Rapport d'activité pour l'année 2019
septembre 2020

CNR-MyRMA

Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux (CNR-MyRMA)

Rapport commun des 2 laboratoires :

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix

Site Pitié-Salpêtrière

Responsable : Pr Vincent JARLIER puis Jérôme ROBERT

Laboratoire associé

Unité Fonctionnelle Urgences microbiologiques et mycobactériologie

Département des agents infectieux

Hôpitaux universitaires Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal

Site Lariboisière

Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

Sommaire

Résumé analytique 2019 6
Analytical summary 9
1. Missions et organisation du CNR-MyRMA 12
2. Activités d'expertise 13
2.1. Evolutions des techniques et travaux d'evaluation 13
2.2. Techniques transferees vers d'autres laboratoires, CQE organise pour les autres laboratoires nationaux 13
2.3. Collections de souches 14
2.4. Resultats des expertises 14
2.5. Activites de sequençage genomique « Whole Genome Sequencing » (WGS) 31
3. Activités de surveillance 37
3.1 surveillance de tuberculose resistante 37
3.2. Surveillance de la tuberculose a M. bovis 45
3.3. Surveillance de la meningite tuberculeuse a travers le reseau CNR-MyRMA, tendances evolutives 46
3.4. Contribution aux reseaux de surveillance internationaux, en particulier europeens, de la tuberculose 47
3.5. Registre des cas de tuberculose MDR 47
3.7. Etude genotypique des souches de *M. tuberculosis* : detection et investigation des cas groupes 48
4. Alertes 61
4.1. Tuberculose 61
4.2. Mycobacterioses 61
5. Activités de rétro-information, formation et conseil 64
5.1 Formations, informations et conseils destines aux professionnels de sante 64
5.2. Activites de conseils aux autorites sanitaires 68
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR 70
Publications et communications 71
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire et environnementaux 75
8. Programme d'activité pour les 2 années suivantes 76
8.1. Expertise 76
8.2. Travaux de recherche appliquee 79
8.3. Appui therapeutique 79
8.4. Registre des cas de tuberculose MDR 79
8.5. Contribution a la detection et a l'investigation des cas groupes ou de phenomenes inhabituels 80
8.6. Contribution aux reseaux de surveillance europeens 80
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR 81
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR 90
Annexe 3 : Fiche RCP 94

Liste des tableaux et figures

Tableau 1. Evolution des activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2019 **14**
Tableau 2. Identification des souches de M. tuberculosiscomplex reçues au CNR-MyRMA 2010-2018 **15**
Tableau 3. Evolution de 2006 à 2019 du nombre de souches de mycobactéries non tuberculeuses issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans **16**
Tableau 4. Résistance phénotypique (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues pour multirésistance (MDR) au CNR-MyRMA de 2010 à 2019 **18**
Tableau 5. Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis*complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2019 pour antibiogramme de 2e ligne, dans un contexte autre que la multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1re ligne…) **18**
Tableau 6. Evolution de 2001 à 2019 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA (cf surveillance). Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA **19**
Tableau 7. Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA depuis 2014 **21**
Tableau 8. Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2019 **22**
Tableau 9. Nombre de recherches génotypiques de résistance par PCR-séquençage sur les souches de *M. tuberculosis*complex reçues de 2010 à 2019 **25**
Tableau 10. Distribution des mutations des gènes Rv0678 et atpE dans les souches de M. tuberculosis complex étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2019 pour détection moléculaire de la résistance à la bedaquiline (technique : séquençage Rv0678 et atpE) **27**
Tableau 11. Distribution des mutations des gènes *rrl* et *rplC* dans les souches de *M. tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2019 pour détection moléculaire de la résistance au linezolide (technique : deeplex et wgs *rrl* et *rplC*) **28**
Tableau 12. Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2019) **30**
Tableau 13. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2008 à 2018 : distribution des cas à culture positive selon la nouvelle organisation régionale. Pour 2087, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année. **38**
Tableau 14. Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2018 parmi les nouveaux cas de tuberculose (résistance "primaire") et les cas déjà traités (résistance "secondaire") selon le pays de naissance (France/autres pays). Réseau Azay-Mycobactéries **39**
Tableau 15. Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2018 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**.** **42**
Tableau 16. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2018) **43**
Tableau 17. Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2008 à 2018 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA. **44**
Tableau 18. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants chez les enfants en France entre 2009 et 2018 **44**
Tableau 19. Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 1992 à 2017 **45**
Tableau 20. Nombre et % de tuberculose à *M. bovis* en France, réseau AZAY-Mycobactéries, 2014-2018 **46**
Tableau 21. Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2017 **46**
Tableau 22. Nombre annuel de cas de lèpre diagnostiqués par le CNR-MyrMA depuis 2013 **48**
Tableau 23. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyrMA en 2019, classés selon le contexte épidémiologique **49**
Tableau 24. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* non MDR dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques dans les familles et la communauté et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2019 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage) **50**
Tableau 25. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* dans le cadre des suspicions de rechutes et de suspicions de contaminations de laboratoire : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2019 **51**

Tableau 26. Evolution de 2006 à 2019 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées 1, 2 et 3, et en vert lignée 4) **52**
Tableau 27. Répartition (en nombre) des souches MDR 2019 selon les lignées phylogéniques et les régions géographiques de naissance de 65 patients **52**
Tableau 28. Répartition (en %) des souches MDR 2006-2018 selon les lignées phylogéniques et les régions géographiques de naissance des patients **53**
Tableau 29. Regroupements en clusters par approches MIRU et WGS des souches de *M. tuberculosis* MDR/XDR reçues au CNR-MyRMA en 2019 **54**
Tableau 30. Résumé des analyses de grappes des cas de tuberculose MDR – 2006-2019 **59**
Tableau 31. Résumé des activités de conseil assurées par la RCP du CNR-MyrMA de 2006 à 2019 **66**

Figure 1. Organigramme du CNR-MyRMA **12**
Figure 2. Evolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2019 **20**
Figure 3. Evolution de la distribution des souches MDR et XDR recues au CNR-MyRMA de 2001 à 2019 **23**
Figure 4. Dendrogramme circulaire (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique des 301 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* de la période 2006-2019). La longueur des branches est proportionnelle à la distance en SNPs entre les génomes. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite. Les clades sont indiqués par des caractères de couleur (Beijing en rouge, Haarlem en vert clair, Ghana en bleu clair). **32**
Figure 5. A, B, et C. Dendrogrammes (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique de 301 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* (2006-2019). Les clades sont indiqués par des caractères de couleur : figure A : clade Beijing en rouge, Figure B : clade Haarlem en vert clair, et figure C : clade Ghana en bleu clair. La longueur des branches en SNPs est indiquée au dessus des branches. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite. Les clusters de souches reliées par ≤6 SNPs sont indiqués par des flèches. **34**
Figure 6. Pourcentage de cas groupés de tuberculose RifR / MDR d'origine étrangère par pays de l'UE / EEE. **35**
Figure 7. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 1995 à 2018 : nombre total des cas inclus dans la surveillance, nombre de CHU participants et nombre de régions (ancien découpage). **37**
Figure 8. Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018 **38**
Figure 9. Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018 **40**
Figure 10. Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018 **40**
Figure 11. Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018 **41**
Figure 12. Distribution régionale schématique des cas de tuberculose MDR en 2018 **42**
Figure 13. Dendrogramme circulaire obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M.tuberculosis* (méthode UPGMA) pour le cluster Nr 2 des souches Beijing 100-32. Le nombre de SNP identifiés entre les groupes de souches reliées est indiqué sur les branches. **55**
Figure 14. Dendrogramme pour le cluster Nr 5 des souches LAM 16296-54. **56**
Figure 15. Analyse WGS du cluster 10 **56**
Figure 16. Dendrogramme obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M.tuberculosis* (méthode UPGMA) pour le cluster des souches Haarlem 190-31 **57**
Figure 17. Minimum spanning tree des 6 souches URAL du cluster 163-15 **57**
Figure 18. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 74 souches de *Mycobacterium chimaera* **61**
Figure 19. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 10 souches de *Mycobacterium mucogenicum* **62**
Figure 20. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 10 souches de *Mycobacterium chelonae* **63**

Résumé analytique 2019

Enjeux de santé publique

Les mycobactéries comprenent plus d'une centaine d'espèces, dont :
- **les espèces pathogènes** responsables des deux grandes maladies contagieuses : la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis* complex : *M.tuberculosis, M.bovis, M. africanum*…) et la lèpre (*M. leprae, M. lepromatosis*).
- des **espèces saprophytes** (« mycobactéries non tuberculeuses (MNT)» dont certaines peuvent être responsables d'infections opportunistes (a) chez les immunodéprimés (ex. *M.avium* et SIDA), (b) dans les suites de manœuvres invasives (chirurgie, mésothérapie, tatouage) (ex. *M.chelonae, M.xenopi, M. chimaera*) ou (c) comme complications d'affections respiratoires chroniques (mucoviscidose, autres bronchopathies chroniques, ex. *M.abscessus*).

Tuberculose

Dans le monde (OMS) il y a environ 9 millions de cas de tuberculose. En France, après une régression importante, il reste ~5000 cas/an (incidence ~$7/10^5$) sur la base des cas déclarés qui concernent surtout 2 groupes de population : les sujets âgés nés en France (surtout > 60 ans) et les sujets jeunes nés à l'étranger (surtout 20-44 ans).
La résistance aux anti-tuberculeux joue un rôle essentiel dans la maitrise de la maladie car elle expose au risque d'échec du traitement standard. Cette résistance acquise limite beaucoup les possibilités thérapeutiques en cas d'accumulation de résistance à INH+RIF («multirésistance, MDR») et encore plus en cas de résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et aux aminosides (ex. amikacine) («ultrarésistance, XDR»). Dans ces cas, le succès thérapeutique est très compromis et les taux de mortalité sont élevés.
Dans le monde (données OMS), le nombre de cas MDR est estimé à ~500.000 (~3% des nouveaux cas et ~20% des cas déjà traités), et le nombre de cas XDR est estimé à ~50.000. En France (données CNR-MyRMA), les cas MDR se maintiennent à ~80 cas par an depuis 2016. L'évolution de la résistance aux antituberculeux justifie une surveillance spécifique et l'organisation de réseaux de laboratoires qui ont une activité de mycobactériologie (cf. plus loin) constitue une solution qui complète efficacement la déclaration obligatoire.

Lèpre

Le nombre de nouveaux cas de lèpre est évalué à ~210 000 cas/an dans le monde (OMS) et ~100 nouveaux cas/an en France, dont 1/2 (incidence ~$15/10^5$ habitants) dans l'île de Mayotte. Des cas importés sont aussi diagnostiqués en métropole chez des migrants venant de pays à forte prévalence (Inde, Madagascar, Comores…). *M. leprae* n'est pas cultivable in vitro mais des techniques moléculaires mises en place au CNR-MyRMA permettent de l'identifier dans les biopsies cutanées et déceler les mutations responsables de résistance acquise aux antilépreux.

Infections à mycobactéries non tuberculeuses

Les mycobactérioses, dont le nombre est estimé entre 500-1000 cas par an en France (pas de système de déclaration), posent de difficiles problèmes thérapeutiques en raison du tout petit nombre d'antibiotiques naturellement actifs et de la facilité avec laquelle on sélectionne *in vivo* au cours du traitement des mutants résistants aux rares antibiotiques actifs (ex. clarithromycine et *M.avium*).

Résumé des activités de l'année 2019

Améliorations techniques et évaluation

Détermination du milieu de culture optimal pour les antibiogrammes de mycobactéries du complexe avium
Nous avons montré que le milieu 7H9 était plus adapté et permettait d'obtenir des résultats plus reproductibles que le milieu Mueller Hinton.

Séquençage génomique complet de *M. leprae*
Nous avons mis en place le séquençage génomique complet par NGS pour *M. leprae* suite à notre formation en 2018. En 2019, nous avons donc pu obtenir la séquence génomique de 18 souches venant de patients diagnostiqués à Mayotte et en Nouvelle Calédonie et réaliser des comparaisons de séquences.

Méthode de référence de détermination des CMI sur *M. tuberculosis*
Dans le cadre de EUCAST, nous avons mis au point une méthode de référence pour déterminer les CMI des antibiotiques sur *M. tuberculosis*. Le protocole approuvé par le comité général de l'EUCAST sera dorénavant celui que les industriels devront utiliser pour fournir des « concentrations critiques » pour les nouveaux antituberculeux.

Expertise des souches et prélèvements reçus

Nombre de souches reçues
Nous avons reçus au CNR-MyRMA en 2019 plus de 1100 souches : 813 pour identification, 514 pour tests phénotypiques de résistance, 532 pour tests génotypiques de résistance, 472 pour génotypage et 106 (biopsies) pour diagnostic de lèpre.

Identification des espèces sur les souches reçues

M. tuberculosis complexe : 87% *M. tuberculosis*, 6,9% *M.africanum*, 3,6% *M.bovis.*
MNT: 53% complexe *M. avium*, (dont 28% *M. chimaera), 23*% *M. abscessus*, 8% *M. xenopi*.

Résistance phénotypique acquise des souches
M. tuberculosis complex
- Le CNR reçoit la quasi totalité des souches MDR-XDR identifiées en France, soit 73 souches en 2019 dont 10 XDR.
- Résistance aux principaux antituberculeux de 2ème ligne parmi les souches MDR : 15% à au moins un des 3 aminosides (kanamycine, amikacine, capréomycine), 17% aux fluoroquinolones, et aucune résistance à la bédaquiline et au délamanide contrairement à 2018.

Mycobactéries non tuberculeuses
La résistance acquise n'est trouvée que chez les souches de patients déjà traités (résistance 2aire par sélection de mutants sous traitement) : (a) clarithromycine : 11% chez *M. avium*-intracellulare complex, 2% résistance acquise *M. abscessus subsp. abscessus*; (b) amikacine 6% chez *M. abscessus* ; (c) 0% à la rifampicine chez *M.kansasii*.

M.leprae
Un cas de résistance primaire à la dapsone parmi les 18 nouveaux cas de lèpre bactériologiquement confirmés en 2019 dans les DOM-TOM.

WGS
224 séquençages complets de génomes (WGS) ont été effectués en 2019 : 141 souches de *M. tuberculosis* et 83 souches de MNT (*M. chimaera, M. chelonae, M.marinum, M. abscessus*).
Le partage de données WGS des souches de *M. tuberculosis* MDR a été réalisé avec l'ECDC dans le cadre du programme européen de surveillance moléculaire de la tuberculose MDR.

Activités de surveillance

Surveillance de la résistance 1aire et 2aire à travers le réseau Azay-mycobactérie
- 1810 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2018 par 44 CHU (recueil mené en 2019)
- caractéristiques principales des cas : 7,6 % antécédents de traitement ; 5,5 % VIH+ ; 72,8 % nés à l'étranger
- taux de résistance 1aire (pas d'antécédent de traitement) : 12,3 % à au moins un des 4 antituberculeux de 1ère ligne (6,1 chez les patients nés en France mais 14,5 % chez ceux nés à l'étranger, p<0,01), 6,7 % à l'isoniazide ; 2,5 % à la rifampicine : taux de multirésistance 1aire : 2,0% (double de celui de 2010)
- taux de résistance 2aire (antécédents de traitement) élevé : 19,2% à l'isoniazide, 15,4% à la rifampicine tous MDR
- la presque totalité des cas de multirésistance 1aire et 2aire concernaient des patients nés à l'étranger
- la quasi-totalité des cas résistants à la rifampicine (88%) étaient aussi résistants à l'isoniazide ce qui en fait un bon marqueur de multirésistance.

Surveillance de la tuberculose MDR à travers le réseau CNR-MyRMA
- Cette année, le recueil a été plus complexe et le taux de réponse est plus faible (77% vs >90% les autres années). Au total, 3576 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2018 (119 laboratoires), dont plus d'un tiers concentrés dans 9 laboratoires de CHU et 1 gros laboratoire privé,
- 82 cas MDR en 2018, soit 2,3% du total des cas, ce % étant 3-4 fois plus élevé qu'au début de la surveillance
- 39% des cas sont en Ile-de-France, 82% nés à l'étranger.

Surveillance de formes particulières de tuberculose
- Tuberculose à *M. bovis* en 2018 (à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : 2,4% des cas de tuberculose ce qui est le pourcentage le plus élevé depuis 2014 (0,9 à 2,1%).
- 2 cas de méningite tuberculeuse chez les enfants ≤ 5 ans ce qui ne confirme pas l'augmentation de 2017.

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux de la tuberculose
- Les données du réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance 1aire/2aire ont été envoyées à l'ECDC et à l'OMS.
- Les données de génotypage (méthode MIURU et séquençage génome entier (WGS) des souches MDR ont été envoyées à l'ECDC dans le cadre du projet européen.

Surveillance de la lèpre en France
- 33 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2019 (identique à 2018) par le CNR-MyRMA sur le territoire français dont 24 nouveaux cas : 9 à Mayotte, 1 dans chaque région suivante : Nouvelle Calédonie, Réunion Guadeloupe, Martinique, Guyane et 10 en métropole chez des migrants de régions où la lèpre est encore présente.

Etude génotypique des souches de *M. tuberculosis* pour l'investigation de cas groupés
Tuberculose sensible
- le génotypage a permis de confirmer une relation entre les cas dans 29 situations soumises à enquête (total 76 parmi 130 cas) qui comportaient chacune de 2 à 9 cas reliés (contextes variés : famille, professionnel, scolaire, foyers, communautaire).
- en milieu de soins, le génotypage a permis de confirmer une relation dans 2 situations (4 cas) dont une transmission malade à soignant.

Tuberculose MDR

L'analyse détaillée de 72 souches MDR-XDR de 2019, et incluant le typage MIRU, le résistome et le WGS, a permis d'établir un lien bactériologique très probable pour 60 (83%) souches avec des cas MDR des années antérieures (n=52, 28 clusters), ou avec d'autres cas de 2019 (n=8, 4 clusters).

Interactions avec les autorités sanitaires

Alertes aux autorités sanitaires (ARS, InVS, DGS) pour :
- 37 épisodes de cas groupés de tuberculose par génotypage (29 de TB sensibles et 8 de TB MDR) ont fait l'objet de multiples échanges téléphoniques et courriers, notamment avec les CLAT correspondants.
- Dans le cadre des suites de l'épidémie européenne d'infections post-CEC à *M. chimaera,* le CNR-MyRMA a mené l'étude par WGS des souches françaises (cas et environnement) en collaboration avec l'Allemagne.
- 2 enquêtes autour de cas d'infections à MNT liés aux soins (*M.mucogenicum* à l'hôpital*, M.chelonae* après mésothérapie en ville) et une enquête environnementale autour de cas d'infections respiratoires à *M.abscessus* dans un bâtiment publique.

Information et formation, organisation de contrôle de qualité externe pour les laboratoires
- le site internet http://cnrmyctb.free.fr a été régulièrement mis à jour.
- en 2019 accueil de 5 stagiaires pour une durée totale de 8 mois.
- en 2019 nous avons mené 3 missions : dans le cadre de l'OMS et de la DASS de Nouvelle Calédonie, de l'Ambassade de France en Afrique du Sud+Aviesan.

Réunions de Concertation Pluridisciplinaires des infections à mycobactéries organisées par le CNR-MyRMA
RCP du Groupe thérapeutique « Tuberculose » :
- 298 dossiers pour 136 patients ont été discutés dont 95 cas de tuberculose MDR-XDR de 2019 ou des années précédentes, 11 pour sujets « contact » de cas R ou MDR pour discussion de prophylaxie, 3 cas de tuberculose MDR non diagnostiqués en France, 27 cas de tuberculose compliquée non MDR.
- RCP du Groupe thérapeutique « Mycobactériose » et RCP « lèpre » :
- ce groupe crée en 2018 a effectué 10 réunions pour discuter des cas de 51 patients atteints de mycobactériose et 7 réunions spécifique lèpre pour analyser 13 dossiers.

