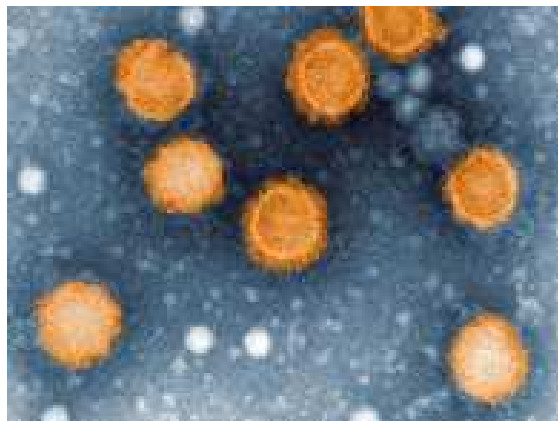


VEILLE MICROBIOLOGIQUE -
SURVEILLANCE DES ANTIBIORESISTANCES &
COLLECTION DE SOUCHES
ANNEE 2010

Régis GOURSAUD (rgoursaud@pasteur.nc)
Cyrille GOARANT (cgoarant@pasteur.nc)
Myrielle DUPONT (mdupont@pasteur.nc)
Eric D'ORTENZIO (edortenzio@pasteur.nc)



BP 61 - 98845 Nouméa Cedex
Tel. : (687) 27 02 80 - Fax : (687) 27 33 90
Email : diripnc@pasteur.nc

VEILLE MICROBIOLOGIQUE

Principal laboratoire de bactériologie, référent notamment pour les mycobactéries, les salmonelles, les gonocoques, les méningocoques, la leptospirose, Observatoire régional des pneumocoques, l'IPNC concourt à l'alerte des structures sanitaires publiques devant toute émergence de pathogènes inhabituels. En coordination avec ces structures, il mène les investigations nécessaires à l'identification de phénomènes cliniques ou épidémiques inhabituels et met en œuvre les protocoles adaptés.

En 2010, ont notamment été signalés :

- Trois *Mycobacterium tuberculosis* multi-résistants (Isoniaside et streptomycine) porteurs de la mutation 315 du gène katG. L'enquête autour de ces cas a été menée conjointement par les services de la DASS et les pneumologues du CHT ;
- 37 patients hébergeant une Salmonelle (dont 15 sérovar *weltevreden* & 11 *typhimurium*) ;
- 22 Shigelles (dont 19 *S. sonnei*) ;
- 11 méningites ou purpuras fulminants à *N. meningitidis*, dont 5 sérogroupes B, 4 Y et 2 C ;
- 8 patients, sur 122 explorés, ont été trouvés porteurs d'un *Clostridium difficile* toxigène, ce qui a conduit à leur isolement et à la désinfection des chambres qu'ils avaient occupées.
- 2 patients hébergeant un *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine ont été dépistés et isolés.

Signalons également pour cette année la participation à une enquête autour d'un cas de *Corynebacterium diphtheriae* retrouvé dans un prélèvement respiratoire par un laboratoire privé et déclaré avant confirmation de l'expression de la toxine. Bien que la souche index se soit avérée ultérieurement non toxigène, une large enquête bactériologique au sein des contacts a été menée, sans que le germe n'ait été retrouvé.

Un cas de légionellose a été mis en évidence grâce à la recherche d'antigènes solubles urinaires. Malheureusement, la souche n'a pu être isolée, la patiente ayant reçu une antibiothérapie prolongée. Le Laboratoire d'Hygiène et d'Environnement de l'IPNC, qui note régulièrement la présence de légionelles dans les sites expressément surveillés, a participé à l'enquête et a pu mettre en évidence l'origine domestique probable de la contamination.

Enfin, l'IPNC a participé à une enquête bactériologique autour d'un décès suspect de *Vibrio cholerae* sur un navire de retour d'une zone où une épidémie était en cours.

La surveillance des gonococcies, des pneumococcies invasives et des leptospiroses, ainsi que l'analyse des multi-résistances bactériennes faisant l'objet de rapports spécifiques distincts, ces germes ne seront pas évoqués ici.

SURVEILLANCE DES ANTIBIORESISTANCES EN NOUVELLE-CALEDONIE

1. Contexte

Le suivi de l'évolution de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes ou opportunistes est indispensable afin d'adapter les recommandations en matière d'orientation thérapeutique. L'hôpital est un lieu où s'accumulent les facteurs favorisant l'émergence de résistances acquises, et où leur propagation est facilitée par transmission croisée ou par la pression antibiotique.

Toutefois, il est maintenant admis que ces résistances peuvent avoir une origine extrahospitalière, surtout en ce qui concerne les résistances portées par des éléments transférables extra-chromosomiques (ex. : plasmides), l'hôpital jouant le rôle de « révélateur ». Même s'il est difficile de

mesurer l'importance relative du lieu d'acquisition des résistances, il est indubitable que leur diffusion communautaire est avérée et que leur éradication est impossible : seule une surveillance active permettra de lutter précocement et efficacement contre leur diffusion.

La lutte contre les Infections Liées aux Soins (ILS) doit se compléter d'actions visant à réduire l'émergence des bactéries multi résistantes (BMR). Deux mesures sont essentielles dans cette lutte : la prévention de la transmission croisée (mesures d'hygiène et de désinfection) et l'usage raisonné et adapté des antibiotiques.

Les choix thérapeutiques doivent être guidés par la documentation précise de la sensibilité du germe en cause. Outre la préservation des molécules d'efficacité supérieure, la désescalade éventuelle du traitement de première intention aura pour effet de limiter la sélection de résistances tout en limitant l'usage de spécialités coûteuses.

