -aminobenzoic acid, which dilutes the sulfonamide. Mutations in <i>folP</i> (encoding the sulfonamide target DHPs) reduce target affinity. The <i>folP</i> mutations comprise SNPs or a mosaic <i>folP</i> gene containing sequences from commensal <i>Neisseria</i> spp.
Penicillins (e.g., penicillin G and ampicillin)	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Mutations in <i>penA</i> (encoding the main lethal target PBP2). Traditionally, the mutations were the single amino acid insertion D345 in PBP2 and 4 to 8 concomitant mutations in the PBP2 carboxyl-terminal region, decreasing the PBP2 acylation rate and reducing susceptibility ~6- to 8-fold. In the last decade, many mosaic <i>penA</i> alleles with up to 70 amino acid alterations, also reducing PBP2 acylation, were described. ⇒ Mutations in <i>mtrR</i>, in the promoter (mainly a single nucleotide [A] deletion in the 13-bp inverted repeat sequence) or coding sequence (commonly a G45D substitution), result in overexpression of and increased efflux from the MtrCDE efflux pump. See the text for rarer mutations resulting in increased MtrCDE efflux. ⇒ <i>porB1b</i> SNPs, e.g., encoding G120K and G120D/A121D mutations in loop 3 of PorB1b, reduce influx (<i>penB</i> resistance determinants). Interestingly, the <i>penB</i> phenotype is apparent only in strains with the <i>mtrR</i> resistance determinant. ⇒ A SNP in <i>pilQ</i> (encoding the pore-forming secretin PilQ of the type IV pili), i.e., E666K, reduces influx. Note that this SNP has been found only in the laboratory and is unlikely to be present in clinical isolates, because it disrupts type IV pilus formation, which is essential for pathogenesis. ⇒ A SNP in <i>ponA</i> (encoding the second penicillin target, PBP1), i.e., "ponA1 determinant" (L421P), reduces penicillin acylation of PBP1 ~2- to 4-fold. ⇒ "Factor X," an unknown, nontransformable determinant, increases penicillin MICs ~3- to 6-fold. ⇒ Penicillinase (TEM-1 or TEM-135)-encoding plasmids, i.e., Asian, African, Toronto, Rio, Nimes, New Zealand, and Johannesburg plasmids, hydrolyze the cyclic amide bond of the β-lactam ring and render the penicillin inactive.
Tetracyclines (e.g., tetracycline and doxycycline)	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ A SNP in <i>rpsJ</i> (encoding ribosomal protein S10), i.e., V57M, reduces the affinity of tetracycline for the 30S ribosomal target. ⇒ <i>mtrR</i> mutations (see above). ⇒ <i>penB</i> mutations (see above). ⇒ A SNP in <i>pilQ</i> (see above). ⇒ TetM-encoding plasmids, i.e., American and Dutch plasmids. Evolved derivatives have been described in Uruguay and South Africa. TetM, resembling elongation factor G, binds to the 30S ribosomal subunit and blocks tetracycline target binding.
Spectinomycin	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ A 16S rRNA SNP, i.e., C1192U, in the spectinomycin-binding region of helix 34, reduces the affinity of the drug for the ribosomal target.
Quinolones (e.g., ciprofloxacin and ofloxacin)	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ Mutations in <i>rpsE</i> (encoding the 30S ribosomal protein S5), i.e., the T24P mutation and deletions of V25 and K26E, disrupt the binding of spectinomycin to the ribosomal target. ⇒ <i>gyrA</i> SNPs, e.g., S91F, D95N, and D95G, in the QRDR, reduce quinolone binding to DNA gyrase. ⇒ <i>parC</i> SNPs, e.g., D86N, S88P, and E91K, in the QRDR, reduce quinolone binding to topoisomerase IV. ⇒ Many additional mutations in the QRDR of <i>gyrA</i> and <i>parC</i> have been described. An overexpressed NorM efflux pump also slightly enhances quinolone MICs.
Macrolides (e.g., erythromycin and azithromycin)	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ 23S rRNA SNPs, i.e., C261T and A2059G (in 1 to 4 alleles), result in a 23S rRNA target (peptidyltransferase loop of domain V) with a reduced affinity for the 50S ribosomal macrolide target. ⇒ <i>mtrR</i> mutations (see above). ⇒ <i>erm</i> genes (<i>ermB</i>, <i>ermC</i>, and <i>ermF</i>), encoding rRNA methylases that methylate nucleotides in the 23S rRNA target, block the binding of macrolides. ⇒ MacAB efflux pump; its overexpression increases the MICs of macrolides. ⇒ <i>mef</i>-encoded efflux pump exports macrolides out of the bacterial cell and increases the MICs of macrolides. ⇒ Mosaic <i>penA</i> alleles encoding mosaic PBP2s with a decreased PBP2 acylation rate. These proteins have up to 70 amino acid alterations and are derived from horizontal transfer of partial <i>penA</i> genes from mainly commensal <i>Neisseria</i> spp. Mutations in mosaic PBP2s verified to contribute to resistance are A311V, I312M, V316T, V316P, T483S, A501P, A501V, N512Y, and G545S. The resistance mutations need other epistatic mutations in the mosaic <i>penA</i> allele.
Cephalosporins (e.g., ceftibuten, cefpodoxime, cefixime, cefotaxime, and ceftriaxone)	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ <i>penA</i> SNPs, i.e., A501V and A501T, in nonmosaic alleles can also enhance cephalosporin MICs. Some additional SNPs (G542S, P551S, and P551L) were statistically associated with enhanced cephalosporin MICs, but their effects remain to be proven with, e.g., site-directed <i>penA</i> mutants in isogenic backgrounds. ⇒ <i>mtrR</i> mutations (see above). ⇒ <i>penB</i> mutations (see above). ⇒ "Factor X," an unknown, nontransformable determinant (see above).