Conseils auprès des autorités sanitaires et scientifiques
Nationales
- SpFr : épidémie européenne d''infections post-CEC à *M. chimaera*, autres infections à MNT liées aux soins, lèpre;
- HCSP et HAS : groupes de travail sur les nouvelles recommandations ITL ; M.bovis, lèpre.
- INSERM - AVIESAN : pilotage de « l'Action Tuberculose » de l'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M).
Internationales
- ECDC : les 2 laboratoires participent au réseau des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) ; le CNR-MyRMA est membre du comité de coordination de l'ECDC pour l'élaboration du programme « tuberculose » de l'ECDC ; groupe de travail sur l'épidémie européenne d''infections post-CEC à *M. chimaera,* guidelines sur les tests de sensibilité aux antituberculeux, WGS.
- EUCAST (European Union Comittee for Antimicrobial Susceptibility Testing) et EMA (European Agency for Medicine) : élaboration de la méthodologie d'étude des nouveaux antituberculeux ; responsabilité du sous-comité pour les tests de sensiblité aux antimycobactériens.
- OMS : groupe expert « Ulcère de Buruli » ; Technical Advisory Group « Lèpre » (élaboration du programme de lutte contre la lèpre) ; recommandations sur les tests de sensibilité aux antituberculeux
- ESCMID : prospective de l'ESGMYC, co-organisation comité de recommandations sur les infections à MNT.

Publications et communications en relation avec le travail mené au CNR

- 14 publications internationales et 5 nationales ou ouvrages
- 33 conférences sur invitation : 24 nationales, 9 internationales,
- 22 communications : 10 nationales, 12 internationales
- 4 organisations de colloques / congrès

Analytical summary

Public Health issues

There are more than 100 species of mycobacteria, among which:
- pathogenic species responsible for two contagious diseases: tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, M. bovis, M. africanum …) and leprosy (*M. leprae, M. lepromatosis*).
- saprophytic species ("non tuberculous mycobacteria (NTM)" : some of them responsible for opportunistic infections (a) in immunosuppressed patients (e.g. *M. avium* and AIDS), (b) following invasive procedures (surgery, mesotherapy, tattoo…) (e.g. *M. chelonae, M. xenopi, M. chimaera*) or (c) as complications of chronic respiratory affections such as cystic fibrosis and other chronic bronchopathies (e.g. *M. abscessus*).

Tuberculosis (TB)
Circa 9 millions of TB cases occur each year in the world (WHO). In France, after an important decrease during the last decades, there are circa 5000 cases/year (incidence $7/10^5$), concerning especially 2 groups of population: old nation-borns (mainly >60 years) and young foreign-borns (mainly 20-44 years).
Resistance to antituberculous drugs is a major issue because of the risk of failure of the standard treatment regimen. Resistance to both INH+RIF ("multiresistance, MDR-TB") dramatically restricts the therapeutic optons, even more in case of additional resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides (e.g. amikacine) ("extensively-resistance, XDR-TB "). In these situations, the mortality rates are high. In the world (WHO), the number of MDR-TB is estimated at ~500.000 (~3 % of 1ary resistance, ~20 % of 2ary resistance) and the number of XDR cases is estimated at ~50.000. In France (CNR-MyRMA data), the number of MDR-TB cases remains circa 80 cases/year since 2016.
The evolution of resistance to anti-TB drugs justifies organizing sustained surveillance, which is based France on two networks of laboratories with mycobacteriology activity (see infra) in addition to the mandatory notification system.

Leprosy
Circa 210 000 new cases/year of leprosy occur in the world (WHO) and ~100 new cases/year in France in overseas territories (incidence ~15/105 in Mayotte, an island in Indian Ocean). In addition, imported cases are regularly diagnosed in mainland in migrants from countries with high prevalence (India, Madagascar, Comoros). *M. leprae* cannot grow in vitro but molecular techniques available at the CNR-MyRMA allow identifying this species in skin lesions as well as detecting mutations involved in acquired resistance to antileprous agents.

NTM infections
The number of NTM infections, is estimated between 500-1000 cases/year in France (no system for declaration), raising therapeutic difficulties due to the small number of naturally active antibiotics and the risk of selecting resistant mutants under treatment (e.g. clarithromycin and *M. avium*).

Main results from 2019

Technical improvement and evaluation of new methods

Identification of the best culture media for antibiotic susceptibility tresting of *M. avium*
We showed that the medium of choice for AST of NTM was the 7H9 medium as compared to the MH media..

WGS for *M. leprae*
The PCR technic developped at the NRC *M. leprae* was applied to 18 isolates from Mayotte and New Caledonia.

A reference method for MIC determination against *M. tuberculosis*
In our European Eucast duty, we developed a new method for determination of the MIC of drugs against M. tuberculosis. The Eucast general committee endorsed this new method.

Analysis of isolates and samples

In 2019, circa 1100 isolates/samples were received at the NRC: 813 for identification, 514 for phenotypic AST, 532 for genotypic AST, 472 for genotyping and 108 for leprosy.

Species identification
- Among *M. tuberculosis* complex isolates: 87% *M. tuberculosis*, 6.9% *M.africanum*, 3.6% *M.bovis*
- Among NTM isolates: 53% *M. avium* complex (28% *M. chimaera), 23*% *M. abscessus*, 8% *M. xenopi*.

Acquired resistance determined by phenotypic testing
M. tuberculosis complex
- Almost all MDR isolated in France are sent to the CNR-MyRMA, i.e. 73 MDR in 2019, including 10 XDR isolates.
- Among all MDR isolates, 15% were resistant to at least one of second line injectable drugs (kanamycin, amikacin, capreomycin), 17% to fluoroquinolones, and none to bedaquiline and delamanid, on the contrary to 2018.

Non-tuberculous mycobacteria (NTM)
Acquired resistance to antimicrobial agents is observed only in previously treated cases (selection of resistant mutant). Resistance was detected (a) for clarithromycin: 11% in *M. avium*-intracellulare complex, 2% of acquired resistance in *M. abscessus subsp abscessus*; (b) for amikacin: 6% in *M. abscessus* (c) 0% to rifampicin in *M. kansasii*.

M .leprae
One case of primary resistance to dapsone was detected among the 18 new leprosy cases diagnosed in DOM-TOM in 2019.

Whole genome sequencing
224 whole genome sequencing have been performed in 2019: 141 *M. tuberculosis* and 83 NTM isolates (*M. chimaera, M. chelonae, M. marinum, M. abscessus*).
WGS data for *M. tuberculosis* MDR isolates were shared with ECDC (European programme for MDR tuberculose molecular survey).

Surveillance

Surveillance of resistance to antituberculous agents through the University laboratory networks
Primary and secondary resistance through the network "Azay-mycobactérie" (44 University Hospitals)
- 1810 culture-positive TB cases diagnosed in 2018 (study conducted in 2019)
- Main characteristics: 7.6% previously treated TB; 5.5% HIV-positive; 72.8% born outside France.
- 1ary resistance rates (untreated patients): 12.3% of resistance to at least one of the first line drugs (6.1% in patients born in France but 14.5% in foreign born patients ($p<0.01$); 6.7% to isoniazid, 2.5% to rifampicin, and 2.0% of MDR (doubled from 2010).
- Secondary resistance rate (previously treated patients): 19.2% to isoniazid, 15.4% to rifampicin, all were MDR.
- Nearly all MDR cases were in foreign born patients
- 88% of rifampicin resistant isolates were also isoniazid resistant (MDR), showing that RIF-resistance is a good marker for detecting MDR isolates.

Surveillance of multidrug-resistant cases through the CNR-MyRMA laboratory network
- In 2019-2020 the data collection was more complex and the answer rate was lower (77% vs >90% usually). Overall, 3576 culture-positive TB cases were reported in 2019 by 119 laboratories, among which more than 1/3 were reported by 9 teaching hospitals and 1 big private lab.
- 82 MDR cases in 2018, 2.3% rate, this % being 3-4 times higher than in the beginning of the surveillance.
- 39% of the cases are diagnosed in Paris area, 82% are foreign-born.

Surveillance of specific forms of TB
- TB due to *M. bovis:* 2.4% cases reported through the University hospitals network, the highest rate since 2014 (0.9% to 2.1%).
- TB meningitis: 2 cases among children ≤ 5 yo (indicator for BCG vaccination policy efficacy) in 2018, which does not confirm the highest number of 2017.

Participation in international surveillance networks
- Data from the University hospitals network on primary and secondary resistance were sent to ECDC and WHO-Europe.
- WGS genotyping results of MDR isolates were sent to ECDC.

Surveillance of leprosy
- 33 cases of multibacillary (MB) form of leprosy were diagnosed in 2019 (same as 2018) including 24 new cases: 9 in Mayotte, and 1 in each of the following regions: New Caledonia, Réunion, Guadeloupe, Martinique, French Guyana, and 10 in metropolitan France in persons originated from leprosy endemic countries.

Genotypic study of clinical isolates of *M. tuberculosis*for epidemiological purpose
Non-MDR TB
-by genotyping, we confirmed epidemiological links between TB cases in 29 different situations (total 76 cases, among 130 cases) with various contexts (family, professional exposure, school, shelter). In addition, 2 clusters of 2 cases each were identified in healthcare settings including one case of transmission to the healthcare staff.

MDR-TB
By genotyping, the 72 MDR-XDR isolates from 2019 (using MIRU, resistome and WGS) allowed to identify a link for 60 (83%) 2019 cases with MDR patients from previous years (n=52, 28 clusters), and with in the same 2019 year (n=8, 4 clusters).

Interaction with health authorities

Involvement in health authorities' actions for specific events

- 37 clusters identified (29 of susceptible TB & 8 of MDR TB) led to multiple exchanges between NRC and authorities
- NRC participed to the European investigation of the outbreak of post-cardiac surgery invasive *M. chimaera* infections by genotyping isolates in collaboration with Germany.
- 2 investigations around cases of health-associated MNT infections (*M. mucogenicum* and *M. chelonae*) and one environmental investigation for respiratory infections due to *M. abscessus*.

Information, training, involvement in quality control for clinical laboratories
- NRC website (http://cnrmyctb.free.fr) is regularly updated
- NRC received 5 fellows during a total of 8 months.
- NRC did 3 missions outside France for ECDC, the New Caledonia DASS and the French Ambassy in South Africa.

Counselling for difficult to treat mycobacterial infections (therapeutic consilium)
- MDR-TB therapeutic consilium: in 2019, 298 patients' charts for 136 patients have been discussed: 95 MDR-XDR cases; 11 persons in contact with MDR TB cases for prophylaxis; 3 MDR cases diagnosed outside of France; 27 non MDR complicated TB cases.
- "NTM" consilium and "Leprosy" consilium: these consilium created in 2018 made 10 meetings to review 51 NTM patients' charts, and 7 meetings for 13 leprosy cases.

Counselling to health and scientific authorities
National
- SPF & ANSM: European outbreak of post cardiac surgery of invasive *M. chimaera* infections, leprosy, NTM infections linked to healthcare;
- INSERM: TB thematic (scientific meetings, grant review, symposia)
- HCSP & HAS: working groups for new recommendations on latent TB, leprosy, *M. bovis*
International
- ERLTB-Net-ECDC: the 2 CNR-MyRMA laboratories belong to the network of TB national reference laboratories organized by the ECDC; NRC is member (a) of ECDC coordination committee for TB programme; (b) working group on European outbreak of post cardiac surgery of invasive *M. chimaera* infections
- EUCAST (European Union Comittee for Antimicrobial Susceptibility Testing) and EMA (European Agency for Medicine): EMA guidelines on susceptibility tests for new anti-TB agents; NRC is leading the EUCAST sub-committee for anti-TB susceptibility tests.
- WHO: participation in the guidelines for drug susceptibility tests in TB; member of the Buruli expert group; member of the leprosy advisory group (elaboration of leprosy programme); NRC is leading the WHO surveillance network for drug resistance in leprosy;
- ESCMID: co-organisation of the committee for new recommandations in MNT infections

Publications and communications on the theme
- 14 international publications
- 33 invited conferences: 24 at national, and 9 at international meetings
- 22 communications during meetings: 10 national, and 12 internationals meetings
- 4 conferences or workshop organized by NRC members

1. Missions et organisation du CNR-MyRMA

Les missions des 2 laboratoires du CNR-MyRMA n'ont pas été modifiées et sont exposées dans l'annexe 1.

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires de bactériologie médicale dont les activités sont complémentaires (cf. organigramme ci-dessous) ce qui permet de répondre à l'ensemble de ses missions.

Figure 1. Organigramme du CNR-MyRMA

Nom des personnes assurant les fonctions de responsables adjoints du CNR :
Pr Emmanuelle Cambau et Pr Jérôme Robert

Degré d'avancement de la démarche qualité (**accréditation**) : **cf annexe 1.**

Fiche d'identité des deux laboratoires du CNR-MyRMA : (Site Internet : http://cnrmyctb.free.fr)

- ***Laboratoire coordonnateur***

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène
Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière - 47-83 Boulevard de l'hôpital 75634 PARIS cedex 13
+33 (0) 1 42 16 20 70 secrétariat - +33 (0) 1 42 16 20 83 bureau médical - Télécopieur : +33 (0) 1 42 16 20 72
Courriel : cnr.myctb.psl@aphp.fr, francesca.catalano@aphp.fr
Responsable médical et scientifique : Pr Vincent JARLIER puis Pr Jérôme ROBERT
Courriel : vincent.jarlier@aphp.fr puis jerome.robert@aphp.fr
Responsable administratif : Marie-Anne RUDER, Directrice du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière

- ***Laboratoire associé***

Unité Fonctionnelle Urgences microbiologiques et mycobactériologie - Département des agents infectieux
Hôpitaux universitaires Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal, Site Lariboisière
2, rue Ambroise Paré 75010 Paris
+33 (0) 1 49 95 65 51 secrétariat - +33 (0) 1 49 95 65 54 bureau médical - Télécopieur : +33 (0) 1 49 95 85 37
Responsable médical et scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU, emmanuelle.cambau@aphp.fr
Responsable administratif : Bénédicte ISABEY, Directrice de l'hôpital Lariboisière

2. Activités d'expertise

2.1. Evolutions des techniques et travaux d'évaluation

Evaluation du milieu optimal pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses (NTM) du complexe. *M. avium*

Le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommande l'utilisation du milieu Mueller Hinton (MH) pour réaliser les antibiogrammes des NTM du complexe *Mycobacterium avium* (MAC) par la méthode de microdilution. En l'absence de données étayant cette recommandation, nous avons évalué l'impact du milieu utilisé sur la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des MAC, en comparant les résultats obtenus avec le MH et le 7H9. Nous avons montré que le 7H9 est plus performant que le MH pour l'amikacine. Ce milieu étant également associé à une plus grande reproductibilité et une lecture plus aisée des CMI, nous proposons l'utilisation du milieu 7H9 pour les antibiogrammes de MAC.
Ce travail a fait l'objet d'une publication : Rational Choice of Antibiotics and Media for Mycobacterium avium Complex Drug Susceptibility Testing. Jaffré J, Aubry A, Maitre T, Morel F, Brossier F, Robert J, Sougakoff W, Veziris N; CNR-MyRMA (Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux). Front Microbiol. 2020 Feb 19;11:81. doi: 10.3389/fmicb.2020.00081).

Séquençage génomique complet de *M. leprae*

Suite à la formation de notre équipe au séquençage du génome entier (Whole Genome sequencing, WGS) de *M.leprae* à Lausanne (équipe du Pr Stewart Cole) en 2018, nous avons mis en place le séquençage génomique complet par NGS pour *M. leprae* de façon à être capables de (i) étudier l'ensemble des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux antilépreux (résistome), (ii) pouvoir ajouter aux études d'épidémiologie classique de la lèpre, dans les pays d'Outre mer en particulier, des données d'épidémiologie moléculaire et (iii) pour participer et contribuer aux études mondiales de diffusion des souches.
En 2019, nous avons obtenu la séquence génomique de 18 souches venant de patients diagnostiqués à Mayotte et en Nouvelle Calédonie. Les séquences sont comparées entre elles avec le logiciel Bionumerics et sont aussi comparées aux séquences obtenues précédemment par l'équipe du Pr S. Cole. Les résultats sont présentés plus loin voir § 2.5.3).
Comme *M. leprae* ne cultive pas in vitro, nous sommes obligés de partir de biopsies cutanées riches en bacilles lépreux. Nous avons obtenu des séquences avec une bonne qualité de lecture et de couverture (23-168 X, mediane 112X) pour des prélèvements cutanés qui contiennent ≥10^6 bacilles/ml (frottis positif avec ≥ 1 à 9 baar/champ après coloration de Ziehl-Neelsen).

Méthode de référence de détermination des CMI sur *M. tuberculosis*

Dans le cadre de notre mission européenne à EUCAST, nous avons mis au point une méthode de référence pour déterminer les CMI des antibiotiques sur *M. tuberculosis*. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur la souche de référence H37Rv. Les CMI de trois antituberculeux (isoniazide, lévofloxacine, amikacine) ont été déterminées selon un même protocole par 4 laboratoires de référence européens dont le notre. Le protocole a été finalisé lorsque nous une répétabilité et une reproductibilité supérieures à 95% ont été obtenues pour les 3 antibiotiques.
Le protocole a été approuvé par le comité général de l'EUCAST, a été soumis publiquement aux commentaires et questions pendant 4 semaines, et a été finalement publié sur le site de EUCAST (https://eucast.org/mycobacteria).
Ce protocole sera dorénavant celui que les industriels devront utiliser pour fournir des « concentrations critiques » pour les nouveaux antituberculeux. Il permettra aussi de remettre à jour les concentrations critiques pour les anciens antituberculeux conformément à ce qui est fait au niveau européen pour les autres bactéries et autres antibiotiques.

2.2. Techniques transférées vers d'autres laboratoires, CQE organisé pour les autres laboratoires nationaux

Les techniques transférées vers d'autres laboratoires correspondent à celles figurant dans la liste des techniques commercialisées recommandées par le CNR-MyRMA aux laboratoires pratiquant la mycobactériologie en annexe 2.

Un Contrôle de qualité externe AVIT été conçu et organisé en 2017, à la demande de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), pour **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie en France** (dont les laboratoires des CHU du réseau « AZAY-mycobactéries ») (cf rapport 2018).
Il n'a pas été organisé de nouveau CQE en 2019 en raison de la lourdeur et du coût de cette activité qui ne peut être entrepris qu'avec l'aide de l'ANSM.

2.3. Collections de souches

Comme dit dans l'annexe, toutes les souches de mycobactéries reçues sont stockées et consignées dans le fichier informatique correspondant.

2.4. Résultats des expertises

Les délais de culture des mycobactéries étant très longs (jusqu'à 2 mois pour certaines souches ou espèces), nous **procédons d'abords à des tests génotypiques qui permettent de générer des informations plus précoces** importantes pour les **prises de décisions médicales**.
Les **délais habituels de rendu des résultats** par rapport à l'arrivée d'une souche (non contaminée et en quantité suffisante, ne nécessitant pas de repiquage) au laboratoire sont les suivants :
- **identification de l'espèce** : une semaine
- **génotype de résistance aux antibiotiques** par amplification-hybridation sur bandelettes et technique Diplex (« antibiogramme moléculaire ») : une semaine
- **antibiogramme phénotypique complet** pour *M. tuberculosis*: 1,5 à 2,5 mois.