Dans une population insulaire préservée, il serait déraisonnable d'ignorer le risque de diffusion communautaire de souches résistantes apparues ou sélectionnées.

2. Méthodes

La surveillance des résistances bactériennes est basée sur une double approche :
- le dépistage des BMR sur milieux sélectifs dans des services hospitaliers « à risques », selon un protocole établi par le CLIN ;

- la caractérisation des mécanismes de résistances lors de l'identification d'isolats cliniques présentant des résistances inhabituelles au sein des isolements quotidiens réalisés par le laboratoire.

Ne seront pas signalées les simples modifications de sensibilité correspondant à la sélection de souches par un mésusage des antibiotiques, tant que ces modifications n'impliquent pas une réduction drastique des molécules encore utilisables.

3. Résultats de la surveillance en 2010

3.1. *Staphylococcus aureus* Méricilline-résistant (SARM)

La proportion de *Staphylococcus aureus* résistant à la méricilline (SARM) détectés dans les prélèvements rectaux systématiques de services à risques continue à augmenter, atteignant 3,9% (n= 64/1621) des patients dépistés contre 0,8% (n= 8/962) en 2005) (p<0,05). Dans les isolats cliniques, le chiffre est stable (13,3% des patients en 2010, n = 1158). Parallèlement, ces pathogènes sont aussi retrouvés dans des échantillons communautaires (6,8% en 2010), mais le faible effectif de nos patients « externes » (n = 135) ne permet pas de porter de conclusions tant que l'échantillonnage n'est pas caractérisé pour éliminer tout biais de recrutement.

A noter en 2010 notre participation à la thèse d'A. Merlet qui a recensé les souches de *S. aureus* exprimant la PVL (*Leucocidine de Panton-Valentine*) isolées de sites profonds. A l'opposé de la métropole, la totalité de ces souches sont des SAMS (*sensibles à la méricilline*). Les 47 souches isolées de l'étude appartenaient à 11 clones différents, dont un (agr4 ST121) prédominait et représentait 53% des 47 souches.

3.2. Entérocoques résistants aux glycopeptides (ERG)

La recherche systématique d'ERG dans les prélèvements rectaux de dépistage systématique, mise en place en 2004, a permis en 2007 d'éviter l'implantation d'*E. faecium* porteurs du gène *vanB* identifiés chez 8 patients.

Depuis, une souche a été isolée fin 2009 et 2 autres patients en janvier et avril 2010. La clonalité de ces isolats est en cours d'étude au centre national de référence

3.3. Entérobactérie exprimant une β -lactamase de spectre étendu (EBLSE)

L'augmentation régulière des EBLSE est préoccupante, notamment car ces résistances sont portées par des plasmides responsables de leur transfert inter espèces et souvent à l'origine de résistances croisées (aminosides, fluoroquinolones).

Ce phénomène est d'autant plus inquiétant que ces plasmides, qui jusqu'en 2000 étaient essentiellement hébergés chez *Klebsiella* ou *Enterobacter*, sont maintenant retrouvés dans le monde chez *Escherichia coli*. Ce germe, largement majoritaire dans le tube digestif, est à l'origine de portage et de transmission croisée en communautaire. Il est dès lors illusoire d'envisager leur éradication. Les mesures de surveillance et de lutte ont fait l'objet de recommandations précises dans un rapport du Haut Conseil de la Santé Publique en février 2010.

De très nombreux plasmides ont été décrits, mais la tendance mondiale est à la diffusion du type CTX-M. De plus, a émergé en 2010 un *Escherichia coli* porteur du plasmide NDM1 qui confère une résistance à pratiquement tous les antibiotiques. Cette souche isolée primitivement en Inde, se dissémine progressivement dans le monde entier (Australie en particulier). Leur identification au laboratoire, que ce soit dans les échantillons de dépistage ou les isolats cliniques, demande des tests complémentaires pour les différencier des céphalosporinases chromosomiques hyper-produites, dont l'épidémicité est moindre et sont plus le reflet d'un mésusage des antibiotiques.

La multiplicité des clones et la difficulté d'en tirer des informations épidémiologiques nous a conduit à ne pas alourdir l'identification génomique de ces plasmides ; toutefois, nous conservons systématiquement en collection les souches présentant des caractères inhabituels. En cas de suspicion de phénotype pouvant indiquer la présence d'une métallo-carbapénémase, la souche est envoyée pour confirmation et étude génomique dans un centre de référence

L'ensemble des interventions de l'IPNC donne lieu également à des alertes dont seule la rapidité de mise en œuvre permet d'espérer la limitation de l'implantation de souches multirésistantes.

En 2010, nous avons isolé une EBLSE chez 87 patients sur 134 échantillons (64,9%), dont seulement 40 étaient des « dépistages systématiques » sur écouvillonnage rectal. Chez près de 80 % des patients l'entérobactérie exprimant cette résistance plasmidique étaient *E. cloacae* (n= 33) ou *E. coli* (n=35). *K. pneumoniae* était retrouvée chez 13 patients, et 6 autres hébergeaient un *Citrobacter sp.*

Aucune métallo-bétalactamase n'a été retrouvée dans les entérobactéries isolées tout au long de l'année.

3.4. Autres Bactéries Multi Résistantes (BMR)

Il s'agit de germes fréquemment responsable d'infections acquises à l'hôpital, généralement issus de l'environnement, et dont les multiples résistances naturelles ou acquises rendent difficile la mise en place d'une antibiothérapie adaptée.

Stenotrophomonas maltophilia présente une imperméabilité importante aux antibiotiques, doublée de carbapénémases chromosomiques. A la faible efficacité des β -lactamines et des quinolones s'ajoute une résistance enzymatique aux aminosides : l'antibiothérapie doit faire appel à des associations d'antibiotiques après estimation de la CMI et/ou de la bactéricidie in vitro des associations.