Très nombreux gènes impliqués

Niveaux de résistance très variables et interactions complexes

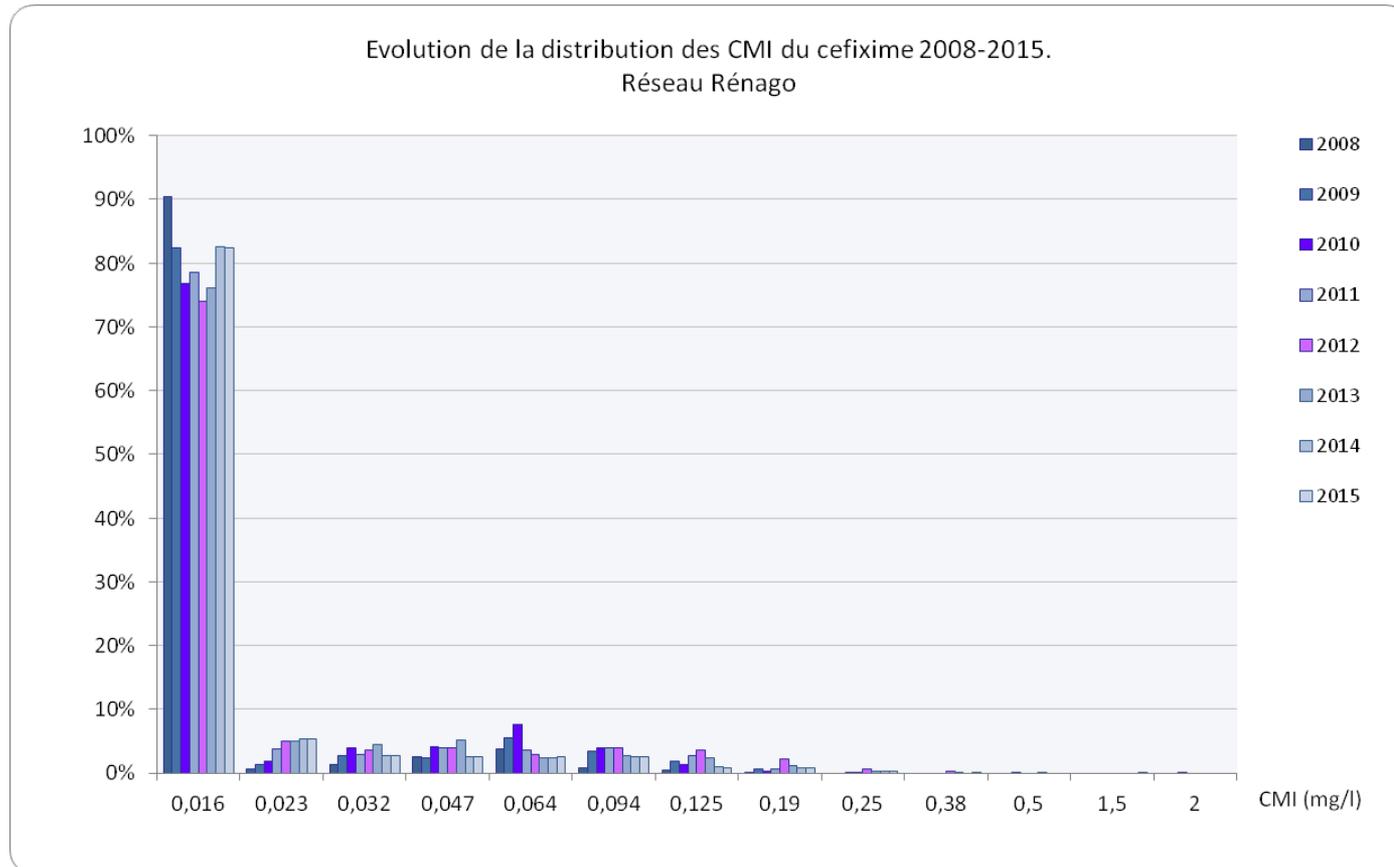
Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Pénicilline, Tétracycline et Ciprofloxacine



Taux de résistance à Pénicilline et Tétracycline stables depuis le début des 2000'
(80%)

Forte augmentation de la proportion de souches résistantes en 2001 et 2006.
Depuis, stabilisation des taux autour de 40%