<u>En 2019 le CNR-MyRMA a reçu 1120 souches ou biopsies,</u> pour 1 ou plusieurs tests, comme suit :
- **813 pour identification**
- **514 pour tests phénotypiques de sensibilité**
- **532 pour tests génotypiques de sensibilité**
- **248 pour génotypage épidémiologique**
- **224 pour WGS**
- **106 biopsies pour diagnostic de lèpre et tests génotypiques de sensibilité**

Tableau 1. Evolution des activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2019

Souches soumises à	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Identification	**794**	**988**	**897**	**900**	**871**	**801**	**752**	**858**	**889**	**813**
M. tuberculosis	366	385	430	492	501	417	393	460	443	336
Mycob. atypiques	428	603	467	408	370	384	359	398	446	477
Tests phénotypiques de sensibilité	**468**	**551**	**542**	**464**	**548**	**508**	**480**	**556**	**560**	**514**
M. tuberculosis[b]	160 (126)	170 (139)	217 (164)	211 (181)	236 (212)	240 (188)	214 (162)	277 (228)	270 (194)	261 (154)
Mycob. atypiques	308	381	325	253	312	268	266	279	290	253
Tests génotypiques de sensibilité	223	278	358	325	434	435	468	**529**	**501**	**532**
M. tuberculosis	201	232	284	267	281	285	236	280	230	220
Mycob. atypiques	22	46	74	78	153	150	232	249	271	312
Génotypage épidémiologique[c]	**153**	**119**	**276***	**203**	**227**	**194**	**160**	**227**	**445**	**248**
M. tuberculosis	153	119	267*	198	225	174	153	197	344	228
Mycob. atypiques	-	-	9	5	2	20	7	30	101	20
Séquençage génome (WGS)								**68**	**217**	**224**
M. tuberculosis								38	119	141
Mycob. atypiques								30	98	83
Biopsies lèpre[d]	**25 (7)**	**51 (22)**	**53 (24)**	**45 (25)**	**87 (31)**	**70 (30)**	**74 (23)**	**111 (27)**	**111 (33)**	**106 (33)**

b : dont (N) souches pour lesquelles il y a eu un **antibiogramme de 1re ligne <u>et</u> un antibiogramme de 2e ligne**
c : empreintes digitales génomiques (épidémiologie)
d : dont (N) biopsies positives à *M.leprae* et soumises à des tests génotypiques de résistance.
*Rattrapage de l'année 2011. Moyenne sur les années 2011 et 2012 =193

A. Identification des souches

813 souches de mycobactéries reçues en 2019 ont été soumises à identification : **336 souches étaient du complexe *M. tuberculosis*** et **477 étaient des mycobactéries non tuberculeuses.**

A.1. Souches de M. tuberculosis complex

Parmi les 537 s*ouches de M. tuberculosis* complexe reçues en 2019, **334 (62%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce.** La décision d'identifier jusqu'à l'espèce par des méthodes moléculaires toutes les souches du complexe prise début 2017 (cf. projet pour la mandature) a dû être abandonnée au cours de 2018 **en raison de la diminution drastique du financement** du CNR. **Nous sommes revenus à notre politique précédente** basée sur les aspects culturaux évoquant *M. bovis, M. bovis BCG ou M. africanum.*

Parmi ces 334 souches on note (tableau ci-dessous):

- **290 *M. tuberculosis*** (**87%**), espèce principale responsable de tuberculose humaine,
- **12 *M. bovis* (3,6%).** Depuis 2010, ce nombre est compris entre 5 et 13, même en 2017 où nous avions identifié presque toutes les souches, suggérant qu'il n'y a pas d'augmentation évidente de tuberculose à bacille bovin en France.
- **9 *M. bovis var BCG* (2,7%)** (nombre en baisse par rapport à 2015, dans la lignée des années précédentes),
- **23 *M. africanum* (6,8%).** Depuis 2010, ce nombre est compris entre 6 et 24.

Tableau 2. Identification des souches de M. tuberculosiscomplex reçues au CNR-MyRMA 2010-2018

Espèces	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Identification au sein du complexe	**157**	**242**	**201**	**277**	**189**	**191**	**194**	**424**	**389**	**334**
M. tuberculosis	140	212	164	240	153	169	168	390	360	290
M. bovis	6	12	13	11	11	6	4	5	11	12
M. africanum	6	7	8	15	8	14	9	24	10	23
M. bovis var BCG	5	9	13	11	16	2	12	5	7	9
M. caprae								0	1	0
M. canettii		1	3					0	0	0
M. microti		1			1		1	0	0	0
M. tuberculosis complex sans identification au sein du complexe	**209**	**143**	**229**	**215**	**312**	**226**	**198**	**36**	**54**	**203**
Total *M. tuberculosis*complex	**366**	**385**	**430**	**492**	**501**	**417**	**393**	**460**	**443**	**537**

A.2. Souches de mycobactéries non tuberculeuses

La répartition des principales espèces parmi les 477 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues pour identification en 2019 était la suivante :

- **245 souches du complexe *M. avium* (MAC)** (53% du total) dont 105 *M. avium,* 68 *M. intracellulare* et 68 *M. chimaera*. Parmi ces souches, **240 (98%) ont été considérées comme responsables d'infections**, essentiellemnt respiratoires.
- **90 souches de *M. abscessus*** (23% du total) : 62 *M. abscessus subsp. abscessus,* 10 *M. abscessus subsp. bolletii*, 18 *M. abscessus subsp massiliense*, **dont 80 (89%) responsables d'infections**
  - 78 étaient issues de prélèvements respiratoires (dont 66 de patients atteints de mucoviscidose), dont **70 considérées comme responsables d'infections**
  - 10 étaient issus de prélèvements cutanéo-muqueux (2), articulaires (4), os (1), hémoculture (3), **toutes considérées comme responsables d'infections**.
- **38 souches de *M. xenopi*** (8% du total) toutes considérées comme responsables d'infections.
- **23 souches de complexe *M. fortuitum* et apparentés** (6% du total) dont 20 *M. fortuitum fortuitum*, 1 *M. mucogenicum,* 2 *M. setense*, **dont 19 (72%) considérées comme responsables d'infections** : 11 infections respiratoires, 2 infections sur dispositif vasculaire (PAC), 3 infections cutanéo-muqueuses, 1 infections ostéo-articulaires, 1 adénopathies, 1 sinusite
- **30 souches de *M. chelonae et apparentées (M. salmoniphilum)***(4% du total) dont **26 (83%) considérées comme responsables d'infections** : 25 infections extra-respiratoires (13 cutanéo-muqueuse,4 ostéo-articulaire, 4 kératites conjonctives, 4bactériémies) et 1 infection pulmonaire.
- **17 souches de *M. kansasii***, agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose, **toutes considérées comme responsables d'infections.**
- **7 souches de *M. simiae*** dont **6 considérées comme responsables d'infection**

- **27 souches réparties en 14 espèces rares hors complexes *avium*, *fortuitum* et *chelonae*** (6% du total), dont les plus importantes sur le plan médical (c.a.d. le plus souvent ou toujours responsables d'infections) sont *M. marinum (n=8), M. ulcerans* (n=2)*,* et *M. lentiflavum (n=2), M. goodii (n=1), M. neorum (n=1), M. senegalense (n=1).*

Quelques souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2019 (n = 6) appartenaient à des espèces rares n'ont pas été identifié jusqu'à l'espèce (pas d'indication médicale).

Au total, 88% des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2019 étaient responsables d'infections, dont 4/5 d'infections respiratoires et 1/5 d'infections des tissus mous, ostéo-articulaires, ganglionaires ou bactériémiques. Ce pourcentage très élevé est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses activités sur les souches importantes sur le plan médical.

Tendances évolutives 2006-2019

La distribution entre les principales espèces de mycobactéries non tuberculeuses d'intérêt médical (*M. avium, M. intracellulare, M. xenopi, M. kansasii, M. abscessus, M. chelonae, M. fortuitum*) est restée globalement stable entre 2010 et 2018.
On note une réaugmentation du nombre de souches du complexe MAC recçues après la diminution observée dans les années 2014-2018.
L'augmentation du nombre de souches *de M. chimaera* (5 en 2014, 29 en 2015, 44 en 2016, 63 en 2017, 56 en 2018 et 68 en 2019 est liée à l'intérêt récent porté aux infections iatrogènes causées par cette espèce qui n'était pas auparavant différenciée de *M. intracellulare.*

Dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt en 2007 de l'obligation vaccinale par le BCG, 1 souches de *M. avium* reçue en 2019 a été isolée d'adénite chez un enfant de moins de 5 ans.
Le nombre de ces cas, qui avait nettement augmenté de 2006 à 2011, a considérablement baissé depuis (Tableau ci-dessous).

Tableau 3. Evolution de 2006 à 2019 du nombre de souches de mycobactéries non tuberculeuses issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans

Année	N de cas
2006	3
2007	5
2008	7
2009	9
2010	11
2011	19
2012	12
2013	12
2014	3
2015	4
2016	6
2017	2
2018	5
2019	1

B. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

B.1. Tests phénotypiques de sensibilité de M. tuberculosis complex

Les tests de sensibilité sur **261 souches de *M. tuberculosis* complex reçues pour cela en 2019** ont été :

- seulement un **antibiogramme** « **standard de 1ère ligne**» (antituberculeux **de 1ère ligne**) pour **35 souches**, le plus souvent quand les laboratoires d'origine ne parvenaient pas à réaliser l'antibiogramme ou parce qu'il y avait un doute sur la validité des résultats,

- un antibiogramme « **complet** » (antituberculeux **de 1ère ligne et de 2ème ligne**) pour **154 souches**, **dont 69 envoyées pour multirésistance** et **85 envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance** (ex. résistance à l'isoniazide et crainte de résistance associée à la rifampicine) ou parce que les patients présentaient des **intolérances médicamenteuses**).

- un **antibiogramme partiel** pour **un seul antibiotique pour 72 souches** (pour le pyrazinamide pour vérification du résultat du laboratoire d'origine ou les fluoroquinolones pour les cas de mono-résistance à l'isoniazide ou d'intolérance médicamenteurse et pour lesquels il était prévu de prescrire une fluoroquinolone).

Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne des 189 souches reçues pour cela en 2019

- **42%** étaient **multisensibles**, c.a.d. sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine)
- **58%** étaient **résistantes** à au moins un des 4 antibiotiques ci-dessus, dont **36%** étaient **phénotypiquement multirésistantes** (MDR) c.a.d. résistantes à l'isoniazide **et** à la rifampicine. (tableau **ci-dessous).**

La proportion de souches multisensibles parmi les souches *de M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA est toujours très basse ce qui reflète la volonté du CNR-MyRMA de se concentrer sur l'étude des souches résistantes et d'éviter de travailler sur des souches sensibles qui peuvent facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières, par exemple suspicion de résistance finalement non confirmée, intolérance aux antituberculeux de première ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats.

Ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité que l'on peut établir des statistiques représentatives de la sensibilité aux antituberculeux de 1ère ligne en France, **mais à partir du travail en réseau spécifiquement organisé pour cela** (réseau AZAY-mycobactéries, cf. section « Surveillance»).
Enfin, il est important de noter que le nombre de souches envoyées pour étude spécifique de la sensibilité aux fluoroquinolones augmente d'années en années. Nous avons été obligés de nous adapter, et compte tenu de la diminution des moyens financiers alloués au CNR, de n'étudier que la sensibilité à ces antibiotiques sans contrôler l'ensemble de l'antibiogramme.

Résistance aux antituberculeux de 2ème ligne de 154 souches reçues en 2018

Souches reçues pour multirésistance (MDR) (n = 69)

Sur les 73 souches MDR reçues pour multirésistance en 2019 4 n'ont pas fait l'objet de tests phénotypiques mais seulement de tests génotypiques car trop dysgoniques.

Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau ci-dessous**) : streptomycine 78%, éthambutol 58%, pyrazinamide 66%, éthionamide 87%, cyclosérine 48%, PAS 24% et, pour les antituberculeux qui entrent dans la définition de l'ultrarésistance (XDR), **au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 15%, fluoroquinolones 17%.**
Ces chiffres ont peu évolué depuis 2010, à part :

- **l'augmentation passagère en 2013-14 des % de résistances aux aminosides de réserve et aux fluoroquinolones**
- **la diminution passagère du % de résistance à l'éthionamide en 2016-2018**
- en 2019 : on note **nette progression de la résistance à l'éthionamide et à la cyclosérine** par rapport aux années antérieures.

Les % inquiétants de résistance à la bédaquiline au délamanide ou au linezolide observés en 2017-18, n'ont heureusement pas été confirmés en 2019. Cependant il faut noter que le délamanide n'a pu être testée que sur seulement 12 des 69 souches.

Tableau 4. Résistance phénotypique (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues pour multirésistance (MDR) au CNR-MyRMA de 2010 à 2019

	Années (n souches testées)	2010 (45)	2011 (64)	2012 (92)	2013 (83)	2014 (111)	2015 (98)	2016 (71)	2017 (79)	2018 (80)	2019 (69°)
a	Ethambutol	66	70	58	66	70	65	55	53	66	58
	Pyrazinamide				40	50	43	48	48	60$^{\mu}$	66$^{\mu}$
	Streptomycine	75	80	70	73	81	69	72	67	79	78
b	Amikacine	13	9	13	20	12	14	12	4	9*	6*
	Kanamycine	20	23	27	41	31	26	20	22	21*	15*
	Capréomycine	12	11	14	23	18	13	14	5	9*	10*
c	Fluoroquinolones	23	22	28	30	39	20	17	18	25$^{\$}$	17$^{\$}$
d	Ethionamide	75	82	62	73	64	71	52	23	36	87
e	PAS	9	17	17	24	14	5	10	9	14$^{\mu}$	24$^{\mu}$
	Cyclosérine	9	18	28	24	19	10	13	13	21	48
	Bédaquiline					3	2	0	3	6	0
	Linezolide	0	0	1	0	1	1	1	4	4	1
	Délamanide									5$^{£}$	0$^{£}$

a: antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine
b: aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition de XDR) ; c : entre dans la définition de XDR
d : ou prothionamide ; e : antibiotiques de « dernière ligne »
$^{\mu}$ % calculé sur les 59 et 49 souches qui ont pu bénéficier d'un test de sensibilité au pyrazinamide et au PAS respectivement en raison d'une rupture d'approvisionnement chez le fournisseur
* 4 souches résistantes aux 3 aminosides
$^{\$}$ parmi les 12 souches résistantes à 2 mg/l d'ofloxacine (définition OMS de la résistance aux fluoroquinolones), 4 (un tiers) restaient sensibles à 2 mg/l de moxifloxacine.
§% calculé sur les 61 souches qui ont pu bénéficier d'un test de sensibilité à l'éthionamide en raison d'un problème de lot
£ test pratiqué sur 73 des 80 souches de 2018 et 12 des 69 souches de 2019
° : 4 souches non testées phénotypiquement (trop dysgoniques)

La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un aminoside de réserve (**XDR**) était de **14%** soit **10 souches XDR identifiées en 2019 (cf. Tableau ci-dessous).**

Souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (n=85)

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient très basses parmi les 85 souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. suspicion initiale de multirésistance mais non confirmée, effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine ou à l'isoniazide…) (**tableau ci-dessous**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est bien sûr logique **: fait important et positif aucune résistance à l'amikacine, aux fluoroquinolones ou à l'éthambutol n'a été détectée.**

La faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR (<1% pour la période 2010-2019) est rassurante car l'utilisation large de cette famille d'antibiotiques dans la communauté (infections urinaires, respiratoires etc…) fait craindre une émergence plus marquée de la résistance parmi les souches de *M. tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de 1ère ligne et, à terme, l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de 2éme ligne.

Tableau 5. Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis*complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2019 pour antibiogramme de 2^{e} ligne, dans un contexte autre que la multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1re ligne…)

Années (n souches)	2010 (81)	2011 (75)	2012 (67)	2013 (98)	2014 (101)	2015 (90)	2016 (91)	2017 (146)	2018 (114)	2019 (85)
Ethambutol	13	13	3	5	4	2	5	1	7	0
Streptomycine	43	43	28	36	22	24	26	20	25	5
Amikacine	3	3	0	1	0	1	0	0	1	0
Fluoroquinolones	0	0	1	2	2	0	0	2	0	0
Ethionamide	59	59	66	40	62	-*	-*	-*	-*	5*
PAS	11	11	3	8	8	6	5	2	3	3

*l'éthionamide, non utilisé hors multirésistance, n'est plus testé systématiquement sur les souches non MDR

Il faut noter (a) la **stabilité** du nombre de **souches MDR** reçues de **2001 à 2010** (moyenne 48 cas/an), (b) **l'augmentation** en 2011 (69 cas), (c) **la stabilisation entre** en 2012 et 2015 **autour d'une centaine de cas annuels et enfin (d) une diminution stabilisée autour de 70-80/an de 2016 à 2019. Le nombre de souches MDR est cependant resté ces 2 dernières années très supérieur (82 en 2017, 82 en 2018, 72 en 2019) à celui d'avant 2011 (40-50 cas)**.
Le **nombre de souches XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002) **a augmenté** à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011, 17 en 2012, 22 en 2013, 26 en 2014 puis **a diminué à 6-11 depuis 2015.**

Fait important en matière de surveillance, la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA (**cf. section surveillance §3.1.3**) et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* (tableau ci-dessous) a augmenté entre les périodes 2001-02 (~60 %) et 2010-15 (98-100 %). **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la totalité des souches MDR de France, en cohérence avec les recommandations du HCSP.**

Tableau 6. Evolution de 2001 à 2019 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA (cf surveillance). Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA

	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Exhaustivité envoi souches (%)	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues au CNR-MyRMA
2001	29	48	60	0	0
2002	47	79	59	1	2
2003	60	77	78	2	3
2004	51	68	75	1	2
2005	60	65	92	1	2
2006	53	60	88	2	4
2007	38	44	86	2	5
2008	51	57	89	2	4
2009	48	48	100	4	8
2010	45	47	96	6	13
2011	69	75	92	6	8
2012	92	94	98	17	18
2013	83	82	100	22	27
2014	111	110	100	26	23
2015	98	95	100	10	10
2016	71	70	100	6	8
2017	82	78µ	100	10	12
2018	82**	**82**	100	11	13
2019	73**	nd*	nd*	10	14

* ce nombre sera disponible en 2020 via l'enquête annuelle du réseau CNR-MyRMA (cf § surveillance)
**4 de ces 73 souches n'ont pas fait l'objet de tests phénotypiques de résistance mais seulement de tests génotypiques car trop dysgoniques. Sur les 75 cas MDR recencés au total en 2019 par le CNR, 2 ont été diagnostiqués rseulement par tes tests génotypiques sur prélèvement, la culture étant restée négative.
µ 5 souches MDR reçues venaient de Polynésie et Nlle Calédonie, alors que le réseau du de laboratoire du CNR MyRMA ne couvre pas les TOM .

Evolution 2006-2019 de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches MDR reçues au CNR-MyRMA

Le **tableau 1 du rapport envoyé aux autorités sanitaires dès que les données annuelles sont disponibles (cf annexe)** montre la **distribution des pays de naissance des cas de tuberculose MDR correspondants aux souches reçues de 2006 à 2019.**

On voit dans ce tableau :

- que le nombre de cas MDR chez les patients nés sur le continent américain et au Maghreb (moins de 10 cas /an) est resté globalement stable sur cette période de 14 ans.
- que depuis 2017, le nombre de cas issus des pays d'Europe de l'Est et de l'ex-URSS s'est stabilisé aux alentours de 27 à 30 cas/an, ce qui est en nette diminution par rapport au pic de 2014 (61 cas). Le nombre de cas MDR chez les patients natifs de la Géorgie reste élevé (de 17 à 19 cas de 2017 à 2019) par rapport à la baisse constatée en 2016 (3 cas). Cependant, cela n'atteint pas le niveau des années 2012-14 (26 à 40 cas/an).

- Une diminution du nombre de cas MDR chez des patients nés sur le continent africain (hors Maghreb) par rapport à l'année précédente. En effet, le pic enregistré en 2018 (32 cas *vs* 21 en 2019) était lié à une augmentation des cas chez des patients nés en Côte d'Ivoire (11 cas *vs* 1 à 5 /an depuis 2006).
- que le nombre de cas MDR chez des patients nés en France (13-14 cas de 2017 à 2019) est en baisse par rapport au pic enregistré en 2015 (n=23), ce qui est un élément rassurant.