En 2010, 28 patients ont été trouvés porteurs de ce germe, majoritairement retrouvé dans des prélèvements respiratoires (n=19) et 3 fois à l'origine de septicémies. Seuls 7 patients avaient une souche résistante à l'association ticarcilline-acide clavulanique.

Depuis 2004, un clone d'***Acinetobacter baumannii*** multi résistant (Type V = R à toutes les β -lactamines y compris l'imipénème) est sous surveillance étroite. En 2010, nous avons trouvé 126 patients sur 172 prélèvements (73,3%) porteurs d'*A. baumannii*, parmi lesquels 15 présentaient une Céphalosporinase hyper produite (Phénotypes III & IV), et 27 une carbapénémase (Phénotype V). En sept ans, le phénotype V a très significativement baissé entre 2004 (94/148, 64%) et 2010 (27/119, 23%) (p<0,05).

Enfin, chez ***Pseudomonas aeruginosa***, la résistance aux β -lactamines est liée à l'hyperproduction d'une enzyme naturelle et la résistance à l'imipénème est généralement le fait d'une imperméabilité ou d'un efflux accru. Elle peut dans de rares cas être conférée par une métallo-bétalactamase située sur des éléments mobiles (plasmides ou transposons), avec donc un risque de diffusion inter-espèces et une contagiosité accrue.

Nous nous sommes intéressés en 2010 aux résistances de *P. aeruginosa* vis-à-vis des céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et des carbapénèmes. Sur 325 patients infectés ou colonisés, 28 étaient résistants aux C3G isolément, 12 au seul imipénème et 6 avaient une résistance à la fois aux C3G et à l'imipénème. Cette bactérie n'est donc pas actuellement un problème important, mais le nombre élevé

de porteurs et la possibilité de diffusion des résistances nous obligent à poursuivre la surveillance active de ces souches.

4. Conclusion

En résumé et en conclusion, deux phénomènes semblent importants à souligner : malgré l'absence de mesures spécifiques très drastiques, la simple mobilisation des équipes de soin autour d'une communication ciblée sur la résistance de *A. baumannii* a permis la diminution significative du nombre de souches de phénotype V, par simple application des « précautions complémentaires » recommandées autour de ces patients, à savoir : matériel de soin dédié, port de tabliers jetables et désinfection répétée des mains entre chaque geste.

L'augmentation du nombre de *S. aureus* résistant à la méticilline, phénomène mondial, n'épargne pas la Nouvelle-Calédonie, même si sa situation insulaire lui permet d'avoir encore une proportion plus faible de ces souches, qui se traduit par une épidémiologie moléculaire originale des clones PVL+.

En ce qui concerne les EBSLE, la Nouvelle-Calédonie n'échappe pas non plus à la diffusion préoccupante de ces résistances plasmidiques, et l'expression de ces résistances par *E. coli*, germe le plus représenté dans les selles des patients, doit nous amener à une vigilance renforcée pour limiter leur extension, tant leur éradication est maintenant illusoire et l'apparition de nouvelles molécules efficaces peu probable, même à moyen terme.

SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DU GONOCOQUE, *NEISSERIA GONORRHOEAE*

1. Contexte et justifications

Parmi les infections sexuellement transmissibles (IST), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) est un des agents infectieux les plus fréquemment impliqués. Historiquement, les souches de *Neisseria gonorrhoeae* isolées par le Laboratoire d'Analyses Médicales (LABM) de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) sont sensibles aux antibiotiques.

A partir de 2008, la création (par l'IPNC avec le soutien financier du gouvernement de la Nouvelle-Calédonie) d'un réseau de surveillance des gonocoques (RESGO) a permis de documenter les souches isolées en dehors de l'IPNC, par les laboratoires privés et les établissements hospitaliers du Nord. Ceci a permis notamment une réaction rapide et probablement efficace en plusieurs occasions lors de l'isolement de souches résistantes à la pénicilline et /ou aux quinolones.

En l'absence de circulation de souches produisant des bêta-lactamases, le Laboratoire de Recherche en Bactériologie de l'IPNC a développé des techniques de génotypage des déterminants chromosomiques de la résistance à la pénicilline chez les gonocoques, pour mieux caractériser ce phénomène et suivre son évolution. Ces techniques moléculaires présentent en outre l'avantage de pouvoir éventuellement être mises en œuvre sur des souches transmises par des laboratoires extérieurs distants, et qui nous parviendraient non viables. L'étude de la présence et de la prévalence de mutations de certains gènes chromosomiques, ainsi que de leur évolution temporelle, a permis de maintenir la recommandation d'un traitement des infections gonococciques par la pénicilline, et d'en informer la communauté médicale de NC (article dans le Bulletin Médical Calédonien et Polynésien en 2007).

Les quinolones étant recommandées dans le traitement des gonocoques résistant à la pénicilline, nous avons également développé une technique permettant de rechercher les déterminants de la résistance sur les 2 gènes impliqués (*gyrA* et *parC*).

2. Méthodologie de l'étude

- Isolement au LABM de l'IPNC ou ;
- collecte de souches documentées auprès de laboratoires extérieurs (laboratoires privés, provinciaux, hospitaliers du Nord...), même non viables ;
- Antibiotogramme classique en diffusion (sur les souches viables) au LABM de l'IPNC ;

- Complément phénotypique : détermination précise des CMI pour la pénicilline G et la ciprofloxacine par la technique des E-Tests ;
- Détermination moléculaire des génotypes des déterminants de la résistance à la pénicilline (*penA*, *penB*, *ponA*, *mtrR*) et aux quinolones (*gyrA*, *parC*) par génotypage sur une plateforme de PCR en temps réel ;
- Analyse des résultats en regard de l'évolution temporelle des phénotypes et des génotypes recueillis depuis 2006 à l'IPNC et de l'origine des souches.