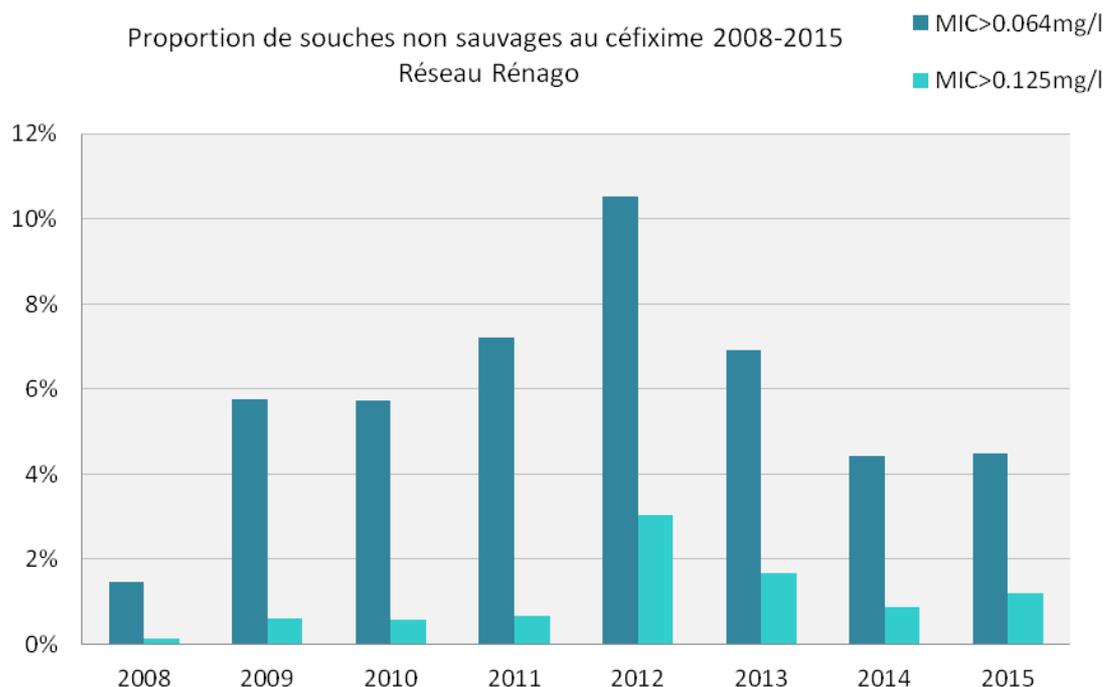
Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Céfixime



Majorité des souches sensible et valeurs de CMI très basses mais augmentation de la proportion de souches avec CMI proches du seuil

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Céfixime

Proportion de souches non sauvages au céfixime 2008-2015
Réseau Rénago



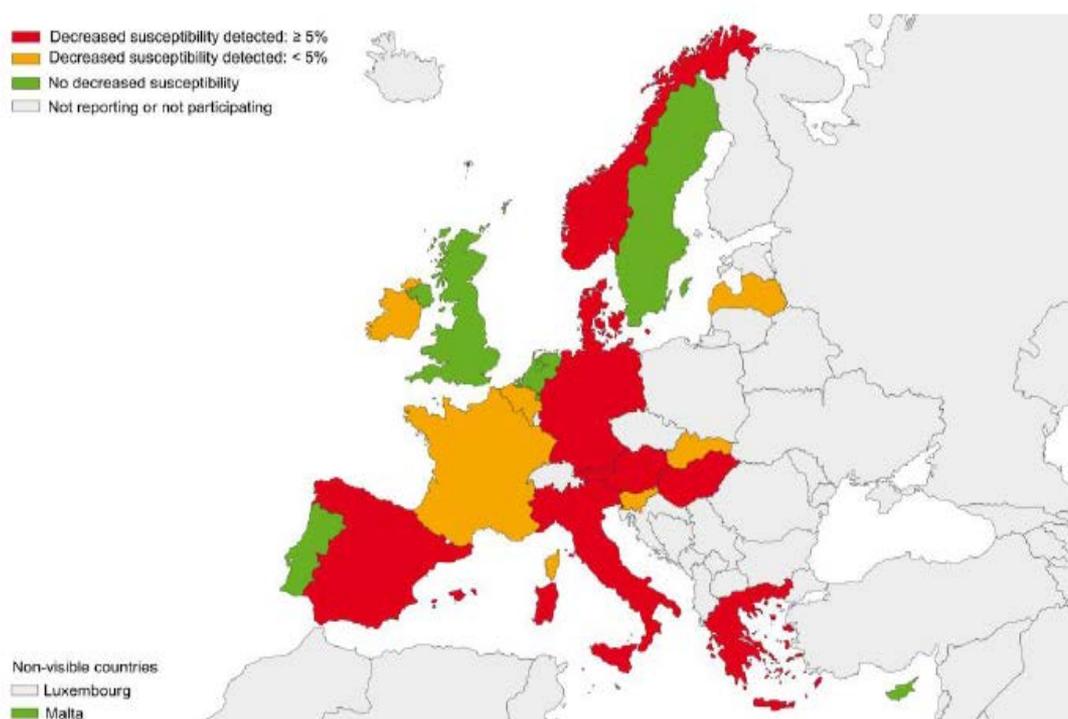
Augmentation de la proportion de souches **non sauvages** (CMI > 0,064 mg/L) au céfixime entre 2008 et 2015 :
1,6% → 5,66%

Augmentation de la proportion de souches **résistantes** (CMI > 0,125 mg/L): **0,12% → 1,19%**
Pic à 3% en 2012

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
MIC > 0.064 mg/l	1,48%	5,77%	5,72%	7,22%	10,52%	6,90%	4,42%	4,47%
MIC > 0.125 mg/l	0,12%	0,59%	0,57%	0,66%	3,02%	1,68%	0,88%	1,19%
Total	1,60%	6,36%	6,29%	7,87%	13,54%	8,58%	5,31%	5,66%

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Céfixime

Proportion of gonococcal isolates with decreased susceptibility to cefixime, EU/EEA, 2012



Source: European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP), 2012.