La figure ci-dessous montre l'évolution de la distribution du nombre de cas MDR selon la zone géographique de naissance des patients sur les 14 dernières années. **En 2019, cette distribution est assez homogène** et est globalement superposable à celle de la décennie précédente. En effet, les cas MDR de 2019 sont principalement dus aux patients nés dans les pays d'ex-URSS, en Afrique (hors Maghreb) et en France.

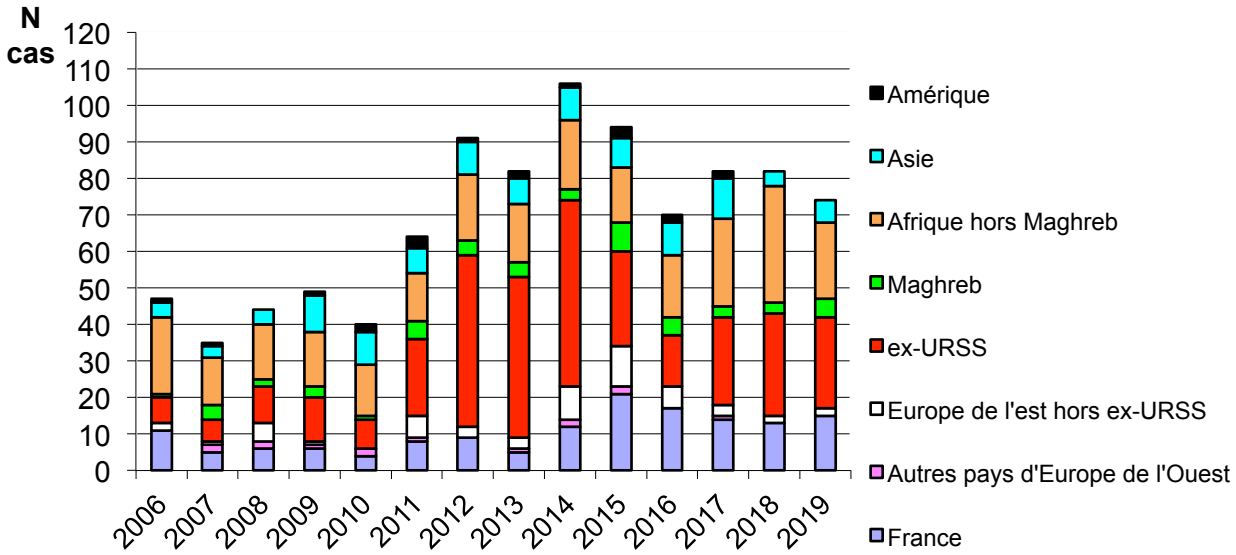


Figure 2. Evolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2019

Le **tableau ci-dessous** montre que les souches MDR reçues au CNR ces six dernières années (hormis 2018 faisant exception) sont majoritairement adressées par les laboratoires franciliens (environ la moitié des souches, 55% en 2019). La dispersion des cas MDR sur le territoire français en 2019 est ainsi superposable à celle des années antérieures. Une des souches MDR de 2019 est issue de Polynésie Française, seule région d'outre-mer (avec un peu la Réunion) à faire face à des cas MDR. Il s'est avéré que cette souche est reliée bactériologiquement aux autres souches en provenance de Polynésie Française reçues ces quatre dernières années au CNR (**cf section Surveillance**)

Tableau 7. Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA depuis 2014

	N souches reçues en					
Régions	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**
Auvergne, Rhône-Alpes	13	11	5	5	9	4
Bourgogne, Franche-Comté	2		1		1	
Bretagne		2	2	3	4	3
Centre-Val-de-Loire	2	1	1	3	4	1
Corse	1	1				
Grand-Est	5	3	4	2	7	4
Guadeloupe						
Guyane						
Hauts-de-France	8	6	4	4	6	4
Île-de-France	58	48	32	41	29	42
La Réunion	2			1		
Martinique						
Mayotte						
Normandie	6	3	3	4	2	2
Nouvelle-Aquitaine	2	11	6	6	7	5
Occitanie	7	5	2	3	5	3
Pays de la Loire		4	2	3	2	3
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3	8	2	4	3
Nouvelle Calédonie						
Polynésie Française		1	1	4	2	1
Total	**112**	**99**	**71**	**82**	**82**	**75°**

° 2 cas diagnostiqués seulement par tests génotypiques sur prélèvement, la culture étant restée négative.

Evolution du nombre de souches XDR reçues au CNR-MyRMA et de la distribution par pays de naissance des patients

Le **Tableau ci-dessous** montre **l'évolution du nombre de cas XDR** depuis le pic de 2014 (n=26) : **6 en 2016, 10 en 2017, 11 en 2018 et 10 en 2019.**
Les **patients natifs des pays de l'ex-URSS** représentaient 1/3 des cas de tuberculose XDR sur la période 2004-2008, 2/3 des cas entre 2009 et 2011, **et la quasi-totalité des cas depuis 2012** (sauf en 2016) **et sont très majoritairement nés en Géorgie**.
A noter **un seul cas XDR né en France en 2017 et en 2018, et aucun en 2019, ce qui est rassurant après l'alerte de 2016 (3 cas).**

Tableau 8. Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2019

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Amérique	Asie	Europe de l'Est et ex-URSS	Total (% parmi les MDR)
2004		1 (Algérie)					**1 (1,9)**
2005			1 (Mali)				**1 (1,7)**
2006	1 (France)					1 (Tchétchénie)	**2 (4,2)**
2007	1 (France)		1 (Congo)				**2 (5,7)**
2008						2 (Russie, Roumanie)	**2 (4,5)**
2009		1 (Algérie)				3 (2 Géorgie, Arménie)	**4 (8,2)**
2010	1 (Portugal)					5 (3 Tchétchénie, 1 Géorgie, 1 Azerbaïdjan)	**6 (15,0)**
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)			2 (Russie)	**6 (9,4)**
2012						17 (15 Géorgie, 1 Arménie, 1 Ukraine)	**17 (18,5)**
2013	1 (France)					21 (19 Géorgie, 1 Ukraine, 1 Roumanie)	**22 (26,5)**
2014	2 (France, Portugal)		1 (RD Congo)			23 (20 Géorgie, 3 Russie)	**26 (23,4)**
2015	1 (France)					9 (5 Géorgie, 2 Tchétchénie, 1 Russie, 1 Arménie)	**10 (10,2)**
2016	3 (France)					3 (1 Tchétchénie, 1 Moldavie, 1 Géorgie)	**6 (8,4)**
2017	1 (France)					9 (1 Lituanie, 1 Russie, 7 Géorgie)	**10 (12.2)**
2018	1 (France)					10 (9 Géorgie, 1 Moldavie)	**11 (13,4)**
2019						10 (7 Géorgie, 1 Ukraine, 1 Moldavie, 1 Bulgarie)	**10 (13,3)**

La figure ci-dessous montre **l'augmentation de la proportion des souches XDR parmi les souches MDR de 2001 à 2014** : 2-3% (2002 – 2005), 4-5% (2006-07), 8% (2009), 13% (2010), puis **environ 20% de 2012 à 2014. La nette baisse de cette proportion depuis 2015 (10-13%) se confirme en 2019.**

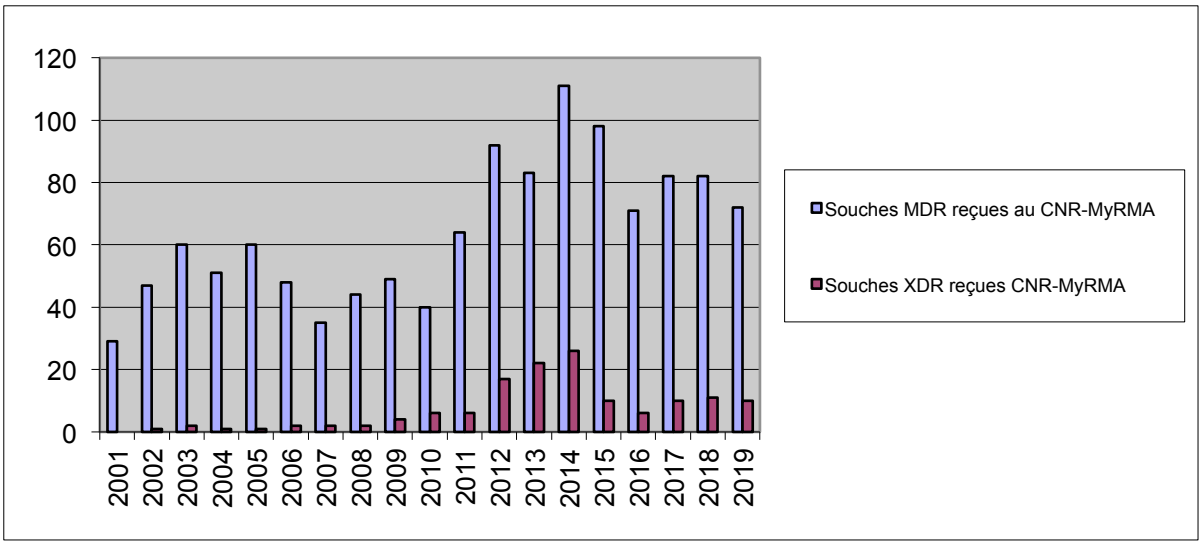


Figure 3. Evolution de la distribution des souches MDR et XDR recues au CNR-MyRMA de 2001 à 2019

Tendances évolutives 2006-2019

Le nombre moyen de **souches MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté à peu près stable jusqu'en 2010 **autour d'une moyenne de 48 par an**, **a augmenté** en 2011 (n=69) pour atteindre une centaine de cas par an entre 2012 et 2015. **Ce nombre est ensuite redescendu à 71 cas en 2016 et 82 cas en 2017 et 2018. En 2019, 72 souches MDR (pour 75 cas au total) ont été reçues au CNR, ce qui représente une diminution de 12% par rapport aux 2 annés précédentes, mais ce nombre demeure cependant au-dessus de la moyenne de la période avant 2010.**

En 2019, 14 souches étaient issues de patients nés en France, nombre stable depuis 2017, après le pic enregistré en 2015 (n=23) et 2016 (n=17).

Le nombre de souches XDR, qui était de **1 ou 2 par an de 2006 à 2008** (idem depuis 2002), a **augmenté à 4 en 2009, 6 en 2010 et 2011, 17 en 2012, 22 en 2013 et enfin 26 en 2014. Ce nombre est redescendu à 6-11 par an depuis 2015.** Ces variations sont principalement en lien avec le nombre de **patients porteurs de souches XDR originaires de l'ex-URSS, en particulier de Géorgie** qui, après avoir **fortement augmenté (de 5 en 2010 à 23 en 2014), a diminué depuis 2015 (1 à 9 cas par an).**

La proportion de souches XDR parmi les souches MDR a beaucoup augmenté de 2002 à 2014 : de 2-3% pour la période 2002-05, à 4-5% en 2006-07, à 8% en 2009, et à **environ 20% de 2012 à 2014. Depuis 2015, cette proportion a diminué pour se stabiliser à 10-14%.**

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **ou** à un des trois aminosides de réserve) **a augmenté de 2006 à 2011** : 8 en moyenne par an de 2006 à 2010 puis environ 20 par an depuis 2011 (n=17 en 2018). Cependant, **en 2019, on assiste à une légère diminution avec 12 cas**.

Depuis plusieurs années, le CNR-MyRMa reçoit la totalité des souches MDR isolées en France.

B.2. Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries non tuberculeuses

Le CNR-MyRMA concentre ses efforts en matière de tests de sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries non tuberculeuses sur les cas d'infections, **en particulier ceux ayant déjà fait l'objet d'un traitement** (échecs thérapeutiques et rechutes). En effet, les infections à mycobactéries atypiques n'étant pas contagieuses, il n'y a pas de résistance primaire (c.a.d. résistance chez un patient n'ayant pas reçu de traitement) mais seulement de la résistance secondaire (c.a.d. acquise lors d'un

traitement). Ceci a été bien démontré par une publication récente du CNR-MyRMA (Renvoisé *et al*. Antimicrob. Agents Chemother. 2015)

Les résultats pour les 253 souches des espèces médicalement importantes et soumises à tests phénotypiques de résistance sont les suivants :

***M. avium* complex** : parmi les 245 souches reçues en **2019, 97 ont fait l'objet d'un antibiogramme** (40%) **(49 *M. avium,* 17 *M. intracellulare,* 31 *M. chimaera*)** dont 12 (11%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI ≥ 64 mg/l en milieu 7H9). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement (n=50), 5 avaient une souche résistante à la clarithromycine, soit **8% de résistance secondaire** (aucun cas de résistance primaire).

M. xenopi : **25 des 36 souches** reçues en 2019 ont fait l'objet d'un antibiogramme (celles pour lesquelles il n'y a pas eu d'antibiogramme ont été adressées tard dans l'année ou la souche n'était pas pure pure ou insuffisante). Aucune souche n'a été trouvée résistante à la clarithromycine ou à la rifampicine, y compris celles des 7 patients qui avaient des antécédents de traitement.

***M. kansasii* : 13 des 14 souches** reçues en 2019 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine. **Aucune des 54 souches de *M. kansasii* reçues entre 2012 et 2019 n'a été trouvée résistante à la rifampicine,** y compris pour les 12 patients ayant des antécédents de traitement.

Espèces à croissance rapide (118 souches testées)
Pour ces espèces, un antibiogramme phénotypique est réalisé par la méthode de microdilution. En complément pour *M. abscessus,* l'étude du gène *erm(41),* plus fiable que les tests phénotypiques, est utilisée pour déterminer le profil de résistance naturelle à la clarithromycine. La présence de ce gène confère une résistance naturelle, dont les sequevars C/T28 déterminent le caractère inductible ou constitutif (cf plus loin détection des résistances génotypiques).

- Parmi les **78 souches de *M. abscessus*** testées phénotypiquement (considérées comme responsables d'infection), la résistance à la **clarithromycine** a été observée de manière différente, selon les sous-espèces, comme attendu :

. *M. abscessus subsp.abscessus* (n=52) :
- 47 souches avaient la résistance naturelle inductible propre à cette sous-espèce, mise en évidence par une augmentation de la CMI entre la lecture à J3-J5 et la lecture à J14
- **1 souche avait une résistance acquise** dès la lecture précoce (confirmée par biologie moléculaire (cf plus loin)
- 4 souches étaient phénotypiquement sensibles

. *M. abscessus subsp massiliense* (n=18) : 17 souches étaient normalement sensibles à la clarithomycine et **1 souche avait une résistance acquise de haut niveau** (CMI > 16 mg/l)
. *M. abscessus subsp bolletii* (n=8) : toutes avaient la résistance naturelle inductible propre à cette sous espèce.

Par ailleurs, **5 de ces 80 souches** (3 M. *abscessus, 2 M. massiliense*) avaient une **résistance acquise** à **l'amikacine**. Elles étaient toutes isolées de prélèvements respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose.

- Parmi les 14 souches du complexe *M. fortuitum* testées *:*
. 12 souches (10 *M. fortuitum fortuitum*) étaient normalement résistantes à la clarithromycine (résistance naturelle) mais sensibles aux fluoroquinolones
. 1 souche de *M. peregrinum,* et 1 souche de *M. senegalense* étaient normalement sensibles à la clarithromycine et aux fluoroquinolones
.
.- Parmi les 26 souches de *M. chelonae* testées, toutes étaient normalement sensibles à la clarithromycine

C. Détection de mutations impliquées dans la résistance acquise aux antibiotiques

En 2019, 532 souches et 33 biopsies (lèpre) ont été soumises à des tests de détection moléculaire de mutations impliquées dans la résistance :

- **220 souches de *M. tuberculosis* pour un total de 1578 recherches génotypiques de résistance.**

- 312 souches de mycobactéries non tuberculeuses

- 33 biopsies positive pour la recherche de *M. leprae* (directement à partir des biopsies puisque cette espèce ne cultive pas)

En 2019, le CNR-MyRMA était en mesure d'analyser 26 gènes impliqués dans la résistance acquise des mycobactéries à 15 antibiotiques (rifampicine, isoniazide, fluoroquinolones, pyrazinamide, streptomycine, amikacine, kanamycine, capréomycine, éthambutol, éthionamide, bédaquiline, linézolide, delamanide, macrolides, sulfamides) :
rpoB, katG, inhA, gyrA, gyrB, pncA, rrs (rrs500, rrs900, rrs1400), gidB, rpsL, eis, tlyA, embB, région entre embC et embA, ethA, ethR, atpE, Rv0678, rrl, rplC, fgd1, fbiC, fbiA, fbiB, ddn, erm(41), folP.

C.1. Mutations impliquées dans la résistance de M. tuberculosis complex

Le nombre de recherches de mutations a doublé depuis 2010 (**Tableau ci-dessous).**

Tableau 9. Nombre de recherches génotypiques de résistance par PCR-séquençage sur les souches de *M. tuberculosis*complex reçues de 2010 à 2019

	2010	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**
Rifampicine	201	232	284	267	281	285	231	280	224	213
Isoniazide	198	227	280	263	284	285	236	278	230	220
Pyrazinamide	137	183	217	211	225	210	179	250	229	168
Fluoroquinolones	128	183	231	215	232	238	185	267	210	177
Ethionamide	50	79	103	93	119	106	70	89	88	138
Aminosides	56	99	159	121	156	156	172	244	206	204
Ethambutol	62	105	159	121	155	222	172	254	213	180
Linezolide								78*	90	171
Bédaquiline								29*	88	177
Délamanide*									104	109
Total	**832**	**1109**	**1433**	**1291**	**1452**	**1502**	**1244**	**1769**	**1578**	**1648**

*Mis en place en 2018, par analyse des génomes complets

Rifampicine (RIF)

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBDR*plus*® et séquençage *a* permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 96 des 213 (45 %)** tests réalisés en 2019.
La distribution des mutations était comme suit :
- **60 mutations S531L (62.5 % des mutations**)
- 3 mutations D516V (3 %)
- 8 mutations sur le codon H526 (8 %)
- 25 mutations moins fréquentes (26 %) réparties entre les codons 508 et 533 **ont été identifiées par PCR-séquençage du gène *rpoB*.**

La part **dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 2/3 depuis 2010**, en accord avec les données internationales. Les mutations moins fréquentes concernent les codons 526, 516, 513, 533, 511, 521 et 531 (S531F) ; il y a aussi quelques raretés (1 délétion des codons 515-516).
En 2019, toutes les souches phénotypiquenement résistantes à la rifampicine avaient une mutation du gène *rpoB*, ce qui confirme que la recherche de mutations dans ce gène est une excellente approche rapide de détection de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).

Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBDR*plus* et le séquençage ont permis d'identifier des **mutations dans *katG* ou *inhA* pour 115 des 220 (52 %) souches testées en 2019.**

- 113 fois **(98 %) une mutation S315T de *kat*G,** corrélée à une résistance phénotypique de haut niveau à INH, dont 93 mutations isolées et 20 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA*

- 1 fois **(0.9 %) une mutation dans *katG* à une position autre que 315** (Q127P)

- 22 fois **(19 %)** une mutation dans la **région régulatrice du gène *inh,* soit associée à une mutation *katG* (**20, soit **17 %), soit seule** (2, soit **2 %**) alors responsable d'une résistance phénotypique **à bas niveau à INH**. **La mutation de type « -15 c>t » était la plus fréquente (n=15, 13 %).**

On note la part dominante de la mutation isolée S315T dans le gène *katG*, qui représente plus de 95 % des cas (en accord avec les données internationales). Les mutations isolées de type « -15 c>t » dans la région régulatrice du gène *inhA* ne représentent que 2 % des cas.

Les souches phénotypiquement résistantes à l'isoniazide pour lesquelles il n'a pas été détecté de mutation ni dans *katG-315* ni dans les régions régulatrice de *inhA* ni dans la région codant inhA représentent 1 % de l'ensemble des souches testées selon les années.