NB : Suite à l'observation au cours de 3 années consécutives d'une évolution limitée de la prévalence de ces déterminants et d'une stabilité des phénotypes, il a été décidé de limiter cette approche aux souches intermédiaires ou résistantes à la pénicilline et aux souches résistantes aux fluoroquinolones.

3. Bilan de l'année 2010

En 2010, 197 souches de gonocoques ont été collectées et caractérisées à l'IPNC, incluant 39 souches isolées par les laboratoires privées et 9 provenant des centres hospitaliers du Nord, dans le cadre du réseau RESGO. Ces souches proviennent de 92 femmes et 105 hommes, âgés de 13 à 65 ans. Il est à noter, en dehors de souches d'origine génitale, deux souches provenant d'arthrites isolées en fin d'année.

3.1. Phénotypes observés au cours de l'année 2010

Il est notable qu'une seule souche présentant un profil de résistance différent des souches calédoniennes a été isolée au cours de cette année 2010, souche résistante à la pénicilline (productrice de bêta-lactamase) et aux quinolones. Sa détection rapide a permis de déterminer qu'elle avait été importée d'Asie et, très vraisemblablement, d'en éviter la diffusion en Nouvelle-Calédonie.

La répartition des phénotypes de ces souches concernant leur sensibilité à la pénicilline est décrite dans le graphique suivant (figure 1).

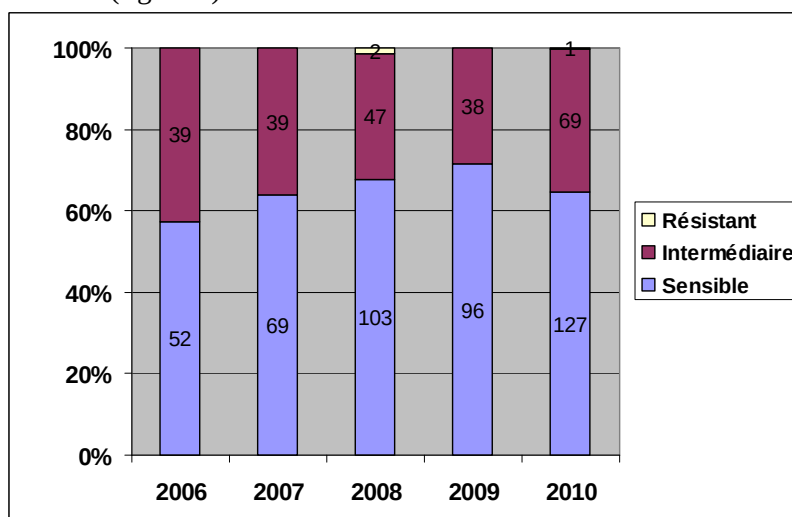


Figure 1 : Phénotypes de sensibilité à la pénicilline G des *N. gonorrhoeae* isolés à l'IPNC depuis 2006.

Malgré une légère diminution de la part des souches sensibles, on constate à nouveau une stabilité de la part des souches de sensibilité intermédiaire à la pénicilline.

Le Centre Médical Polyvalent (CMP) ESPAS-CMP est le prescripteur conduisant à l'isolement du plus grand nombre de souches de gonocoques à l'IPNC. De plus, les praticiens de ce centre utilisent en première intention un traitement à la pénicilline, et ces médecins sont donc tout particulièrement vigilants à la sensibilité des souches de gonocoques à cet antibiotique. La figure 2 ci-dessous montre la proportion de souches à phénotype sensible ou intermédiaire, selon que l'isolement provient d'une prescription du CMP ou non.

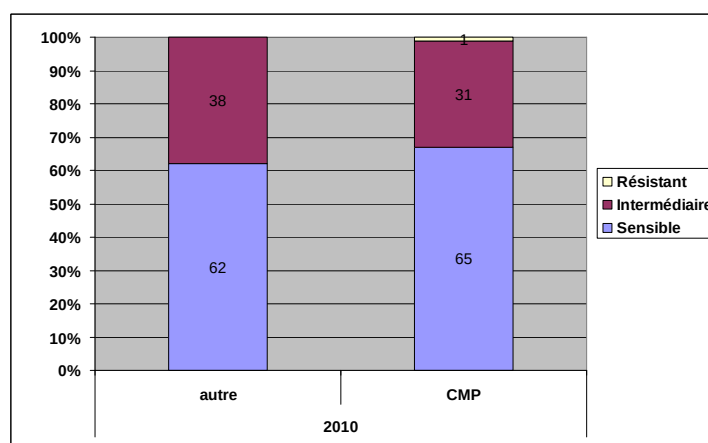


Figure 2 : Phénotypes de sensibilité à la pénicilline G des *N. gonorrhoeae* isolés à l'IPNC en 2010 suite à des prescriptions de l'ESPAS-CMP ou des autres prescripteurs.

On constate que la proportion de souches à sensibilité intermédiaire n'est pas augmentée dans les souches issues des patients du CMP (32 % contre 38% chez les autres prescripteurs, écart non significatif).

3.2. Génotypage des déterminants chromosomiques de la résistance

Le génotypage a été réalisé sur les 69 souches de sensibilité intermédiaire. La souche résistante d'origine asiatique qui présentait une résistance aux (fluoro)quinolones était porteuse d'une double mutation sur le gène *gyrA*, ainsi que d'une double mutation sur le gène *parC* et exprimait une bêta-lactamase (génotype fréquemment observé chez les souches de cette origine). La totalité des autres souches était sensible aux quinolones.