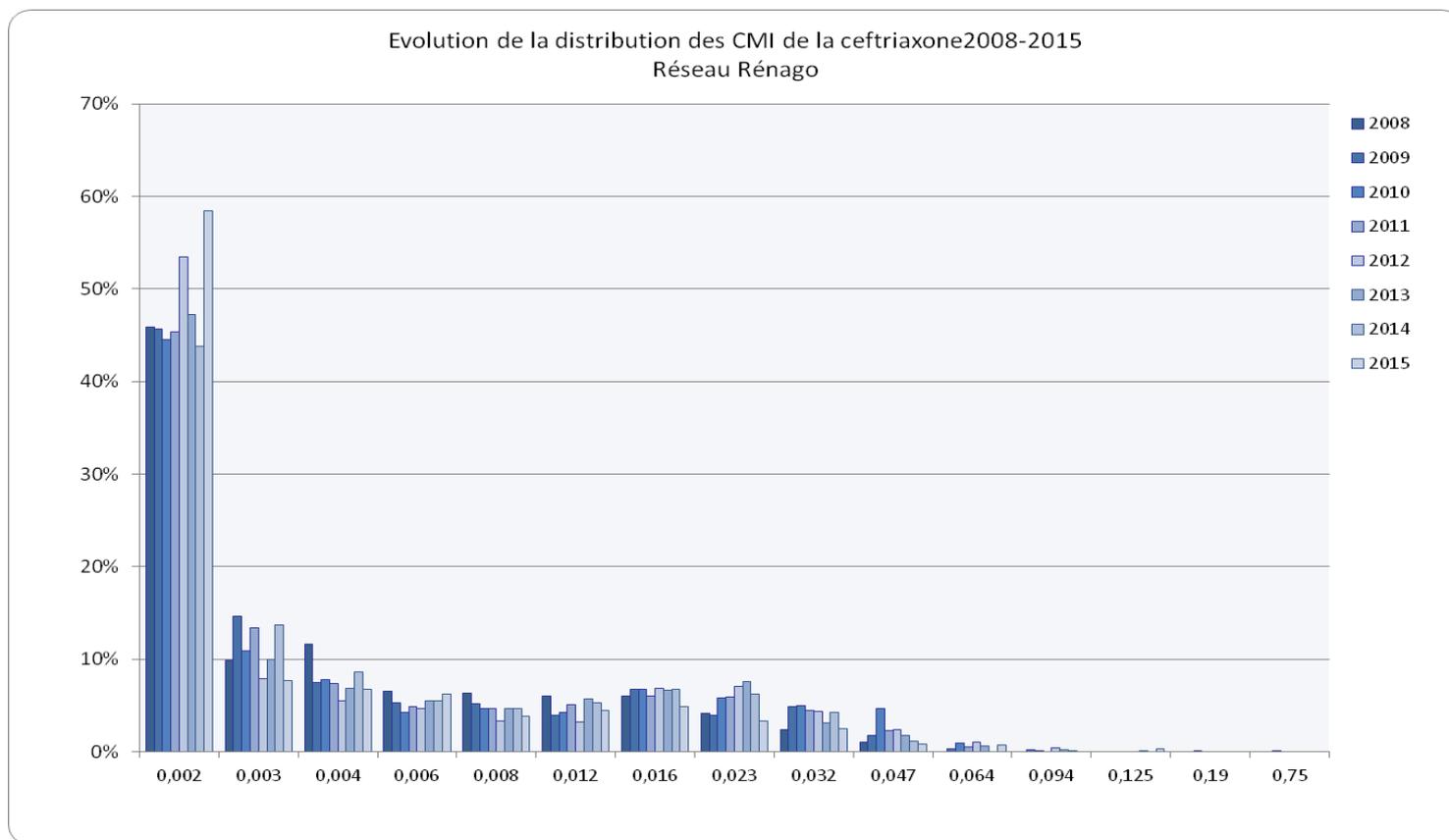
Données 2012:

La résistance au céfixime
- reste $< 5\%$ en France

- Est déjà $>5\%$ dans plusieurs
pays Européens

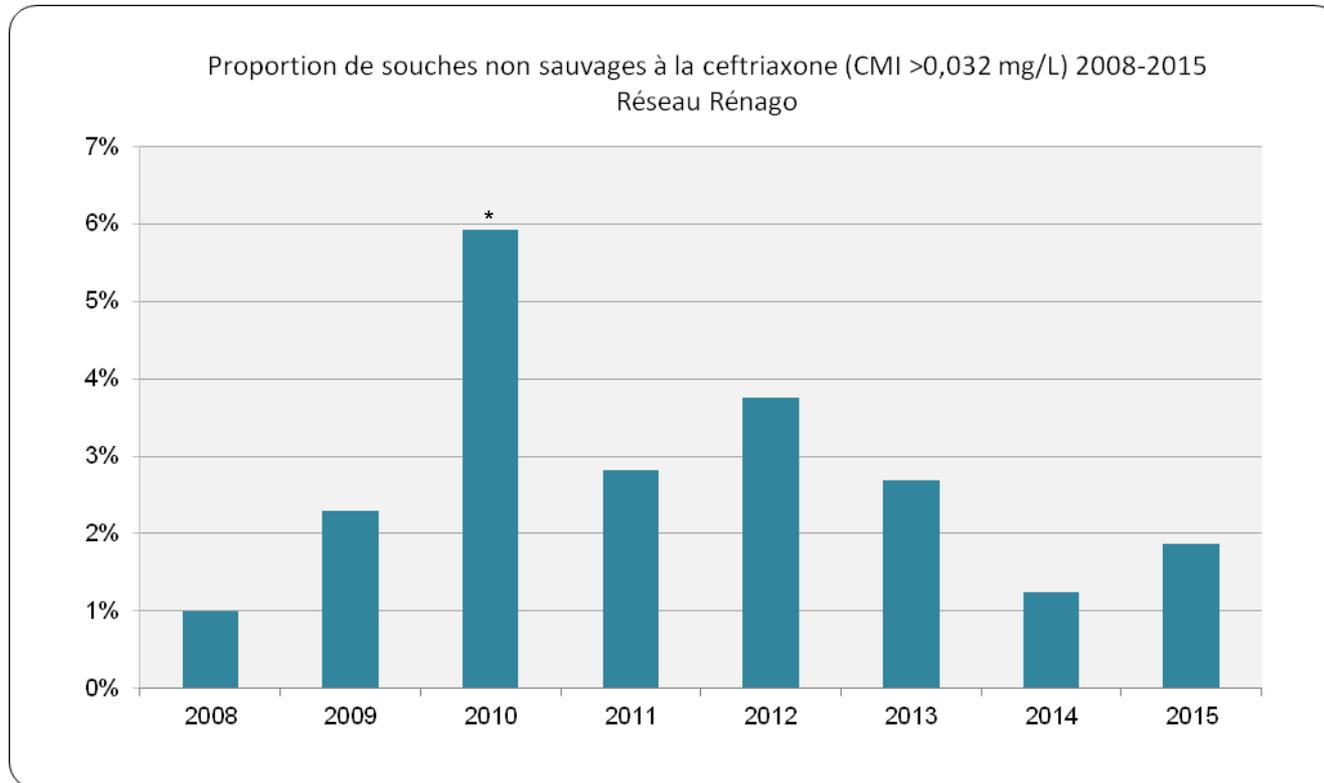
VIGILANCE +++ car
évolution possible vers
résistance à la ceftriaxone