Pyrazinamide (PZA)

Le **séquençage du gène *pncA*** qui code pour la pyrazinamidase, enzyme qui transforme le PZA, prodrogue inactive, en acide pyrazinoïque, antibiotique actif, a été effectué **pour 168 souches en 2019** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Au total, **45 souches (27 %) avaient une mutation du gène *pncA*** (39 mutations faux-sens, 2 mutations codon STOP, 1 mutation du promoteur, 2 délétions et 1 insertion). Il faut noter la très grande diversité des mutations identifiées dans PncA, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet des mutations sur la résistance. Cette très grande diversité des mutations rend aussi très difficile de dresser un tableau évolutif sur de nombreuses années car un tel tableau serait trop long.

Ethionamide (ETH)

L**e séquençage des gènes *ethA* et *ethR***, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, mis en place en 2012, a été effectué **pour 138 souches en 2019**.

Des mutations ont été détectées dans ***etha-ethR*** chez 52 souches (**38%**). Ces mutations concernaient, comme classiquement décrit, essentiellement le gène *ethA* (34 mutations faux-sens, 15 délétions et 1 insertions) et très rarement la zone intergénique *ethA-ethR* (2 mutations dans le promoteur du gène *ethA*) et le gène *ethR* (aucune mutation). Les mutations faux-sens dans *ethA* étaient très dispersées, ce qui rend très difficile de dresser un tableau évolutif sur de nombreuses années car un tel tableau serait trop long.

Une mutation dans le **promoteur du gène inhA** (positions -8 et -15), également responsable de la résistance à l'éthionamide, ont été trouvées dans 37 souches (**27%**), soit en association avec des mutations ethA (10 souches), soit isolées (27 souches).

On note la très grande diversité des mutations identifiées dans *ethA*, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile l'interprétation de l'effet de chacune de ces mutations. Des travaux spécifiques seront encore nécessaires pour avancer sur ce point.

Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*sl* et le séquençage ont permis d'identifier des **mutations dans le gène *gyrA* dans 22 des 177 souches étudiées** (**12%**)**.** Le codon **le plus souvent modifié** était le **codon 94 (14/22), ce qui est habituel, suivi du codons 90 (7/22).**

La recherche de mutations dans le gène *gyrB* a permis l'identification des mutations, A504V, G559A, D461N, pouvant être associées à un phénotype résistant.

Aminosides

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*sl*® a été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *rrs* aux positions 1401, 1402 et 1484, impliquées dans la résistance aux aminosides de

seconde ligne (kanamycine et amikacine) et à la capréomycine, Fin 2018, nous avons mis en place l'approche **DEEPLEX** pour l'analyse des mutations associées à la résistance aux antituberculeux (cf. nouvelles techniques) chez *M.tuberculosis*, dont le gène *eis* également impliqués dans la résistance à la kanamycine et les gènes *rrs* (régions 500-900), *rpsL* et *gidB* impliqués dans la résistance à la streptomycine.

Au total, **204 souches ont été étudiées en 2019**. Les résultats montrent la présence d'une mutation **a1401g dans le gène *rrs* pour 8 d'entre elles (4%). Dix-sept souches (8%) avaient des mutations dans le promoteur du gène *eis*** : c-37t (n=6), c-14t (n=4), c-12t (n=2), g-10a (n=3), c-15g (n=1) et c-40a (n=1). Ont également été mises en évidence des mutations dans *rpsL* (n=49) et *gidB* (n=45).

Ethambutol

Nous effectuons depuis 2017 le séquençage systématique du gène *embB* et de la région intergénique *embC-embA* (promoteur de *embB*), ce qui permet la détection d'un plus grand nombre de mutations impliquées dans la résistance à l'éthambutol.

Au total, **180 souches ont été étudiées** en 2019 et la présence d'une **mutation du gène *embB* a été détectée pour 66 d'entre elles (37%)**. Parmi ces 66 souches, 34 (**52%**) avaient une mutation du **codon EmbB-306** : M306V (n=21), M306I/L (n=13). Les autres codons mutés dans EmbB étaient les codons 497 (n=10), 406 (n=7), 297 (n=3) et 334 (n=3), les autres étant plus rares.
En 2019, **5 souches avaient une mutation dans le promoteur *embB*** : --12c→t (n=1), -16 c→g (n=1), -16c→t (n=1), -430G>C (n=1) et -4c>T (n=1).

Bédaquiline

Le séquençage des gènes *Rv0678* et *atpE*, codant respectivement pour le régulateur transcriptionnel de la pompe d'efflux Mmpl5 et la sous-unité c de l'ATP synthase, effectué depuis 2018 pour recherche de la résistance à la bédaquiline, a été effectué **pour 177 souches en 2019**.
Des **mutations (Tableau ci-dessous) ont été détectées chez 11 souches dans Rv0678 (6 %).**

Tableau 10. Distribution des mutations des gènes Rv0678 et atpE dans les souches de M. tuberculosis complex étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2019 pour détection moléculaire de la résistance à la bedaquiline (technique : séquençage Rv0678 et atpE)

Gène		**2017**	**2018**	**2019**
Rv0678				
Mutations	L117Q	**1**		
	W42G,	**1**	**1**	
	L142R		**1**	
	R89P			**1**
	R90L			**1**
	F100C			**2**
	I67T			**1**
	S151P			**2**
	E55D			**2**
	Insertion		**1**	**1**
	délétion		**1**	**1**
Pas de mutation		27	84	166
PCR négatives		1	0	0
Total		**29**	**88**	**177**
atpE				
Mutations		**0**	**0**	**0**
Pas de mutation		28	88	83
PCR négatives		1	0	0
Total		**29**	**88**	**83**

On note la diversité des mutations identifiées dans *Rv0678*, tant en nature qu'en position sur la protéine, diversité qui rend difficile la prédiction de l'effet de chacune de ces mutations au niveau phénotypique.

Linezolide

Le séquençage des gènes *rrl* et *rplC*, codant pour l'ARN 23S et la protéine ribosomale L3, effectué depuis 2017 pour recherche de la résistance au linezolide, a été effectué **pour 171 souches en 2019**. Des **mutations** (**Tableau ci-dessous**) ont été détectées chez 4 souches (**2%**).

Tableau 11. Distribution des mutations des gènes *rrl* et *rplC* dans les souches de *M. tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2019 pour détection moléculaire de la résistance au linezolide (technique : deeplex et wgs *rrl* et *rplC*)

Gène		**2017**	**2018**	**2019**
rrl				
Mutations	g2573t	**0**	**1**	**0**
	G2307A	**0**	**0**	**1**
	A1401G	**0**	**0**	**1**
	C1093T	**0**	**0**	**1**
	C344T	**0**	**0**	**1**
Pas de mutation		77	89	162
PCR négatives		1	0	5
Total		**78**	**90**	**171**
rplC				
Mutations	C154R	**3**	**2**	**0**
Pas de mutation		74	88	167
PCR négatives		1	0	4
Total général		**78**	**90**	**171**

Délamanide

Nous avons mis en place en 2018 l'étude de la **résistance au délamanide** liée à des mutations dans 5 gènes : *ddn*, *fgd1, fbiA, fbiB* et *fbiC*. Compte-tenu du nombre important de gènes, l'approche classique par PCR-séquençage n'a pas été appliquée. Les mutations sont recherchées à partir d'une extraction des **données de séquençage complet des génomes (WGS**) (cf. section WGS du rapport) qui fournit la totalité des SNPs présents dans les gènes analysés par comparaison avec le génome de la souche sauvage de référence H37Rv AL123456. L'analyse des résultats est par conséquent complexe et nécessite un travail approfondi pour distinguer les polymorphismes phylogénétiques (à priori sans conséquence sur la résistance) des mutations impliquées dans la résistance.

Cent neuf (109) génomes déterminés en 2019 ont été analysés au niveau des gènes : *ddn*, *fgd1, fbiA, fbiB* et *fbiC.* Au total, nous avons détecté pour **Fgd1** une mutation K270M pour 9 souches (polymorphisme phylogénétique spécifique de la lignée Haarlem) et une mutation A187V dans 1 souche, T68S et T302M dans **FbiA** pour 2 souches, K448R dans **FbiB** pour 1 souche, et aucune mutation dans **FbiC** et dans **Ddn**. Des travaux spécifiques seront nécessaires pour avancer sur l'analyse de la résistance au délamanide.

C.2. Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries non tuberculeuses

312 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2019 ont été soumises à des tests de détection moléculaire rapide de la résistance. Les méthodes appliquées sont la PCR-séquençage ou l'amplification/hybridation sur bandelette Genotype AS®, CM® et/ou NTM-DR®.

196 souches d'espèces à croissance lente du complexe MAC

. résistance acquise à la clarithromycine liée à des mutations des nucléotides 2057 à 2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S : 12 des 196 souches (**6%**) **portaient une mutation impliquée dans la résistance** (*M. avium* (n=8), *M. intracellulare* (n=3) et *M. chimaera*, n=1)).

. résistance acquise aux aminosides liée à la mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S a été détectée chez 1 souche de *M. chimaera*.

116 souches d'espèces à croissance rapide

90 souches de M. abscessus

Résistance à la clarithromycine
. résistance naturelle inductible à la clarithromycine : présence du gène *erm(41)* séquevar *T28* qui confère une résistance inductible difficile à mettre en évidence phénotypiquement (cf. § résistance phénotypique des NTM) chez 57/62 des souches de *M. abscessus subsp. abscessus*, et 10/10 des souches de *M. abscessus subsp. bolletii*
. **génotype sauvage (pas de mutation acquise de résistance à la clarithromycine)** chez 17/18 souches de *M. abscessus subsp. massiliense* (espèce naturellement sensible car dépourvue d'un gène *erm(41)* fonctionnel et naturellement sensible) et chez 5 des 5 souches de *M. abscessus subsp. abscessus* séquevar *C28* (séquevar qui ne confère pas de résistance naturelle)
. mutation de résistance acquise à la clarithromycine dans le gène *rrl* codant l'ARN 23S :

- ✓ a2058g chez 1 souche de souche de *M. abscessus subsp. massiliense*,
- ✓ a2058g chez 1 souche de *M. abscessus subsp. abscessus* T28 (en plus de la résistance naturelle comptée ci-dessus)

Résistance acquise aux aminosides par mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S chez 4 des souches déjà listées ci-dessus : 2 *M. abscessus subsp. abscessus* T28 et 2 *M. abscessus subsp.*massiliense.

26 souches de M. chelonae : pas de mutation de résistance à la clarithromycine ou aminosides.

C.3. Détection de la résistance aux antibiotiques dans les cas de lèpre diagnostiqués en France

En **2019**, nous avons reçu **106 biopsies** pour **102 patients** français ou résidants en France, ce qui confirme l'augmentation du recrutement observée depuis 2010 suite aux relations établies avec des collègues des DOM-TOM et des centres hospitaliers de métropole.

L'examen microscopique ou la PCR RLEP étaient positifs pour 33 des 102 patients, soit 32,3 % : **24 nouveaux cas et** 9 suivis sous traitement ou suspicions de rechutes après arrêt du traitement et pour lesquels les résultats microbiologiques n'ont pas montré de reprise de multiplication bacillaire (examen microscopique ou PCR faiblement positifs, ADN dégradé).

Les **24 nouveaux cas avérés** vivaient dans les **DOM-TOM (n = 14** : 9 à Mayotte dont 3 originaires des Comores, 1 en Nouvelle Calédonie, 1 à la Réunion, 1 en Guadeloupe, 1 en Martinique, 1 en Guyane), ou étaient des **immigrants résidant en France métropolitaine (n = 10** dont 2 venant de Mayotte, 2 du Brésil, 1 du Soudan, 1 de Guinée 1 du Portugal, 1 de Madagascar, 1 du Mali et 1 du Tchad).

Pour 18 des 24 nouveaux cas les gènes de résistance ont pu être étudiés : 12 patients vivants aux DOM-TOM ou venant des DOM-TOM (10 de Mayotte, 1 de Nouvelle Calédonie, 1 de Guadeloupe) et 6 immigrants, Parmi les 18 souches, **17 étaient multisensibles et une résistante 1aire à la dapsone (mutation folP P55L).** Il s'agissait d'une femme de 73 ans vivant en Guadeloupe, où la résistance primaire à la dapsone a été bien décrite.
Pour les 6 autres cas pour lesquels la PCR des gènes de résistance était négative, la PCR RLEP était positive mais l'examen microscopique négatif (4 cas), ou faiblement positif (< 5 baar/lame, 1 cas) ou seule une lame était disponible (1 cas).

Analyse rétrospective des résultats 2001- 2019 pour les cas de lèpre diagnostiqués en France

Un total de 794 biopsies ont été reçues de 2001 à 2019 pour 621 patients suspects de lèpre, dont 315 biopsies positives par examen microscopique ou amplification génique (40,7 %), ce qui a permis le diagnostic de lèpre pour 261 patients (42%) dont **85 vivant en France métropolitaine et 176 dans les DOM-TOM**. Les patients étaient originaires des DOM-TOM (n=155, 59,4%), d'Afrique (n=79, 30,3 %), d'Asie (n=13, 5%), d'Amérique (n=7, 2,7%), d'Europe (1 cas du Portugal chez une femme de 72 ans) ou de France métropolitaine mais ayant voyagé dans des régions d'endémie (n=6, 2,3%).
Parmi les 261 cas, 222 étaient des nouveaux cas (85%) et **39 des rechutes** ou aggravation sous traitement (15%).

Un **antibiogramme moléculaire a été obtenu pour 240 (206 nouveaux cas et 34 rechutes) des 261 cas (92%) : 222 cas multisensibles et 18 cas résistants (6,9%) dont 10 primaires (8 à DDS et 2 aux fluoroquinolones) et 8 secondaires (5 à DDS et 3 à rifampicine).** Aucun cas de multirésistance n'a été détecté.
Le taux de résistance primaire est de 4,8 % parmi les 206 nouveaux cas, et de 23,5 % parmi les 34 rechutes. La différence observée est très significative (*P*< 0,001).

La distribution des cas de résistances par lieu de naissance ou de contage présumé (personne née en France mais ayant séjourné longuement en pays endémique, DOM-TOM ou étranger) est présentée dans le **Tableau 2.**
Les cas résistants observés chez les patients résidant dans les DOM-TOM sont autant primaires (n=8) que secondaires (n=8). Au contraire, **les 2 seuls cas résistants observés chez les patients nés ou résidant à l'étranger sont primaires,** en cohérence avec ce qui est observé dans la cohorte de patients de l'OMS (cf supra).

Tableau 12. Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2019)

Lieu de naissance ou contage	Cas avec antibiogramme moléculaire			Dont cas résistants		
	total	**nouveaux**	**rechutes**	**primaire**	**secondaire**	**Mutations**
DOM-TOM	154*	126*	28	8 (7 Dds,**1 Fq****)	8 (5 Dds, **3 Rif******)	P55L (6), T53I (4) T53A, S456L (2) S456F A91V
Etranger	86*	80*	6	2 (1 Dds, **1 Fq***)	0	P55L, A91V
TOTAL	**240***	**206**	**34**	**10 (4,8%)**	**8 (23.5%)**	

Dds, dapsone; Rif, rifampicine; Fq, fluoroquinolone
* dont 6 patients nés en France métropolitaine mais ayant séjourné longuement en pays endémique, soit en DOM-TOM (n=1), soit à l'étranger (n=5 : 3 en Afrique, 2 en Asie)
** Nouvelle Calédonie ; *** immigrant du Brésil résidant en France ; **** 2 Martinique, 1 Tahiti

La majorité des mutations de résistance 1aire concernent la dapsone (gène *folP*, 7 sur 9), ce qui n'est pas étonnant en raison de l'emploi très ancien, autrefois en monothérapie, de cet antilépreux qui a entrainé des rechutes à bacilles résistants et des cas de transmission à partir de ces rechutes. **Cependant il faut noter 2 cas de résistance 1aire aux fluoroquinolones** (gène *gyrA*, 1 de Nouvelle Calédonie ; 1 de migrant du Brésil résidant en France), très probablement liés à l'emploi large de ces antibiotiques dans de nombreux types d'infections (urinaires, respiratoires…).
La majorité des mutations de résistance 2aire concernent aussi la dapsone mais il faut noter 3 cas de résistance 2aire à la rifampicine (gène *rpoB*) **dans les DOM-TOM** (Martinique, Tahiti) **ce qui suggère des défauts d'organisation des traitements dans ces régions.**

Les différences observées entre les taux de résistance dans le réseau OMS et parmi les cas diagnostiqués en France sont frappantes, non tant pour les nouveaux cas (3,8% vs 4,8% de résistance 1aire respectivement) mais pour les rechutes (0% vs 23,5% de résistance 2aire respectivement, P<0,001). Dans les régions qui suivent la stratégie OMS, le traitement de la lèpre est standardisé depuis une trentaine d'années et les antilépreux sont fournis gratuitement sous une forme qui favorise la supervision et la compliance. Les taux de résistance 1aire y sont bas et il n'y a pas de résistance 2aire. Par contraste, dans les DOM-TOM où les patients sont pris en charge par des structures variées et non coordonnés, les taux de résistance 2aire, sont très élevés, suggérant des défauts importants d'organisation dans la prise en charge des patients.
En comparant nos chiffres à ceux du réseau OMS, la résistance est moins fréquente dans les pays du continent Africain, qu'en Asie ou en Amérique du Sud (Cambau et al. 2018).

2.5. Activités de séquençage génomique « Whole Genome Sequencing » (WGS)

Introduction

Le WGS a été mis en place progressivement depuis 2016 dans les 2 laboratoires du CNR-MyrMA, en complément d'autres techniques génomiques (amplification-séquençage des gènes de résistance, MIRU 24 pour la phylogénie de *M. tuberculosis,* Rep-PCR *pour* pour la phylogénie de MNT…) à des fins d'investigations de suspicions d'épidémies et de surveillance, pour les cas de tuberculose MDR et d'infections à mycobactéries non tuberculeuses. **En particulier nous étudions depuis 2017 toutes les souches MDR de *M. tuberculosis* par WGS.**

Le CNR-MyRMA a accès à 4 plateformes de séquençage : celles des 2 hôpitaux du CNR (PSL et Lariboisière), celle de GenoScreen (Lille) et celle de l'Institut Pasteur de Paris.
Les technologie/matériels utilisés sont : HiSeq, MiSeq, NextSeq selon les plateformes.

Le CNR MyRMA a accès à une expertise bio-informatique soutenue par la plateforme bio-informatique SeqOIA de l'APHP. Les analyses bio-informatiques sont menées:
- pour l'assemblage des séquences génomiques : FASTQC, CUTADAPT, PRINSEQ, SPADES, BOWTIE2, SAMTOOLS, BIONUMERICS-7® (Applied Maths)
- pour la phylogénie : BIONUMERICS-7® (Applied Maths)
- comme outils d'analyse : GALAXY (plateforme de bioinformatique SeqOIA de l'APHP, plan « France Médecine Génomique 2025 »), avec un pipeline d'analyse permettant l'assemblage des données brutes WGS et l'extraction automatique des SNPs pour 25 gènes impliqués dans la résistance aux anti-tuberculeux : (rpoB, katG, inhA, gyrA, gyrB, pncA, rrs, gidB, rpsL, eis, tlyA, embB, ethA, ethR, atpE, Rv0678, rrl, rplC, fgd1, fbiC, fbiA, fbiB, ddn, erm(41), folP).

Ce pipeline WGS BK est utilisé lors du **contrôle de qualité européen « Next Generation Sequencing » (séquence de 15 génomes complets) et pour lequel notre score de réussite a été de 100% en 2018 et 86% en 2019.**

2.5.1. Activités 2019 WGS et M. tuberculosis (laboratoire Pitié-Salpêtrière)

En 2019, 141 souches de *M. tuberculosis* reçues en 2019 ont été soumises à l'approche **WGS** dans le cadre de la routine pour détection des SNPs, identification des mutations associées à la résistance, et comparaison par analyse phylogénétique **: 75 MDR (dont 10 XDR)** et **66 souches non MDR** séquencées comme comparateurs. L'analyse **WGS des souches MDR 2019 a été finalisée pour 64/75 souches, dont 9/10 XDR** (pas de culture pour 2 souches, 9 génomes inexploitables pour quantité insuffisante d'ADN malgré plusieurs extractions).