Sur ces 69 souches non productrices de pénicillinase mais de sensibilité intermédiaire, les diminutions de sensibilité à la pénicilline doivent être liées à des mutations chromosomiques, décrites pour affecter 4 gènes : les gènes *penA* et *ponA* des protéines liant la pénicilline (PLP 1 et 2), le gène *penB* de la porine, spécialement son allèle *porB_{1b}* et le gène *mtrR* du répresseur contrôlant l'expression de la pompe à efflux MtrCDE. Ces déterminants ont été génotypés.

Les mutations des gènes *penA* et *ponA* sont assez fréquentes en Nouvelle-Calédonie, comme le montre la figure 3 ci-dessous.

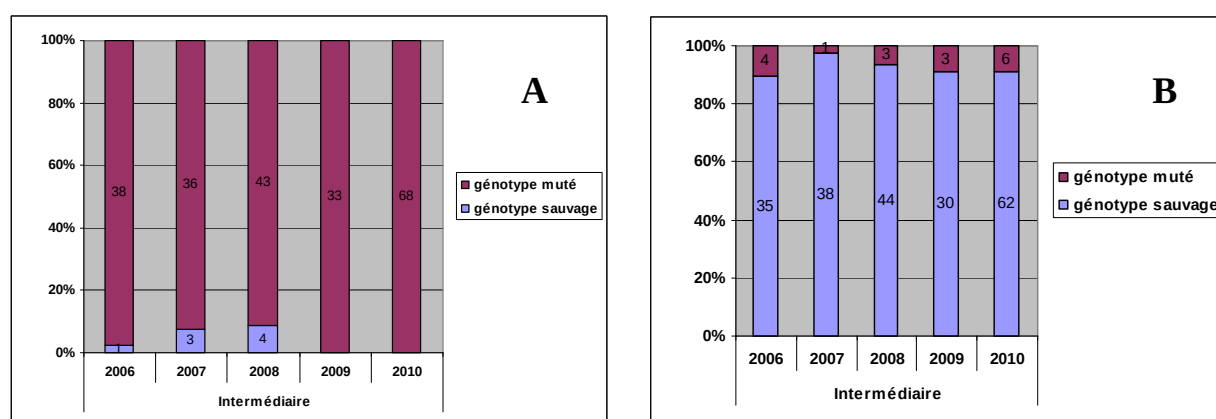


Figure 3 : Fréquence des mutations observées sur les gènes *penA* (A) et *ponA* (B) dans les gonocoques à sensibilité intermédiaire à la pénicilline isolés depuis 2006 en Nouvelle-Calédonie

On n'observe pas d'augmentation significative de la fréquence de ces mutations dans les isolats calédoniens. Il est intéressant de noter que la mutation du gène *penA* est retrouvée dans tous les isolats de sensibilité intermédiaire.

La principale mutation responsable d'une augmentation de l'efflux par le système MtrCDE chez les gonocoques est la délétion d'un A dans la région promotrice du gène du répresseur MtrR. Cette mutation, qui confère une forte diminution de sensibilité à la pénicilline lorsque la porine est altérée, ne circule pas en Nouvelle-Calédonie. Cette mutation bien décrite et circulant largement au niveau mondial n'a pas été retrouvée dans les isolats de 2010.

Néanmoins, une autre altération de la séquence de ce promoteur, en cours de description, consiste en l'insertion d'un T dans cette même région promotrice de *mtrR*. Cette mutation, assez fréquente en Nouvelle-Calédonie, ne confère toutefois pas une baisse aussi importante de sensibilité. Sa prévalence est restée stable (et même en baisse non significative), dans les isolats intermédiaires, passant de 42% en 2009 à 35% en 2010.

Enfin, le génotypage de la porine permet à la fois de déterminer la prévalence de chacun des allèles *porB_{1a}* et *porB_{1b}* et de génotyper *porB_{1b}*, allèle dont les mutations ont été montrées contribuer de façon importante à une baisse de sensibilité à la pénicilline.

L'allèle *porB_{1a}*, connu quant à lui pour favoriser les infections profondes, est retrouvé chez 12,5% des gonocoques à sensibilité intermédiaire isolés en 2010 en Nouvelle-Calédonie. Cette fréquence est comparable à celle d'autres pays développés, et plus faible que la fréquence retrouvée dans des pays moins développés (par exemple 40% à Madagascar ou au Cambodge).

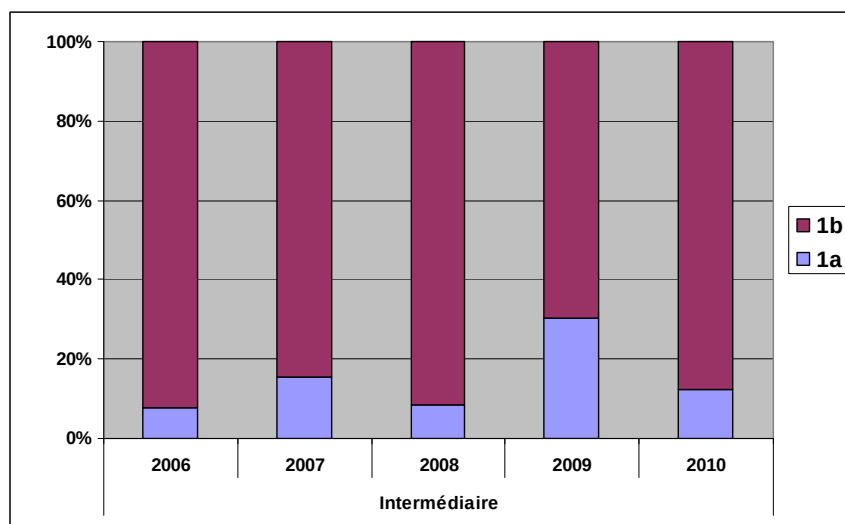


Figure 4 : Fréquences respectives des allèles *porB_{1a}* et *porB_{1b}* de la porine dans les gonocoques à sensibilité intermédiaire à la pénicilline isolés depuis 2006 en Nouvelle-Calédonie

Cette fréquence est relativement stable depuis plusieurs années.