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Ceftriaxone



Majorité des souches sensible et valeurs de CMI très basses

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Ceftriaxone

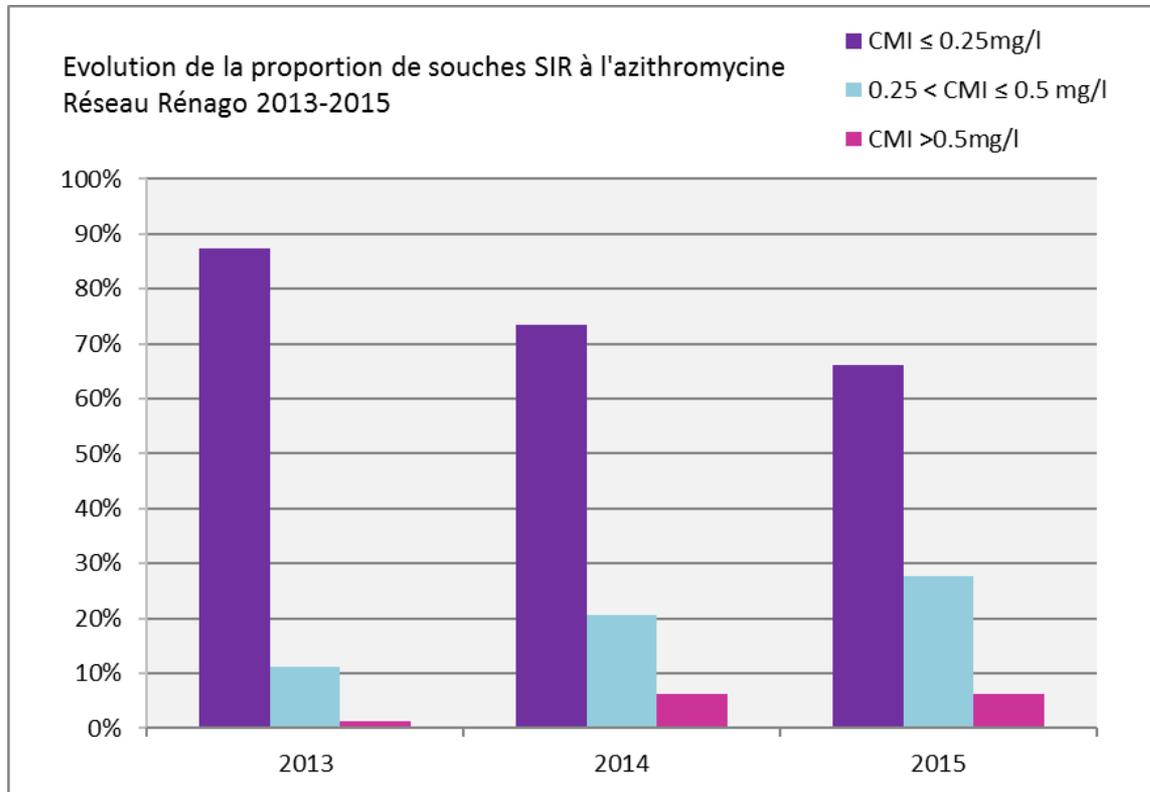


*2010: 2 souches résistantes (CMI > 0,125 mg/l)

Variations de la proportion de souches non sauvages (CMI > 0,032 mg/l)
à la ceftriaxone
(épiphénomènes + circulation de clones?)
→ VIGILANCE +++

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France

Azithromycine



Augmentation de la proportion de souches non sensibles entre 2013 et 2015:

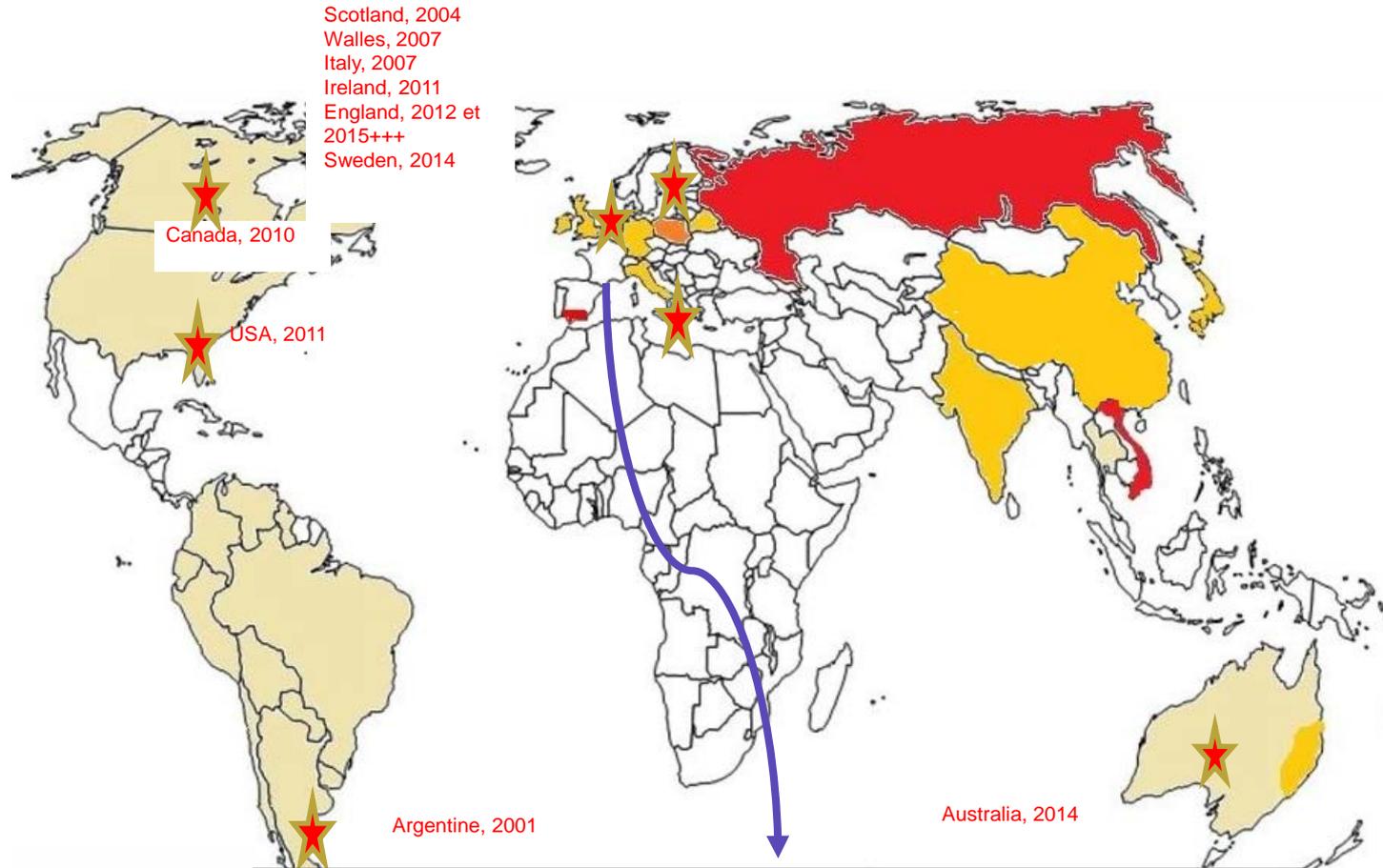
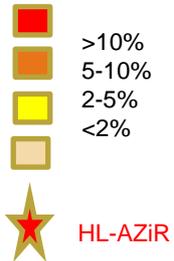
Intermédiaires (11,3% → 27,7%)