387 génomes disponibles dans les databases ont été importés et analysés.

Nous avons ainsi pu en 2019 séquencer par le pipeline du CNR-MyRMA le génome complet de 130 souches cliniques de *M. tuberculosis* :
- 55 génomes de souches MDR (cf supra)
- 9 génomes de souches XDR
- 66 génomes de souches non MDR isolées en 2019 et appartenant à différents clades (témoins non MDR)

- Mutations dans les gènes de résistance des souches MDR

La comparaison entre les SNP identifiés par **WGS** et les mutations trouvées lors de nos travaux d'expertise de routine par la nouvelle approche **combinant MDR/MTB ELITe MGB® sur automate ELITe Ingenius** pour l'identification rapide du complexe *M.tuberculosis* **et « GeneLead-Deeplex »** pour les mutations de résistance aux anti-tuberculeux, a montré pour les souches MDR une parfaite corrélation entre les 2 systèmes.

- Analyse phylogénique des 506 génomes de M.tuberculosis 2006-2019 (MDR/XDR)

A ce jour, la **database génomiques du CNR compte au total 893 génomes** dont

- **506 génomes séquencés par le CNR-MyRMA**
- **387 génomes importés à partir de databases extérieures au CNR-MyRMA pour servir de comparatifs**

Tous les génomes ont été réunis dans la système BioNumerics 7.6 pour être assemblés sur le génome de référence H37Rv NC_000962, et analysés par le nouveau module MTBC de BioNumerics 7.6 qui détermine l'espèce, le nom et le numéro de lignée, le spoligotype et le profile de résistance aux antituberculeux.

La **figure** ci-dessous montre le dendrogramme UPGMA de **301 génomes séquencés de souches cliniques MDR-XDR** reçues au CNR, dont **243 souches MDR** (cercles de couleur bleu foncé), **31 pré-XDR** (cercles blancs) et **27 XDR** (cercles rouges).

On peut voir :

- que les clades **Beijing, Haarlem et Ghana présentent une proportion de clusters plus élevée par rapport aux autres clades** (visible par le nombre important de branches inter-connectées au sein d'un clade)

- que **la très grande majorité des souches XDR (cercles rouges) sont distribuées au sein de la lignée Beijing (23/27 souches XDR, soit 85%).** Les 4 autres souches XDR se rattachent aux clades LAM (n=1), Ural (n=2) et TUR (n=1).

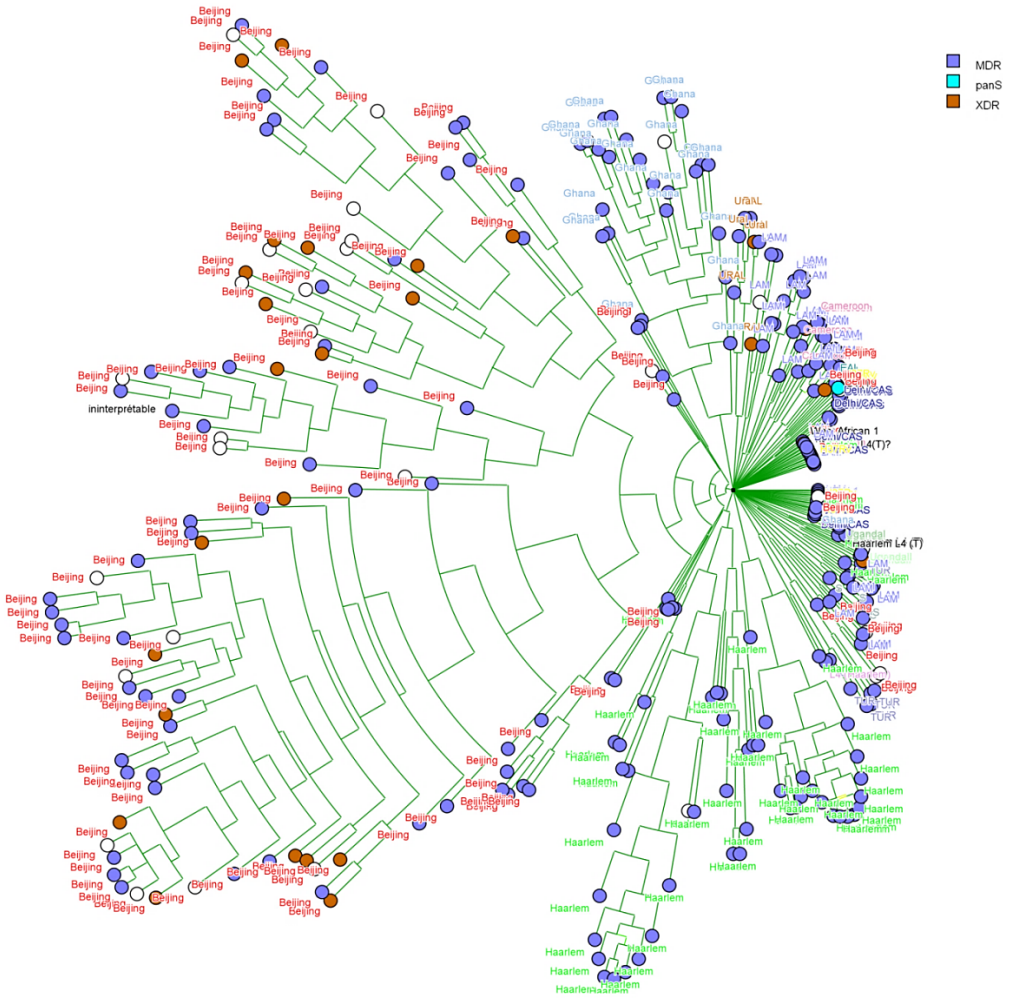
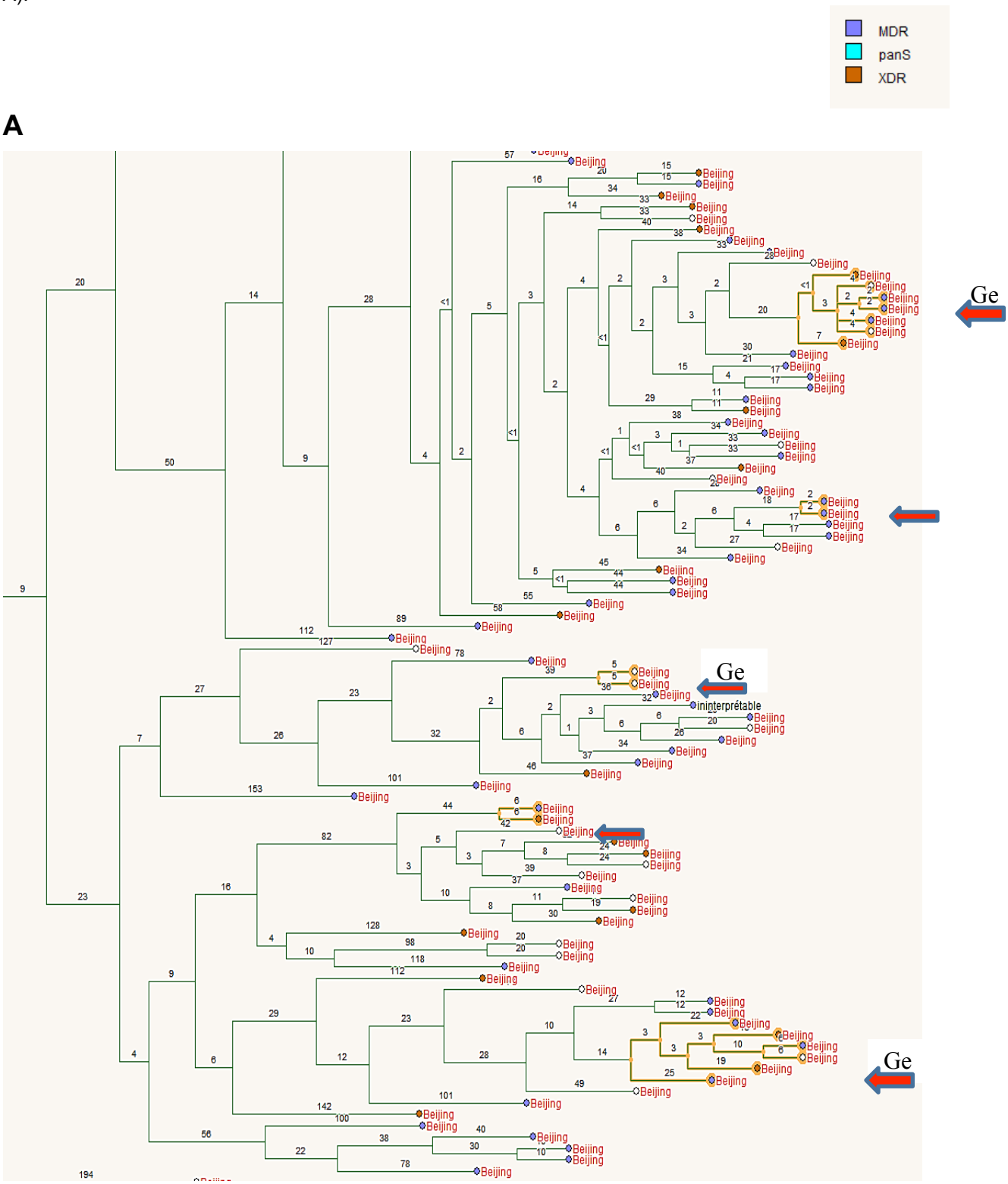


Figure 4. Dendrogramme circulaire (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique des 301 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* de la période 2006-2019). La longueur des branches est proportionnelle à la distance en SNPs entre les génomes. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite. Les clades sont indiqués par des caractères de couleur (Beijing en rouge, Haarlem en vert clair, Ghana en bleu clair).

Les **Figures A, B et C** ci-dessous montrent la topologie des 3 principaux groupes de clusters dans les clades Beijing, Haarlem et Ghana. Pour les souches **Beijing** (**figure A)**, on observe **5 clusters de 2 à 7**

souches qui présentent des génomes très proches (**≤ 6 SNP d'écart**). En considérant que la vitesse d'évolution chez *M. tuberculosis* est de 1 SNP/génome/an, ces distances très faibles traduisent une divergence génétique récente et posent la question d'une transmission directe entre les patients de ces clusters. On note également que 4 de ces 5 clusters comportent des souches XDR ou pré-XDR. Pour 3 de ces 5 clusters, les souches ont été isolées de patients nés en Géorgie (indiqué par « Ge » sur la figure A).

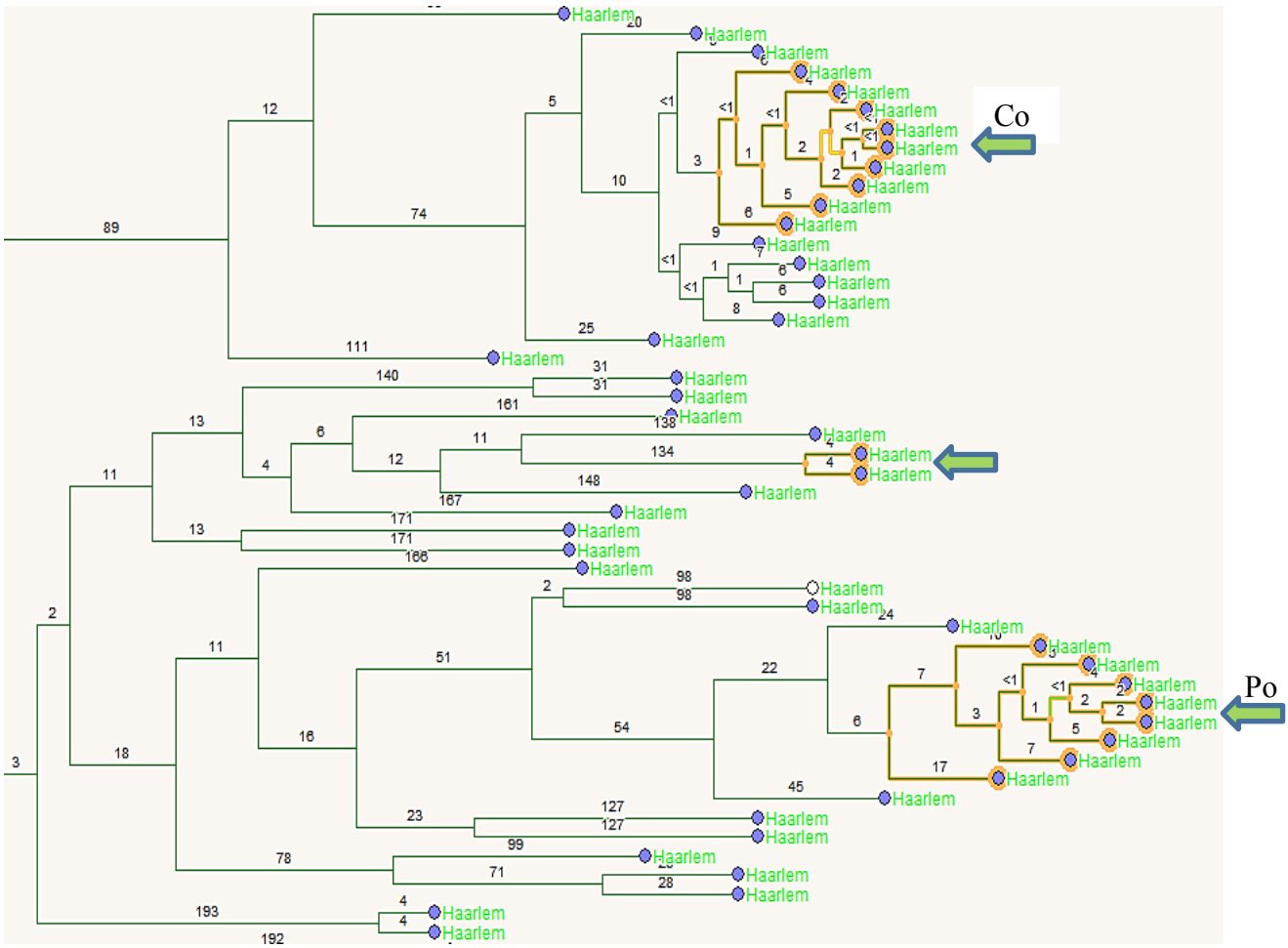
A



Pour les souches **Haarlem** (**figure B)**, on détecte **3 clusters de 2 à 9 souches** avec ≤ 6 SNP d'écart. Le cluster Co est un cluster de patients originaires de la région du Congo, et Po de la Polynésie française.

Pour le clade **Ghana (figure C)**, un seul cluster de 2 souches présente ≤ 6 SNP d'écart.

B



C

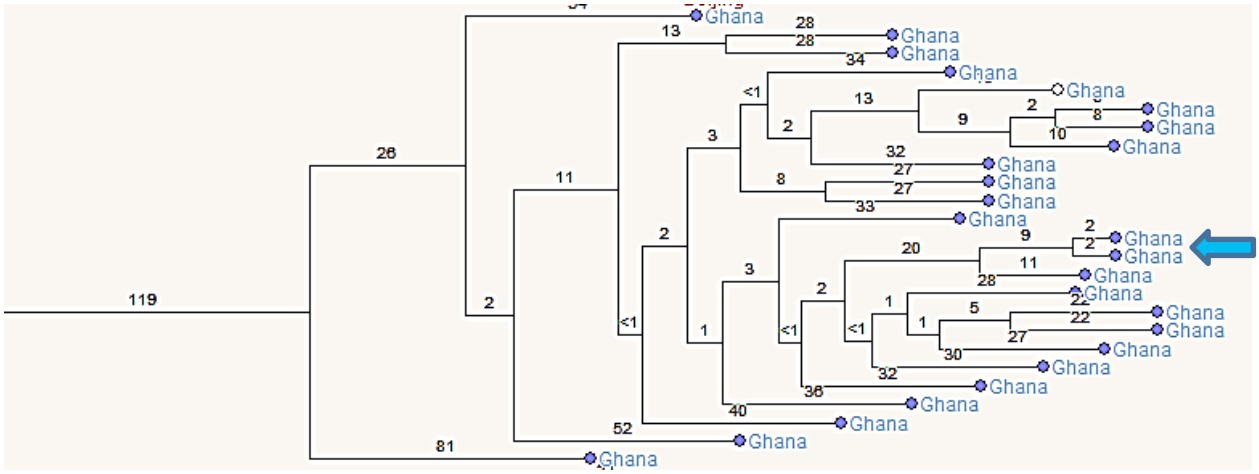


Figure 5. A, B, et C. Dendrogrammes (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique de 301 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* (2006-2019). Les clades sont indiqués par des caractères de couleur : figure A : clade Beijing en rouge, Figure B : clade Haarlem en vert clair, et figure C : clade Ghana en bleu clair. La longueur des branches en SNPs est indiquée au dessus des branches. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite. Les clusters de souches reliées par ≤6 SNPs sont indiqués par des flèches.

L'analyse phylogénique détaillée des souches MDR/XDR menée dans le cadre des **études de transmissions survenues en France en 2019** sont détaillés dans **la section « Surveillance » § 3.8.4**

- Echanges de données WGS avec l'ECDC dans le cadre du programme EUSeqMyTB

En 2018-2019, nous avons participé à une étude pilote sur l'utilisation du séquençage du génome entier pour le typage et la caractérisation des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans l'Union Européenne et l'Espace Economique Européen (EUSeqMyTB). La participation de **24 pays** à ce programme a permis de colliger une database de **2218 génomes dont 638 de souches appartenant à la lignée Beijing**.

Le CNR MyRMA a envoyé les génomes complets et les données cliniques et épidémiologiques afférentes de **99 cas de TB MDR** (8 pour 2017, 66 pour 2018 et 25 pour 2019 à la cloture du projet).

Les résultats (article soumis pour publication) montrent que **≥ 80% des cas de tuberculose Rif-R/MDR sont d'origine étrangère en France et dans plusieurs autres pays de l'UE/EEE** (pays en vert dans la Figure ci-dessous).

La comparaison des génomes Beijing séquencés au CNR-MyRMA avec ceux contenus dans la database de l'ECDC a permis de mettre en evidence que 2 souches isolées en France (en 2017-18), **soit 2% de nos souches**, **avaient moins de 12 SNPs d'écart avec une souche isolée dans un autre pays européen.**

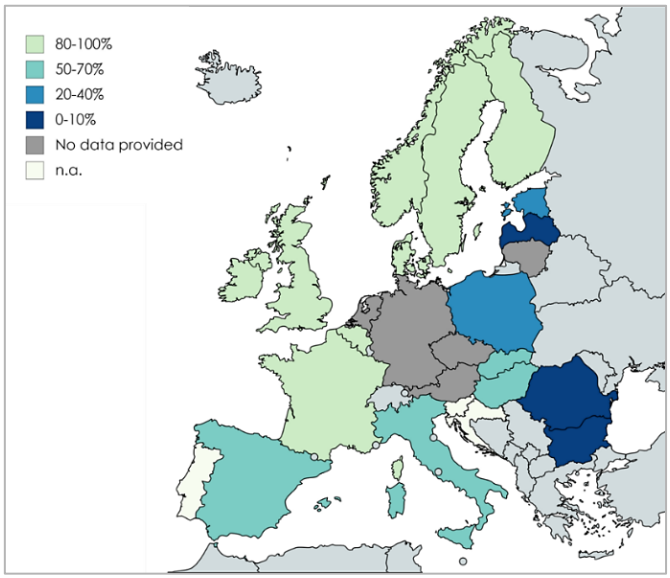


Figure 6. Pourcentage de cas groupés de tuberculose RifR / MDR d'origine étrangère par pays de l'UE / EEE.