L'évolution de la fréquence des différents génotypes de la porine *porB_{1b}* est présentée dans la figure 5 suivante.

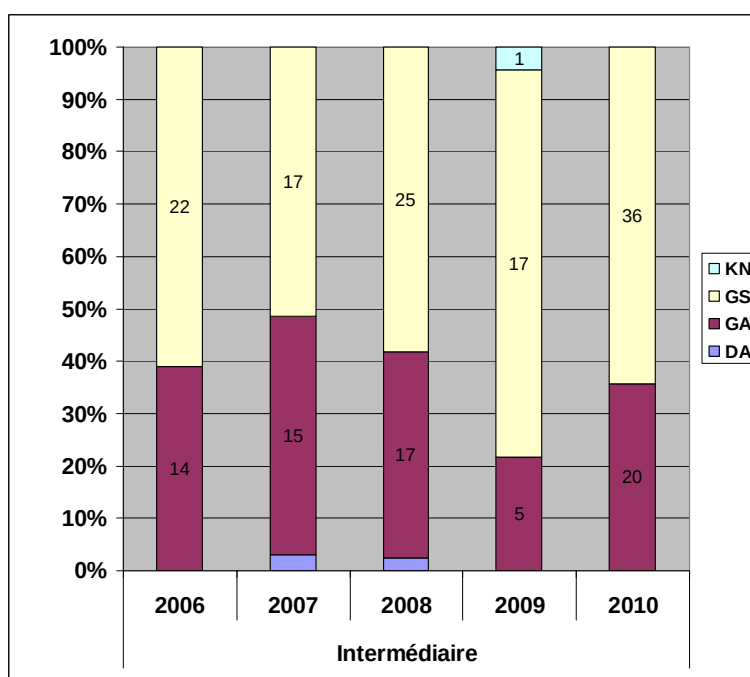


Figure 5 : Fréquences des génotypes de l'allèle *porB_{1b}* de la porine dans les gonocoques à sensibilité intermédiaire à la pénicilline isolés en 2009 en Nouvelle-Calédonie.

Pour les allèles *porB_{1b}*, les génotypes circulant en Nouvelle-Calédonie sont retrouvés avec une fréquence proche de celle des dernières années. Le génotype sauvage (G101/A102) est retrouvé chez 36% des souches portant l'allèle *porB_{1b}*. La fréquence de la simple mutation GS (pour A102S), mutation décrite en Nouvelle-Calédonie et conférant une baisse modérée de la sensibilité à la pénicilline ne semble toutefois plus réellement progresser, comme cela était suspecté depuis 2006.

4. Conclusion

Les souches de gonocoques circulant en Nouvelle-Calédonie demeurent le plus souvent sensibles aux antibiotiques, ce qui constitue, au regard de la situation mondiale ou des pays voisins, un statut sanitaire privilégié. La surveillance phénotypique et moléculaire de la sensibilité de ce germe ainsi qu'une bonne réactivité des acteurs impliqués ont permis, jusqu'à maintenant, de conserver ce statut. Depuis 2008 et la mise en place du réseau RESGO permettant la collecte et la caractérisation de souches isolées par les autres laboratoires, ce suivi de la résistance de ce germe atteint un très bon niveau de couverture. Au cours des dernières années, plusieurs souches résistantes, résultant d'importations, ont été mises en évidence rapidement et la réactivité des différents interlocuteurs a visiblement permis d'efficacité empêcher leur diffusion en Nouvelle-Calédonie.

Les résultats du suivi de l'année 2010 n'impliquent donc pas de modifier la recommandation d'un traitement de première intention par la pénicilline chez tous les patients qui n'y sont pas allergiques.

5 - Publications

Vernel-Pauillac F, Ratsima EH, Guillard B, Goursaud R, Lethezer C, Hem S, Merien F, Goarant C. (2010) Correlation between antibiotic susceptibilities and genotypes in *Neisseria gonorrhoeae* from different geographical origins: determinants monitoring by real-time PCR as a complementary tool for surveillance. *Sexually transmitted infections* 86 : 106-111.

Correlation between antibiotic susceptibilities and genotypes in *Neisseria gonorrhoeae* from different geographical origins: determinants monitoring by real-time PCR as a complementary tool for surveillance

Frédérique Vernel-Pauillac,¹ Elisoa H Ratsima,² Bertrand Guillard,³ Régis Goursaud,¹ Camille Lethezer,¹ Sopheak Hem,³ Fabrice Merien,¹ Cyrille Goarant¹

► Supplementary materials 1 and 2 are published online only at <http://sti.bmj.com/content/vol86/issue2>.

¹Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, New Caledonia

²Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar

³Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia

Correspondence to

Dr Cyrille Goarant, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, BP61, Nouméa 98845, New Caledonia; cgoarant@pasteur.nc

Accepted 5 October 2009
Published Online First
1 November 2009

ABSTRACT

Objective To determine in *Neisseria gonorrhoeae* (NG) isolates from different geographical areas whether monitoring of major determinants involved in chromosomal antimicrobial resistance correlated with phenotypes and could constitute complementary tools for surveillance.

Methods Real-time multiplex PCR assays targeting *penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA*, *gyrA* and *parC* determinants were applied to 169 NG extracts. Minimum inhibitory concentrations for penicillin and ciprofloxacin were determined by E tests, and β -lactamase production was analysed using nitrocefin discs.