Résistantes (1,3% → 6,2%)
(surtout bas niveau, à la limite du seuil)

Gonocoque: Etat des lieux de la résistance en France Azithromycine

Résistance AZT:
MIC > 0,5 mg/L,
EUCAST

Résistance haut niveau:
HL-AziR >256 mg/L



Cole, Eurosurveillance.2011;16(42);
Kirkcaldy, STI,2013;89 Suppl 4:iv5-10, Galarza, STD, 2009;36(12):787-788; Palmer, JAC, 2008;62(3):490-494
Stevens K, JAC, 2015;70(4):1267-68
Allen V.G, AAC, 2014;58(5):2528-34

FRANCE

Augmentation de la proportion de souches intermédiaires et résistantes à bas niveau
Résistance à haut niveau (HL-AziR) reste exceptionnelle
MAIS: VIGILANCE ++++

Multiplex Bead Suspension Array for Screening *Neisseria gonorrhoeae* Antibiotic Resistance Genetic Determinants in Noncultured Clinical Samples

Sergey Balashov, Eli Mordechai, Martin E. Adelson, and Scott E. Gyga

Table 1 *N. gonorrhoeae* Chromosomal and Plasmid Genes and Mutations Targeted by the Assay. Marker Performances and AMR Mutations Frequencies in 239 *N. gonorrhoeae* Positive Cervicovaginal Specimens as Determined by the Assay

Gene mutant in (%)	Genetic marker	Marker performance	AMR mutation/gene	Positive in (%)	Associated AMR	Reference
<i>porA</i>	<i>porA</i>	239 (100%)				16
<i>penA</i> 222 (93%)	<i>penA</i>	224 (94%)	Mosaic	114 (48%)	PEN	10,11,17–22
	345A	238 (100%)	ins345A	206 (86%)	ESC	
<i>gyrA</i> 16 (7%)	S91 D95	239 (100%) 239 (100%)	G545S	0 (0%)	CIP	21,23–26
			S91F	16 (7%)		
			S91P	0 (0%)		
			S91Y	0 (0%)		
			D95A	2 (1%)		
			D95G	14 (6%)		
			D95N	0 (0%)		
<i>parC</i> 16 (7%)	D86 S87 S88 E91	239 (100%) 239 (100%) 239 (100%) 239 (100%)	D95Y	0 (0%)	CIP	21,25–27
			D86N	0 (0%)		
			S87R	15 (6%)		
			S87N	1 (0%)		
			S88P	0 (0%)		
			E91G	0 (0%)		
			E91K	0 (0%)		
<i>ponA</i> 74 (31%)	L421	239 (100%)	L421P	74 (31%)	PEN	21,28
<i>mtrR</i> 69 (29%)	–35 G45 –10	217 (91%) 154 (64) 212 (89%)	–35delA	27 (11%)	PEN	21,25,29–35
			G45D	54 (23%)	TET	
			G45S	0 (0%)	AZM	
<i>porB</i> 85 (36%)	G120 A121	224 (94%) 212 (89%)	–10insTT	10 (4%)	PEN TET	21,32–37
			G120K	22 (9%)		
			G120D	12 (5%)		
			A121D	28 (12)		
			A121G	2 (1%)		
			A121S	49 (21%)		
<i>rpsJ</i> 127 (53%)	V57	238 (100%)	V57M	127 (53%)	TET	21,34,35
<i>16S rRNA</i> 0 (0%)	G1064	ND*	G1064C	0 (0%)	SPT	12
	C1192	ND*	C1192U	0 (0%)		
<i>bla</i> (TEM) plasmid 2 (1%)	<i>bla</i>	ND*	<i>bla</i>	2 (1%)	PEN	21,38–42
<i>tetM</i> plasmid 10 (4%)	<i>tetM</i>	ND*	<i>tetM</i>	10 (4%)	TET	21,34,43,44

*ND, not determined.

31 mutations (29 chr. + 2 plasm)

Résistance à **6 ATB** (Pénicilline, ciprofloxacine, cefixime, tétracycline, azithromycine et spectinomycine)

Mise en évidence du germe + Valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique

Bonnes spécificité et sensibilité, quelques pb de relation avec phénotype

Pb: technique très lourde

Relation between Genetic Markers of Drug Resistance and Susceptibility Profile of Clinical *Neisseria gonorrhoeae* Strains[∇]

Elena N. Ilina,^{1*} Vladimir A. Vereshchagin,¹ Alexandra D. Borovskaya,¹ Maja V. Malakhova,¹ Sergei V. Sidorenko,^{2,3} Nazar C. Al-Khafaji,² Anna A. Kubanova,² and Vadim M. Govorun¹

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, June 2008, p. 2175–2182

TABLE 3. Distribution of penicillin MICs for *N. gonorrhoeae* isolates with different genotypes