Références :

Use of a Whole Genome Sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017- 2019: an ECDC pilot study.

Elisa Tagliani[1], Csaba Ködmön[2], Marieke J. van der Werf[2], Vlad Nikolayevskyy[3,4], Thomas A. Kohl[5,6], Stefan Niemann[5,6], Richard Anthony[7], Dick van Soolingen[7], Daniela Maria Cirillo[1], the ECDC molecular surveillance project.*

2.5.2. Activités 2018 WGS et mycobactéries non tuberculeuses (laboratoire Lariboisière)

Nous avions en 2016 commencé à développer le séquençage du génome sur un équipement GS Junior Roche mis à notre disposition. Suite à l'arrêt de la commercialisation de cet équipement, **nous nous sommes tourné en 2018 vers la méthode Illumina sur MiSeq (plateforme Lariboisière) et avons acquis le logiciel Bionumerics®.** Nous avons aussi en 2018 commencé à utiliser la plateforme Galaxy-SeqOIA de l'APHP pour des analyses informatiques complémentaires.

Nous avions séquencé 98 génomes de MNT en 2018 et nous avons poursuivi en 2019 notre activité de séquençage des MNT avec 83 génomes: 17 *M. abscessus,* 13 *M. chelonae,* 24 *M. chimaera,* 1 *M. fortuitum,* 3 *M. intracellulare,* 10 *M. marinum*, 9 *M. mucogenicum*, 4 *M. neoaurum*, 2 *M. xenopi.*

Ces génomes ont été étudiés soit dans le cadre d'investigation de cas d'infections iatrogènes à MNT (cas groupés ou cas lié à l'identification d'une source pour *M. chimaera, M. marinum,* et *M. chelonae*), soit pour l'étude de la résistance acquise aux antibiotiques (*M. abscessus, M. chimaera, M. leprae*), soit pour l'identification d'espèces très proches (*M. fortuitum* complex, *M. abscessus, M. chimaera et M ; intracellulare*). L'objectif est aussi de constituer une base de données génomiques pour le CNR-MyRMA en cas de futurs événements épidémiques.

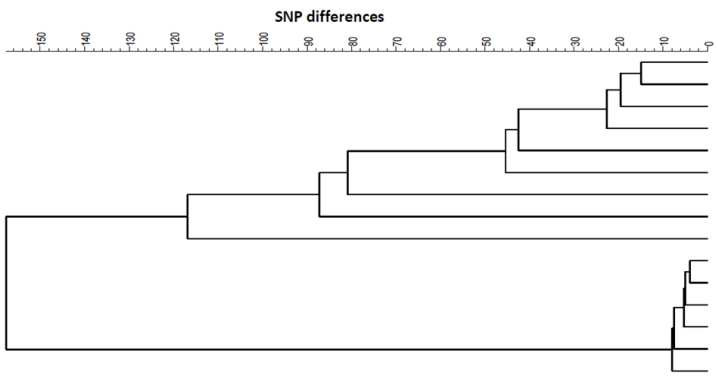
La 1ère application a concerné les souches de *M. chimaera* dans le cadre de l'épidémie européenne d'infections post-CEC décrite plus haut

Les études génomiques nous ont aussi permis de compléter les enquêtes sur plusieurs alertes survenues en 2019 (cf supra) et les années précédentes. Ces enquêtes sont en train d'être revue en détail retrospectivement de 2010 à 2019 avec l'équipe des infections liées aux soins de Santé publique France (Anne Carbonne, Come Daniau), cf la section Alertes. Les résultats complets seront présentés en 2020.

2.5.3. Activités 2019 WGS et lèpre (laboratoire Lariboisière)

En 2019 nous avons poursuivi notre étude génomique de cas de lèpre issus des territoires d'outre mer, en particulier le département de Mayotte et le territoire de Nouvelle Calédonie, pour lesquels nous suivons depuis plusieurs années les nouveaux cas et les rechutes ainsi que la résistance aux anti-lépreux.

Pour cela nous avons étudié 14 souches (6 souches isolées de cas de Mayotte et 8 de Nouvelle Calédonie) et les avons comparées. La couverture moyenne était très satisfaisante (moyenne de 112X, range de 23 à 159 X ci –dessous). Compte tenu de la stabilité du génome de M. leprae, le nombre de SNPs généré n'était que de 393 mais suffisant pour construire un arbre phylogénétique par la méthode UPMGA présenté ci-dessous. L'analyse du génome nous permet aussi de déterminer le génotype caractérisé par certaines mutations.



Sample	Location	Bacilloscopy (AFB/field)	Coverage (X)	Genotype
Sample 72	MY	10-100	59	1D
Sample 73	MY	10-100	145	1D
Sample 67	MY	10-100	106	1D
Sample 12	MY	1-10	23	1D
Sample 70	MY	10-100	121	1D
Sample 69	MY	10-100	115	1D
Sample 74	NC	10-100	141	1C
TN strain				1A
Sample 50	NC	10-100	51	4N
Sample 39	NC	10-100	116	3K
Sample 75	NC	10-100	102	3K
Sample 48	NC	10-100	71	3K
Sample 49	NC	1-9	159	3K
Sample 51	NC	10-100	91	3K
Sample 52	NC	10-100	168	3K

Les résultats de cette analyse sont les suivantes :
-Tous les génomes de Mayotte appartiennent au sous-type 1D Malagasy, que nous avons décrit sur les souches isolées de patients à Madagascar (publication 2020) et se différencient entre elles par 15 à 50 SNP de différence.
- nous montrons un cluster de 6 souches de Nouvelle Calédonie appartenant au sous-type 3K, les souches se se différenciant entre elles avec 10 SNP de différence.

Ceci semble montrer que la transmission semble avoir eu lieu selon des modalités différentes dans les 2 îles au vue de la diversité. De nouvelles souches sont à séquencer et ces données seront confrontées aux données épidémiologiques.

3. Activités de surveillance

3.1 surveillance de tuberculose resistante

3.1.1. Description des réseaux partenaires

Pour une partie de ses activités de surveillance, le CNR-MyRMA s'appuie sur 2 réseaux partenaires :

Le réseau Azay-Mycobactéries
Depuis 1995, le CNR-MyRMA conduit la surveillance annuelle de la **résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux** grâce à la collaboration volontaire d'une **quarantaine de laboratoires hospitalo-universitaires couvrant toutes les régions métropolitaines** sauf la Corse (pas de CHU). La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour le recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.
La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.
Ce réseau recueille des informations sur ~1.500 cas de tuberculose à culture positive/an.

Le réseau CNR-MyRMA
Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, à travers le réseau créé spécifiquement pour cela et qui réunit **l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~180 en 2018) en métropole et dans les DOM (devenus DROM) mais pas les TOM (devenus POM)** la surveillance annuelle à visée exhaustive du nombre de cas de **tuberculose bactériologiquement confirmée** (culture positive) et, parmi ces cas, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine **(« multirésistants » ou MDR**).
Ce réseau surveille aussi certaines formes particulières de tuberculose (**méningites, *M. bovis***...).
Ce réseau recueille des informations sur ~4.000 cas de tuberculose à culture positive/an.

Les informations recueillies à travers ces réseaux sont transmises à Santé Publique France, et constituent une partie des données françaises de l'ECDC et de l'OMS.

3.1.2. Surveillance de la résistance primaire et secondaire à travers le réseau Azay-mycobactérie des CHU, tendances évolutives depuis 1995

Caractéristiques des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

Les données recueillies en 2019 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2018.
Les 44 CHU ont colligé pour 2018 les données concernant 1810 cas de tuberculose à culture positive. Ce nombre et celui pour 2017 (1922) sont plus élevé que ceux ces 8 années précédentes alors que l'incidence de la tuberculose est globalement à la baisse en France sur cette période. Ceci est expliqué par un plus grand recrutement de cas dans les CHU et à une augmentation du nombre de participants au réseau. La distribution des cas par région est donnée **dans le Tableau ci-dessous.**

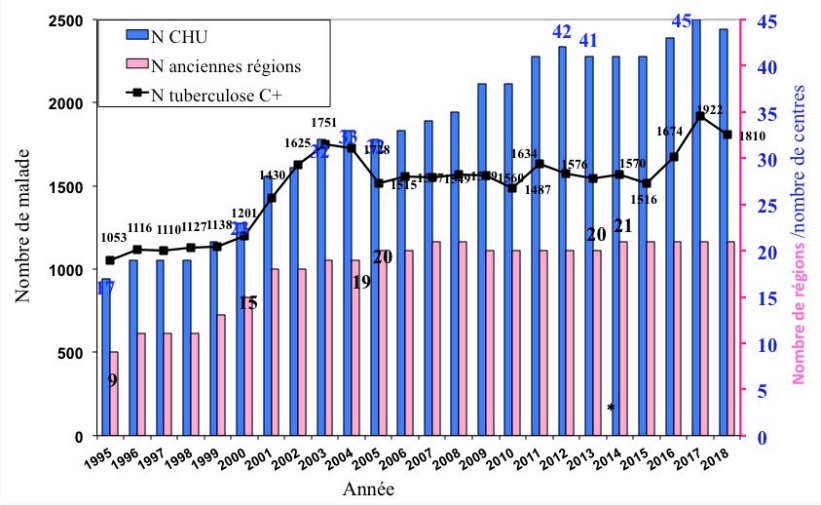


Figure 7. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 1995 à 2018 : nombre total des cas inclus dans la surveillance, nombre de CHU participants et nombre de régions (ancien découpage).

Tableau 13. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2008 à 2018 : distribution des cas à culture positive selon la nouvelle organisation régionale. Pour 2087, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année.

Régions	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	
										N	**%**
Auvergne-Rhône-Alpes	146	144	144	130	147	158	146	194	203	116	**6,4**
Bourgogne-Franche-Comté	36	28	32	37	36	55	39	35	52	**46**	**2,5**
Bretagne	17	12	15	64	67	58	48	51	52	**51**	**2,8**
Centre-Val-de-Loire	15	12	32	22	25	26	26	18	33	**33**	**1,8**
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**-**
Grand-Est	93	75	101	71	79	106	90	112	107	**102**	**5,6**
Haut-de-France	66	62	79	60	65	56	72	50	66	**67**	**3,7**
Ile-de-France	780	747	773	820	825	783	776	861	949	**905**	**50,0**
Normandie	70	70	50	66	77	69	61	71	74	**107**	**5,9**
Nouvelle-Aquitaine	163	163	181	140	84	86	101	84	139	**129**	**7,2**
Occitanie	86	42	45	52	17	56	58	66	112	**111**	**6,1**
Provence ACA	38	61	44	40	50	40	40	53	41	**44**	**2,4**
Pays-de-Loire	63	71	85	74	75	77	59	79	94	**99**	**5,6**
TOTAL	**1574**	**1487**	**1581**	**1576**	**1547**	**1570**	**1516**	**1674**	**1922**	**1810**	**100%**

Les proportions des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2017 par les laboratoires de CHU du réseau Azay-mycobactéries selon les **antécédents de traitement (6,9% déjà traités), le pays de naissance (67,5% nés à l'étranger) et le statut VIH (6,2% de co-infection)** sont données dans la **Figure ci-dessous.**.

L'analyse de **l'évolution depuis 1995** montre :

- une **tendance à la baisse** de la **proportion de cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement de 1995** au début des années 2000s **(10,8% à 6,5%)** puis **une stabilité autour de 7% depuis,**
- une **augmentation quasi continue de la proportion des cas diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger**, de 35% environ au milieu des années 1990, à 40% en 2000 **et ~70% depuis 2014**,
- une **baisse** de 1995 à 2013 **de la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+, puis une stabilité ces dernières années autour de 6%. L'impact de l'épidémie du VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose reste donc très modeste en France.**

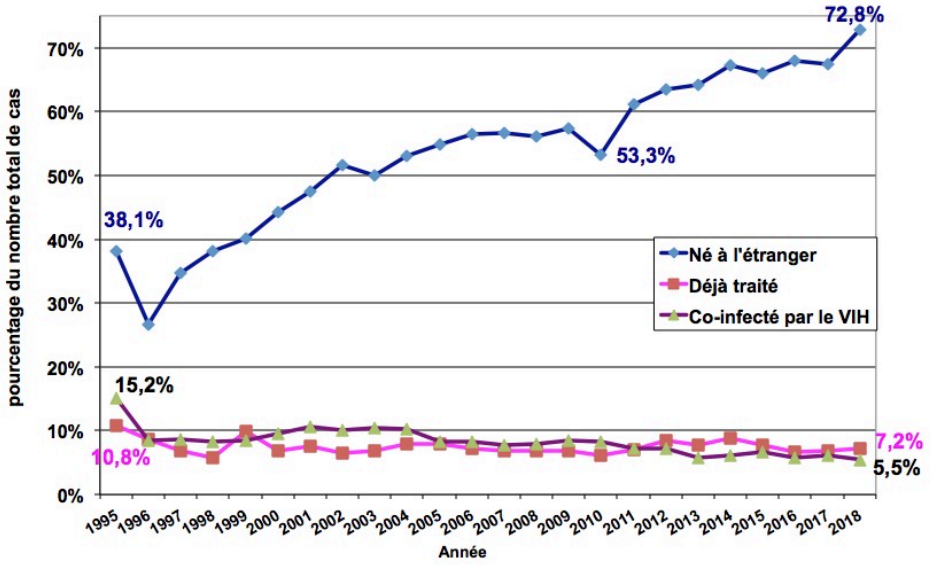


Figure 8. Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018

Sensibilité aux antituberculeux (réseau Azay-Mycobactéries)

La sensibilité à la rifampicine et l'isoniazide a été éprouvée pour 1794 des 1810 cas (99%) de 2018.

Résistance primaire

Pour les 1548 malades **sans antécédent de traitement** (nouveaux cas), le pourcentage global de résistance ("**résistance primaire**") à **au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2018** de **12,3% (Tableau ci-dessous), ce qui confirme la lègère baisse de 2017 après les augmentations des années 2014-2016 (Figure ci-dessous).**

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (**Tableau ci-dessous, Figure ci-dessous**) était en 2018, comme toujours, beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 6,7%) et la streptomycine (SM 9,1%) que pour la rifampicine (RMP 2,5%) et l'éthambutol (EMB 1,6%).

Le pourcentage de résistance primaire à l'INH (6,7%) était en 2018 similaire à ceux de 2016-17 mais restait supérieur à celui de 2014 (5,6%).

Comme les années précédentes, **la très grande majorité des souches résistantes à la rifampicine diagnostiquées en 2018 chez les patients sans antécédent de traitement (31/38) étaient aussi résistantes à INH (multirésistance)**.

La proportion de cas **multirésistants « primaires »** dans les CHU en 2018 dans le réseau Azay-mycobactéries (2%) reste, comme en 2017, un peu inférieure à celles de 2014 (2,4%) et 2015 (2,8%).

Résistance primaire et pays de naissance
Le pourcentage de résistance primaire à au moins un des 4 antituberculeux chez les 394 patients nés en France (**Tableau ci-dessous**) était de 6,1% alors qu'il était de 14,5% chez les 113 patients nés à l'étranger (p<0,01). Pour chaque antituberculeux, le pourcentage de résistance primaire était plus élevé chez les patients nés à l'étranger que chez ceux nés en France. Au total, **parmi les 31 cas MDR « primaires » de 2018 seuls 3 (10%) étaient nés en France.**

Tableau 14. Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2018 parmi les nouveaux cas de tuberculose (résistance "primaire") et les cas déjà traités (résistance "secondaire") selon le pays de naissance (France/autres pays). Réseau Azay-Mycobactéries

Sensibilité	Nouveaux cas						Malades déjà traités					
	Total		France		Autres		Total		France		Autres	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Testées	1548	100	394	100	113	100	130	100	25	100	102	100
Sensible	1357	87,7	370	93,9	971	85,5	103	79,3	22	88,0	78	76,5
Résistant	191	12,3	24	6,1	165	14,5	27	20,8	3	12,0	24	23,5
Résistance à au moins												
SM	132	9,1	19	5,1	112	10,5	19	15,7	2	8,0	17	18,3
INH	104	6,7	12	3,1	91	8,0	25	19,2	2	8,0	23	22,6
RMP	38	2,5	3	0,8	35	3,1	20	15,4	1	4,0	19	18,6
EMB	25	1,6	3	0,8	22	1,9	17	13,1	1	4,0	16	15,7
Résistance isolée à												
SM	75	4,8	10	2,5	64	5,6	2	1,5	1	4,0	1	1,0
INH	45	2,9	4	1,0	40	3,5	5	3,9	1	4,0	4	3,9
RMP	6	0,4	0	-	6	0,5	0	0	0	-	0	-
EMB	4	0,3	1	0,3	3	0,3	0	0	0	-	0	-
dont MDR	31	2,0	3	0,8	28	2,5	20	15,4	1	4,0	19	18,6

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol.
Pour 16 des 1810 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés. Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 116 cas et le pays de naissance était inconnu pour 42 cas. La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 101 cas et l'éthambutol pour 2 cas.

Résistance secondaire

Chez les 130 patients diagnostiqués en 2018 et ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage global de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 20,8%, soit 2 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (**Tableau ci-dessus, Figures ci-dessous**). Après la nette augmentation des années 2012-2017, ce poucentage revient au niveau de ceux des années 1995-2011.
Pris séparément, les pourcentages de résistance "secondaire" à INH (19,2%) et RMP (15,4%) observés en 2018 reviennent aussi au niveau d'avant la période d'augmentation de 2012-2017.

Résistance secondaire et pays de naissance
De manière générale, la résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux pris isolément était 3 fois plus rare chez les patients nés en France.
La quasi totalité (19/20) des cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaires » de 2018 a été diagnostiquée chez des patients nés à l'étranger.