Results A total of 169 NGs were examined, 110 from New Caledonia, 44 from Madagascar and 15 from Cambodia. Despite the heterogeneity in the number of isolates tested, the susceptibility trends observed in the different geographic areas studied showed a good fit with the multigenic genotypes. In addition, features related to a specific geographical diversity were found: (1) a high prevalence of strains harbouring the *porB1a* allele and showing reduced penicillin susceptibility in Madagascar and Cambodia (39% and 40% respectively); (2) almost all strains from Cambodia were resistant to the drugs tested (11/15 and 14/15 resistant to penicillin and ciprofloxacin respectively); and (3) identification of novel *penB* and *mtrR* genotypes associated with a moderately decreased penicillin susceptibility in New Caledonia (*mtrR* novel genotype in 47% of intermediate vs 14% of susceptible isolates).

Conclusions Showing a good correlation with phenotypic trends of susceptibility, multiplex real-time PCR assays could be used successfully for prospective epidemiological studies notably by characterising *mtrR* and *penB* determinants for their fundamental and complementary roles in increasing the antibiotic resistance. These molecular tools could also provide useful alternative surveillance tools for non-viable strains.

genes and regulatory regions resulting in an increasing resistance to structurally unrelated groups of drugs.^{3 4}

Reduced affinity of penicillin-binding proteins (encoded by *penA* and *ponA*), overexpression of the MtrC–MtrD–MtrE efflux pump due to mutation in the promoter of *mtrR* and decreased permeation of the outer membrane induced by mutations in the porin PorB1b are the commonly described mechanisms of chromosomally mediated resistance.^{5–12} These mutations, referred to as *penA*, *ponA*, *mtrR* and *penB* determinants, have been widely observed in clinical isolates displaying decreased susceptibility. In vitro transformation experiments demonstrated that their phenotypic expression was leading to a gradual increase in minimum inhibitory concentration (MIC) when successive variations accumulate.^{6 11 12}

Resistance to fluoroquinolones in NG involves mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) of *gyrA* and *parC*.^{13–15} Mutations in *gyrA* are considered as the first and most frequent, leading to either a less susceptible or a resistant phenotype, whereas *parC* changes constitute later steps always leading to complete resistance.^{16 17} Efflux activation or decreased porin permeability has also been suspected of being involved in resistance to quinolones.^{16 18}

Using real-time PCR with hybridisation probes, we genotyped these chromosomal determinants in NG isolates from different geographic areas (New Caledonia, Oceania; Madagascar, Africa and Cambodia, Asia). We then evaluated the correlation between these genetic variations and the susceptibility to the corresponding antibiotics in order to evaluate the predictive value of these molecular tools and their possible use in surveillance as a way to forecast forthcoming resistance and adapt recommendations.

MATERIALS AND METHODS

NG isolates

A total of 169 NG isolates from men or women were studied. They were isolated at the bacteriology laboratories of (1) Institut Pasteur de New Caledonia (110 isolates collected from October 2006 to October 2007); (2) Institut Pasteur in Antananarivo, Madagascar (47 isolates collected from March 2004 to March 2006); (3) Institut Pasteur in Phnom Penh, Cambodia (15 isolates collected over 2006). Most

Neisseria gonorrhoeae (NG) is the causative agent of gonorrhoea, one of the major sexually transmitted infections in many countries. Its remarkable ability to evolve resistance mechanisms threatens the use of most antimicrobial agents so that attention in an effective surveillance to limit the spread of multi-resistant strains has become an absolute necessity.¹

Penicillin resistance arises either as a consequence of antibiotic-degrading enzymes production² or from simultaneous genetic variations in endogenous

WHO Western Pacific Programme; South East Asian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme, Tapsall JW, Limnios EA, Abu Bakar HM, Darussalam B, Ping YY, Buadromo EM, Kumar P, Singh S, Lo J, Bala M, Risbud A, Deguchi T, Tanaka M, Watanabe Y, Lee K, Chong Y, Noikaseumsy S, Phouthavane T, Sam IC, Tundev O, Lwin KM, Eh PH, **Goarant C, Goursaud R**, Bathgate T, Brokenshire M, Latorre L, Velemu E, Carlos C, Leano S, Telan EO, Goh SS, Koh ST, Ngan C, Tan AL, Mananwatte S, Piyanoot N, Lokpichat S, Sirivongranson P, Fakahau M, Sitanilei H, Hung le V. (2010) Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. *Communicable diseases intelligence*. 34(1):1-7.

WHO WPR & SEAR gonococcal surveillance, 2007-2008

Annual report

Annual reports

SURVEILLANCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *NEISSERIA GONORRHOEAE* IN THE WHO WESTERN PACIFIC AND SOUTH EAST ASIAN REGIONS, 2007-2008

The WHO Western Pacific and South East Asian Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programmes