Genotype ^a	No. (%) of isolates	No. of isolates with MIC (μg/ml)											No. (%) of isolates by susceptibility level ^b			P value ^c
		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	S	I	R	
wt	54 (11.6)	29	16	4	4	1							49 (90.7)	5 (9.3)	0	<0.001
<i>penA</i> _{mut}	51 (9.4)	19	1	4	13	4	6		2				25 (49.0)	24 (47.1)	2 (3.9)	>0.05
<i>mtrR</i> _{mut}	1 (0.2)	1											1 (100)	0	0	
<i>penB</i> _{mut}	2 (0.4)	2											2 (100)	0	0	
<i>penA</i> _{mut} <i>penB</i> _{mut}	7 (1.5)			2			1	4					2 (28.6)	5 (71.4)	0	>0.05
<i>penA</i> _{mut} <i>mtrR</i> _{mut}	15 (3.2)		2	4	4	2	3	1	1				5 (33.3)	9 (60.0)	1 (6.7)	>0.05
<i>penA</i> _{mut} <i>penB</i> _{mut} <i>mtrR</i> _{mut}	6 (1.3)	1		2			2	1	1				3 (50.0)	3 (50.0)	0	>0.05
<i>penA</i> _{mut} <i>ponA</i> _{mut}	39 (8.4)	2	2	2	13	4	9	5	2				6 (15.4)	31 (79.5)	2 (5.1)	<0.001
<i>penA</i> _{mut} <i>ponA</i> _{mut} <i>mtrR</i> _{mut}	62 (13.4)	4		2	7	7	21	17	4	1			6 (9.7)	51 (82.3)	5 (8.0)	<0.001
<i>penA</i> _{mut} <i>penB</i> _{mut} <i>ponA</i> _{mut}	76 (16.4)	2	3	1	11	9	17	27	6		1		6 (7.9)	63 (82.8)	7 (9.2)	<0.001
<i>penA</i> _{mut} <i>penB</i> _{mut} <i>ponA</i> _{mut} <i>mtrR</i> _{mut}	133 (28.7)	6	5	4	11	9	33	40	18	4	1		15 (11.3)	95 (71.4)	23 (17.3)	<0.001
<i>bla</i> _{TEM-1pres}	18 (3.9)							3	3	2	4	6	0	3 (16.7)	15 (83.3)	<0.001
Total	464	66	29	25	63	36	92	98	36	7	6	6	120 (25.9)	289 (62.2)	55 (11.9)	

^a Pattern of known genetic markers selected for analysis of antimicrobial resistance to penicillin. wt, wild-type (native) sequence in loci associated with resistance to penicillin; *mtrR*_{mut}, nucleotide substitutions are found in either the *mtrR* gene or its promoter; *bla*_{TEM-1pres}, combination of *bla*_{TEM-1} gene presence with any variants of other genetic loci.

^b S, susceptible strains; I, intermediately resistant strains; R, resistant strains (in accordance with CLSI criteria [3] for certain antibiotics). Nonsusceptible categories are shown in bold.

^c Significance of distinctions between isolates from different phenotypes for the particular genotype examined (two-tailed Fisher's exact test was used).

Problèmes de corrélation entre déterminants génétiques et résistance phénotypique
 → VPP variable selon les gènes recherchés et les ATB : 90,3% pour FQ, 91,1% pour pénicilline et 81,9% pour tétracycline.
 → Difficulté de choix des cibles et d'interprétation des résultats

Nouveaux outils diagnostiques: détection moléculaire des résistances: conclusions

- **Intérêts:**
 - Détection des résistances même en l'absence de culture
 - Traitement ciblé donc efficace
 - Epidémiologique: suivi des résistances et de la diffusion de certains clones
- **Difficultés**
 - Problème d'exhaustivité: nombreux mécanismes + interactions complexes
 - Evolution permanente
 - Pas de mee des nouvelles résistances
 - Pb de spécificité: risque de mee de gènes portés par d'autres bactéries (*Neisseria* commensales/pharynx)
 - Nomenclature? Cotation??
 - Techniques « maison » → Accréditation des techniques?

Intérêt pour les laboratoires qui ne font pas de culture ou si seul le
TAAN est positif

Suivi épidémiologique de la diffusion de gènes de résistance

Difficultés de mise en place en routine+++

LA CULTURE RESTE INDISPENSABLE

Actualités dans le diagnostic des IST: Conclusions

- IST = enjeu majeur pour les autorités sanitaires et les industriels
- Développement de nouvelles stratégies et de nouveaux outils diagnostiques
- Place prépondérante des techniques moléculaires
- Importance du maintien du « savoir faire » (technique mais aussi clinique)
- Nécessité d'évolution des recommandations (dépistage et prise en charge)
- Nécessité d'évolution de la nomenclature

Remerciements



Biologistes et cliniciens de l'Institut Alfred Fournier

Dr B. Berçot et Pr E. Cambau (CNR associé)

InVS (Dr Ndeikoundam, Dr F.Lot, N. Fournet...)

Cliniciens du réseau RésIST

Laboratoires des réseaux Rénago et Rénachla

MERCI POUR VOTRE ATTENTION