Abstract

Long-term surveillance of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* has been conducted in the World Health Organization (WHO) Western Pacific Region (WPR) to optimise antibiotic treatment of gonococcal disease since 1992. In 2007 and 2008, this Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (GASP) was enhanced by the inclusion of data from the South East Asian Region (SEAR) and recruitment of additional centres within the WPR. Approximately 17,450 *N. gonorrhoeae* were examined for their susceptibility to one or more antibiotics used for the treatment of gonorrhoea by external quality controlled methods in 24 reporting centres in 20 countries and/or jurisdictions. A high proportion of penicillin and/or quinolone resistance was again detected amongst isolates tested in North Asia and the WHO SEAR, but much lower rates of penicillin resistance and little quinolone resistance was present in most of the Pacific Island countries. The proportion of gonococci reported as 'resistant', 'less susceptible' or 'non-susceptible' gonococci to the third-generation cephalosporin antibiotic ceftriaxone lay in a wide range, but no major changes were evident in cephalosporin minimal inhibitory concentration (MIC) patterns in 2007-2008. Altered cephalosporin susceptibility was associated with treatment failures following therapy with oral third-generation cephalosporins. There is a need for revision and clarification of some of the *in vitro* criteria that are currently used to categorise the clinical importance of gonococci with different ceftriaxone and oral cephalosporin MIC levels. The number of instances of spectinomycin resistance remained low. A high proportion of strains tested continued to exhibit a form of plasmid mediated high level resistance to tetracyclines. The continuing emergence and spread of antibiotic resistant gonococci in and from the WHO WPR and SEAR supports the need for gonococcal antimicrobial resistance surveillance programs such as GASP to be maintained and potentially expanded. *Commun Dis Intell* 2010;34:1-7.

Keywords: annual reports; antimicrobial resistance; *Neisseria gonorrhoeae*

Introduction

The World Health Organization (WHO) Western Pacific (WPR) and South East Asian Regions (SEAR) have a continuing high incidence of gonorrhoea, but treatment and public health management of gonococcal disease in both regions have been severely compromised over many years by increasing antimicrobial resistance (AMR) in *Neisseria gonorrhoeae*. Currently, treatment of gonorrhoea in the public sector of 'Asian' countries in the WHO WPR and in the WHO SEAR is substantially based on the use of third-generation cephalosporin agents, most notably the injectable ceftriaxone, although there are a wide range of dosing regimens used.¹ The oral third-generation cephalosporin most commonly used is cefixime, but dosing regimens are more uniform.¹ These antibiotics are employed as single-dose treatments. Other injectable and oral cephalosporins are also used in some jurisdictions.¹ There is also widespread resistance to penicillins, early generation cephalosporins and quinolones in the 'Asian' group of WPR and in SEAR countries.^{2,3} In the 'Pacific Island' or 'Oceania' group of countries within the WHO WPR, the penicillin group of agents remains the recommended treatment in a number of settings.² Other antibiotics such as spectinomycin and azithromycin are also recommended and used in some countries, although drug availability and cost limit their wider use. There are few reliable data on antibiotic usage and availability in the private sector in the WHO WPR and SEAR, but anecdotally, a wide variety of antibiotics are used, often in suboptimal doses.¹

The WHO⁴ and others^{5,6} recommend that treatment options be refined by data from surveillance of AMR in *N. gonorrhoeae* and that use of an antibiotic for routine treatment be discontinued when therapeutic failure and/or AMR reaches a level of 5%. The WPR Gonococcal Antimicrobial Surveillance

COLLECTION DE BACTERIES ET DE PRELEVEMENTS BIOLOGIQUES D'INTERET

L'IPNC est le laboratoire chargé de constituer, de gérer et d'entretenir la collection de micro-organismes unique et spécifique à la Nouvelle-Calédonie. Cette collection permet de conserver toute souche bactérienne ou virale présentant potentiellement un intérêt en santé individuelle ou en santé collective, isolée aussi bien au CHT que dans les laboratoires privés. L'objectif est de pouvoir étudier l'évolution de ces pathogènes en cas d'apparition d'événements intéressants (émergence de mutants, de résistances, de nouveaux variants viraux...). Les souches bactériennes ainsi que les sérums de patients permettant la recherche de virus (Dengue, Grippe ...) doivent être conservés au congélateur à -80°C, ou en azote liquide pour être viables et cultivables.

Tous les ans, cette collection est mise à jour et des nouvelles bactéries peuvent être stockées en fonction des études et des besoins. Sont actuellement en collection des souches de pneumocoques, leptospires, gonocoques, salmonelles, *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio vulnificus*, *Burkholderia pseudomallei*, *Staphylococcus aureus* PVL+, *Enterococcus faecium* VancoR, etc.; mais également les sérums de patients positifs en Dengue et en Leptospirose des épidémies actuelles et passées... En 2010, nous avons mis en collection sécurisée : 250 pneumocoques, 210 gonocoques, 125 sérums positifs en Dengue...

Cette collection en constante augmentation (succession des épidémies de Dengue et Grippe H1N1sw de 2008-2009, épidémie de Leptospirose de 2011) demande une chaîne de froid -80°C sécurisée impliquant des congélateurs sous alarme, une salle de stockage à accès contrôlé, du personnel formé et responsable. De ce fait, même si un congélateur à - 80°C a été acheté en 2009, il sera nécessaire de remplacer en 2011 un autre congélateur vieillissant. Egalement depuis 2009, nous avons amélioré notre dispositif en investissant dans des racks de rangements -80°C plus fonctionnels et plus sûrs.

Enfin, dans le cadre du décret n° 2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain, nous avons, avec le concours de l'Institut Pasteur à Paris, déclaré au ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et au Comité de Protection des Personnes de l'Ile-de-France notre collection d'échantillons d'origine humaine (sérums...).

FOURNITURE DE MILIEUX AU SERVICE SANTE ENVIRONNEMENT DE LA DASS

Le service Santé Environnement de la DASS étant chargé de la surveillance de la potabilité des eaux de boisson, l'IPNC lui fournit, dans ce cadre, des tests H2S au prix de 575 FCP par l'unité, et 455 tubes de milieux.

Remerciements

Nous remercions le Gouvernement de Nouvelle-Calédonie, à travers l'Agence Sanitaire et Sociale, pour l'aide financière apportée aux activités décrites dans ce chapitre.

Nous remercions aussi la DASS-NC pour leur collaboration, et les laboratoires publics et privés qui nous ont fait parvenir leurs souches pour caractérisation ou études.