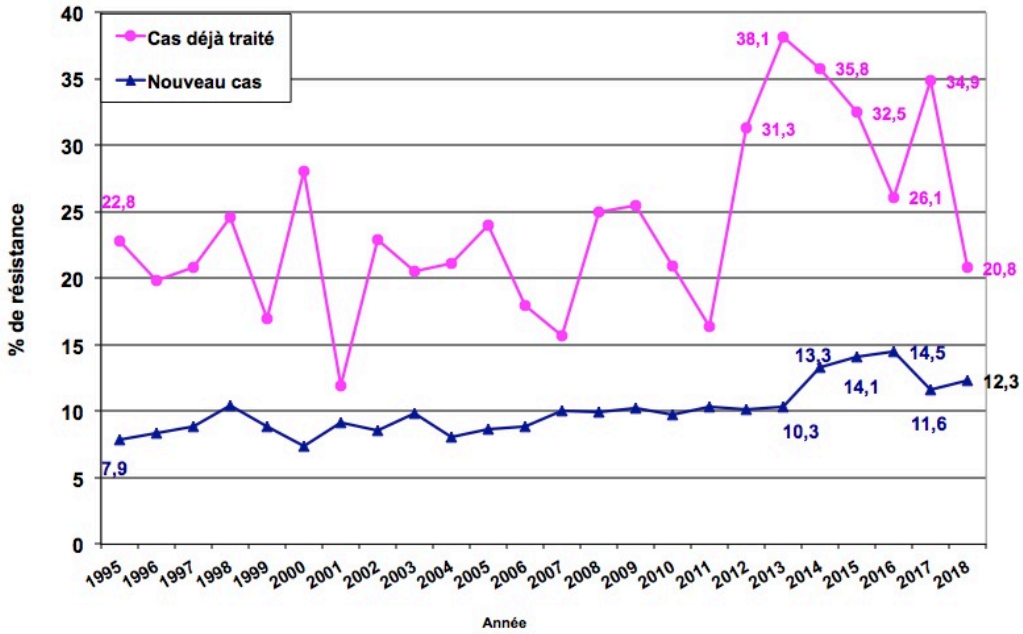


Figure 9. Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et les cas déjà traités (résistance « secondaire »).
Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018

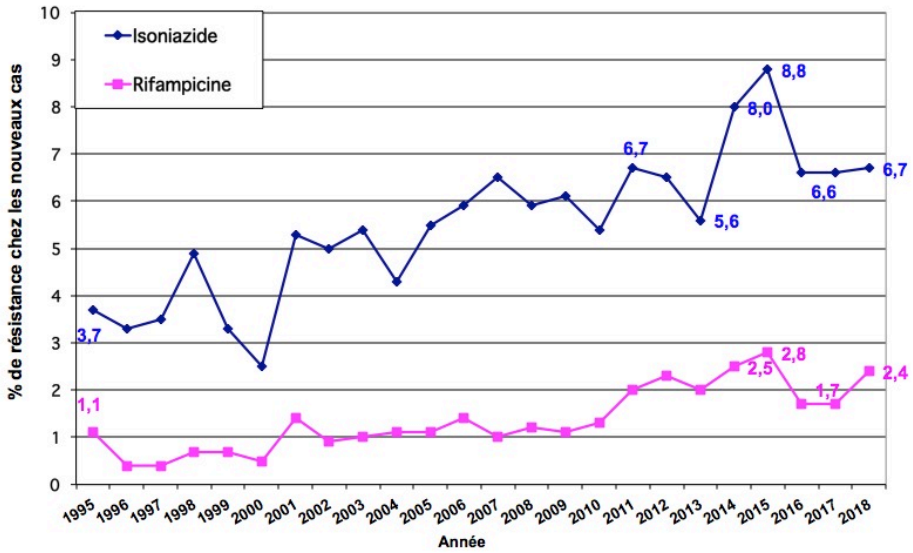


Figure 10. Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »).
Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018

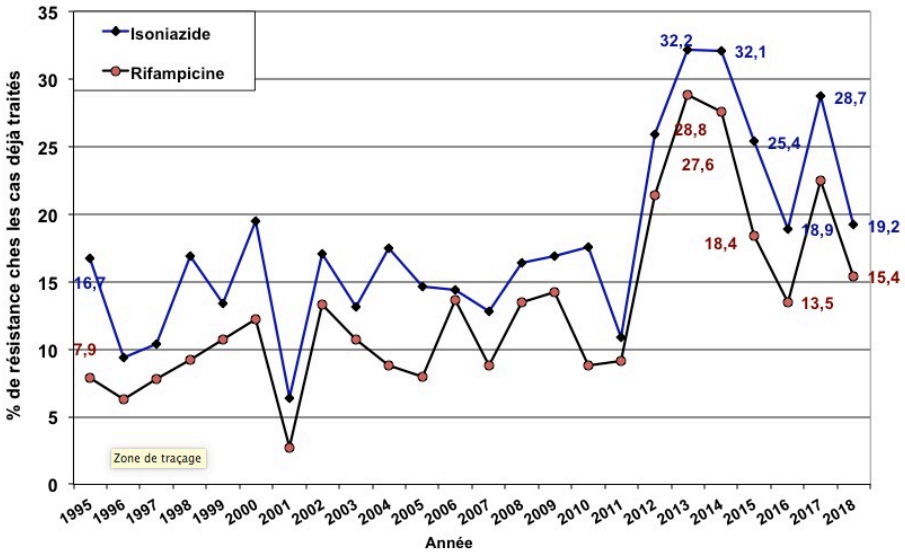


Figure 11. Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2018

Monorésistance à la rifampicine
En 2018, 6 souches monorésistantes à RMP ont été isolées chez des patients nés à l'étranger sans antécédent de traitement. Ce nombre est plus élevé que ceux des annés précédentes (1 à 2 cas ces dernières années).

3.1.3. Surveillance à visée exhaustive de la tuberculose à bacilles multirésistants à travers le réseau CNR-MyRMA

Organisation de la surveillance en 2019

En 2019, le CNR-MyRMA a recueilli des données concernant les cas de tuberculose à culture positive **diagnostiqués en 2018**, à travers son réseau de laboratoire (réseau CNR-MyRMA). Les restructurations des laboratoires d'analyses se poursuivent. En 2018, le réseau comportait **158 laboratoires**, soit 10 de moins qu'en 2017 (n=168). Toutefois, les activités de mycobactériologie des laboratoires ont été, d'après nos informations, transférées dans un laboratoire participant déjà au réseau.
Comme chaque année, l'ensemble des correspondants n'ont pas répondu au moment de rédiger le rapport d'activité (77% de réponse au questionnaire). Les non-réponses concernent essentiellement des laboratoires à très faible activité de mycobactériologie (total de 59 souches rapportées en 2017) mais un très gros laboratoire privé n'a pas encore adressé ses données (total de 510 souches en 2017).

Les données colligées à ce jour **concernent 3576 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2018.**
La région Ile-de-France a diagnostiqué un peu plus de la moitié des cas reportés de 2018 (52%), la région Auvergne-Rhône-Alpes 8% (deux fois inférieur au chiffre habituel en raison de na non déclaration du gros laboratoire privé). Chacune des autres régions représentent de 0,1% à 6% (Hauts-de-France) du total des cas.

En 2018, les **10 laboratoires dont l'activité est la plus importante** ont diagnostiqué plus d'un tiers **des cas (37%) de tuberculose :**
- ✓ 9 laboratoires de CHU (6 d'Ile de France et 3 d'autres régions),
- ✓ 1 laboratoire privé

Fait intéressant, parmi les laboratoires déclarants :
. 12% ont diagnostiqué moins de 2 cas dans l'année,
. 50% ont diagnostiqué 20 cas ou moins
. la médiane est plus élevée qu'en 2017 (17 cas) et 2016 (15 cas) et 2015 (12 cas), ce qui est confirme la concentration des laboratoires effectuant les analyses (cf supra)

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants pour 2018

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en France en 2018 par les 119 laboratoires ayant à ce jour répondu au questionnaire était de **82**, soit une **proportion de 2,3%**

(IC95 : 1,8%-2,8%) de l'ensemble des 3576 cas reportés. **Ce nombre est relativement stable par rapport à 2017 (79 cas) et reste inférieur aux nombres les plus élevés de 2014-2015. La proportion est en hausse par rapport aux deux années précédentes mais avec un dénominateur qui nécessite d'être compléter** (**cf tableau évolutif 1992-2018 plus bas**).

Parmi ces 82 cas MDR, un cas a été signalé au CNR-MyRMA mais la souche ne lui a pas été adressée et aucune information n'est disponible sur ce cas. Au total, parmi les 81 cas pour lesquels les informations sont disponibles, il y a un cas déjà identifié en 2016 (cas chronique) et 80 cas diagnostiqués pour la première fois en 2018**.**

Comme chaque année, quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'ont pas encore adressé leurs données 2018 malgré les relances, dont 4 laboratoires qui ont adressés une souche multirésistante ; il est donc peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2018 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires. Cependant, la proportion estimée de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2018 est vraisemblablement un inférieure à 2,3% si l'on considère les données en attente des laboratoires non déclarant dont u très gros laboratoire privé, ce qui augmentera de manière non négligeable le dénominateur.

Calculée pour chacune des régions de France (Tableau évolution 1992-2018 plus bas**), la proportion de cas MDR** rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés dans chaque région était en 2018 **comprise entre 0% (Bourgogne-Franche-Comté, Corse, DOM) et 6,8% (Gand-Est**)**.**

Par ailleurs, parmi les souches MDR reçues par le CNR-MyRMA en 2018, une venait de Tahiti, région non couverte par le réseau de laboratoires du CNR-MRMA (cf plus haut description des réseaux). Ce cas n'est pas intégré dans les données épidémiologiques qui suivent.

Tableau 15. Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2018 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**.**

Région	Total cas TB	Cas TB MDR	
		N	% du total
Auvergne-Rhône-Alpes	292	12	4,1
Bourgogne-Franche-Comté	58	0	0
Bretagne	107	3	2,8
Centre-Val-de-Loire	74	3	4,1
Corse	1	0	0
Grand-Est	133	9	6,8
Hauts-de-France	225	3	1,3
Ile-de-France	1871	32	1,7
Normandie	128	3	2,3
Nouvelle-Aquitaine	207	7	3,4
Occitanie	203	3	1,5
Provence ACA	135	5	3,7
Pays-de-Loire	101	2	2,0
DOM	41	0	0
Total	**3576**	**82**	**2,3**

Le poids respectif de chaque région parmi les cas de TB-MDR de 2018 est illustré dans le schéma ci- dessous.

Figure 12. Distribution régionale schématique des cas de tuberculose MDR en 2018

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants de 2018

Les caractéristiques des 80 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2018 en France et pour lesquels les informations sont disponibles sont les suivantes (n.b. les différences minimes d'effectifs et de distribution par pays de naissance, comparativement à celle des souches MDR reçues en 2018 au Laboratoire du CNR-MyRMA, cf tableau ci-dessous, sont dues au fait que quelques souches reçues ne correspondent pas à des nouveaux cas de 2018 et quelques souches reçues en 2019 correspondent à des cas diagnostiqués en 2018) **:**

- 78% étaient des hommes,
- 12 (15%) étaient nés en France, et 68 (85%) nés à l'étranger,
- parmi les 68 malades nés à l'étranger, 29 étaient nés en Europe de l'Est (dont 16 en Géorgie), 32 en Afrique sub-saharienne (dont 6 au Congo ou RD Congo, 3 au Soudan et 1 en Erythrée), 3 au Maghreb, et 4 en Asie,
- l'âge médian était de 34 ans (1 cas de moins de 5 ans, 1 cas de plus de 65 ans),
- 12 (15%) étaient séropositifs pour le VIH, 58 (73%) séronégatifs et 10 (12%) de statut VIH inconnu,
- 83% des cas avaient une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 60% n'avaient jamais été traités (MDR « primaire »).

Tendances évolutives 1992-2018

Evolution de la proportion de cas MDR parmi les cas diagnostiqués

Le pourcentage de cas MDR de 2018 est légèrement supérieur à ceux de 2016 et 2017 mais comme souligne plus haut, le dénominateur est clairement sous évalué (**Tableau ci-dessous**).

Tableau 16. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2018)

Année	Cas MDR	Total cas	% MDR	[IC95]
1992	**48**	8441	**0,6**	[0,4-0,7]
1993	**40**	8539	**0,5**	[0,3-0,6]
1994	**58**	7751	**0,7**	[0,5-0,9]
1995	**40**	7119	**0,6**	[0,4-0,8]
1996	**29**	6441	**0,5**	[0,3-0,6]
1997	**26**	5917	**0,4**	[0,3-0,6]
1998	**39**	5766	**0,7**	[0,5-0,9]
1999	**48**	5597	**0,9**	[0,6-1,1]
2000	**51**	5569	**0,9**	[0,7-1,2]
2001	**48**	5445	**0,9**	[0,7-1,2]
2002	**79**	5609	**1,4**	[1,1-1,7]
2003	**77**	5480	**1,4**	[1,1-1,8]
2004	**68**	5333	**1,3**	[1,0-1,6]
2005	**65**	5043	**1,3**	[1,0-1,6]
2006	**61**	4933	**1,2**	[0,9-1,5]
2007	**44**	4802	**0,9**	[0,7-1,2]
2008	**57**	4880	**1,2**	[0,9-1,5]
2009	**48**	4503	**1,1**	[0,8-1,4]
2010	**47**	4388	**1,1**	[0,8-1,4]
2011	**75**	4383	**1,7**	[1,3-2,1]
2012	**94**	4089	**2,3**	[1,9-2,8]
2013	**82**	4267	**1,9**	[1,6-2,4]
2014	**110**	4198	**2,6**	[2,2-3,2]
2015	**94**	4299	**2,2**	[1,8-2,7]
2016	**70**	4313	**1,6**	[1,3-2,0]
2017	**79**	4227	**1,9**	[1,5-2,3]
2018	**82**	3576*	**2,3**	[1,8-2,8]

*chiffres à affiner (quelques réponses de laboratoires sont en attente)

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA **est restée globalement constante dans la majorité des régions durant les années 2008-2018** (**Tableau ci-dessous**). Toutefois, pour 2018, il existe une baisse notable du nombre de cas enregistrés en Ile-de-France**.** Cette région qui représentait environ 40-50% des cas depuis 2008, ne représente qu'un peu plus d'un tiers des cas en 2018.

Tableau 17. Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2008 à 2018 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA.

Région	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Auvergne-Rhône-Alpes	7	5	5	14	11	14	17	**11**	8	9	12
Bourgogne-Franche-Comté	0	0	1	1	2	1	1	**0**	0	0	0
Bretagne	2	3	0	2	5	6	0	**2**	2	3	3
Centre-Val-de-Loire	1	0	0	1	3	1	2	**1**	1	2	3
Corse	3	2	1	0	0	0	1	**1**	0	0	0
Grand-Est	2	1	2	4	5	6	4	**4**	5	3	9
Haut-de-France	2	1	2	1	7	3	6	**5**	3	3	3
Ile de France	31	30	23	36	40	35	56	**51**	31	40	32
Normandie	0	0	4	2	0	2	7	**2**	3	4	3
Nouvelle-Aquitaine	2	2	1	0	7	3	4	**7**	6	6	7
Occitanie	2	1	2	2	5	5	4	**4**	2	3	3
Provence ACA	2	1	4	9	5	4	7	**3**	7	2	5
Pays de Loire	2	2	0	2	3	1	0	**3**	2	3	2
DOM	1	0	2	1	1	1	1	**0**	0	1	0
Total	**57**	**48**	**47**	**75**	**94**	**82**	**110**	**94**	**70**	**79**	**82**

Tuberculose multi-résistantes chez les enfants

Pour la 1ère fois, les données TB-MDR ont été analysées pour montrer la place des enfants parmi les casLe nombre de cas annuel de TB-MDR chez des enfants est très faible en France. Depuis 2009, il varie de 0 à 3 pour les enfants de ≤ 5 ans et de 0 à 4 pour les enfants de 6 à 15 ans (Tableau).

Tableau 18. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants chez les enfants en France entre 2009 et 2018

Année	Cas <=5 ans	Cas de 6 à 15 ans
2009	0	1
2010	0	2
2011	1	3
2012	3	1
2013	1	0
2014	1	1
2015	2	4
2016	1	1
2017	0	1
2018	1	3

Parmi les 10 enfants de ≤5 ans de la période 2009-2018, il y avait 7 garçons et 3 filles, 4 étaient nés en France et 6 à l'étranger (1 en Europe de l'Ouest, 2 en Europe de l'Est, 1 en Afrique du Nord, 2 en Afrique sub-saharienne). Parmi les 17 enfants plus âgés, il y avait 8 garçons et 9 filles, 6 étaient nés en France et 11 à l'étranger (2 en Europe de l'Est, 6 en Afrique sub-saharienne, 2 en Asie, 1 aux Amériques).

L'évolution régionale est disponible en ligne sur le site du CNR :
http://cnrmyctb.free.fr/spip.php?article13

Evolution des caractéristiques des cas de tuberculose MDR

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées au cours des 26 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (**Tableau ci-dessous**).

Il faut noter **entre 1992 et 2011** une **diminution constante des proportions représentées :**
. par les hommes (74% à 58%)
. par les patients avec antécédents de traitement (73% à 37%)
. par les patients nés en France (49% à 17%). L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 51% à 83%) était liée aux patients nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en

Afrique sub-saharienne.

Au cours des 5 années **2012-16**, s'est produit, par rapport aux années précédentes : un **retour à une très grande majorité de cas de sexe masculin (72%), plus de cas nés en Europe (49%), plus de cas sans antécédents de traitement (63%)**. Ceci est lié à l'augmentation de cas de résistance 1aire chez des hommes nés en Europe de l'Est, principalement en Géorgie.

Les caractéristiques des patients identifiés au cours de 2017-2018 sont très proches de celles des cas de la période 2012-2016, en dehors d'une plus grande proportion de patients nés en Afrique sub-saharienne et dans les autres régions du monde par rapport à l'Europe de l'Est.

Tableau 19. Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 1992 à 2017

Caractéristiques	**1992-1996**	**1997-2001**	**2002-2006**	**2007-2011**	**2012-2016**	**2017-2018**
N total cas recensés, dont :	215	211	351	275	452	158
- déjà connus CNR-MyRMA	43 (20%)	38 (18%)	40 (11%)	19 (7%)	10 (2%)	2
- recensés 1ère fois	**172 (80%)**	**173 (82%)**	**311 (89%)**	**254 (92%)**	**442 (98%)**	**156 (99%)**
Parmi les cas recensés pour la 1ère fois :						
Age médian	39 (16-88)	36 (3-85)	31 (0-95)	32 (0-82)	34 (0-93)	33 (2-84)
Sexe masculin	74%	65%	60%	58%	72%	75%
Antécédents de traitement	**73%**	**47%**	**38%**	**37%**	**37%**	**36%**
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	84%	81%
Né à l'étranger, dont :	**51%**	**65%**	**79%**	**83%**	**86%**	**87%**
- Europe	7%	8%	15%	31%	49%	36%
- Maghreb	15%	19%	13%	7%	6%	4%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	27%	20%	36%
- Autres	12%	13%	12%	18%	11%	11%
Pays de naissance inconnu	0,5%	3%	3%	8%	1%	0%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	55%	53%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	62%	63%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	75%	74%

3.2. Surveillance de la tuberculose à M. bovis

Le CNR-MyRMA effectue depuis 2012 une surveillance de la tuberculose humaine à *M. bovis* à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des laboratoires de CHU.
L'ensemble des laboratoires du réseau n'identifie pas systématiquement les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* jusqu'à l'espèce. Ceci explique que le nombre de laboratoires inclus pour calculer le pourcentage de cas de tuberculose à *M. bovis* au sein de tous les cas diagnostiqués est un peu inférieur au nombre total de laboratoires du réseau qui effectuent la surveillance de la résistance aux antituberculeux. Par ailleurs, il faut noter que les chiffres n'incluent pas, dans le numérateur ou le dénominateur les cas à « *M. bovis* BCG ».

En 2018, 33 cas de tuberculose *à M. bovis* ont été identifiés par les laboratoires du réseau AZAY, **soit 2,4%** des 1361 souches pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce **: 9 étaient nés en France (âges 5 - 93 ans),** 19 au Maghreb (18 - 84 ans), 1 au Moyen-Orient (19 ans), 3 en Afrique sub-saharienne (16 - 28 ans) et 1 d'origine inconnue (71 ans). Parmi les 9 cas nés en France, 2 étaient signalés par un CHU de la région Auvergne-Rhône-Alpes, 4 en Ile-de-France, 1 en Normandie et 1 en Occitanie.
Parmi les 3 cas nés en France et de moins de 20 ans, 2 étaient de la région Ile-de-France, dont un immunodéprimé avec une tuberculose généralisée et un cas de tuberculose pulmonaire et un cas était de la région Auvergne-Rhône-Alpes, avec une tuberculose ganglionnaire.

La proportion de *M. bovis* parmi l'ensemble des cas de tuberculose est la plus élevée rapportée depuis 2013 (Tableau ci-dessous) après une baisse en 2017. Toutefois, cette proportion n'est pas statistiquement différente de celle de 2017 (p=0,06) mais significativement plus élevée que celle des années 2013 et 2014. Le nombre de cas nés en France n'étant que très légèrement supérieur en 2018 (9 cas) qu'en 2017 (7 cas), l'augmentation 2018 du nombre de cas est principalement liée aux cas nés à l'étranger. Il sera important de continuer à surveiller cette indicateur et de le comparer à la surveillance de

la tuberculose bovine ou animale. L'extrapolation de ce pourcentage à l'ensemble des cas de tuberculose recensés en France suggère que le nombre total de cas de tuberculose *à M.bovis* serait de l'ordre de plus de 80 cas par an.

Tableau 20. Nombre et % de tuberculose à *M. bovis* en France, réseau AZAY-Mycobactéries, 2014-2018

Année	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nombre de cas *M. bovis*	**10**	**16**	**19**	**26**	**23**	**33**
Nombre de tuberculose à culture**+**	1119	1179	1131	1241	1487	1361
Pourcentage de *M. bovis*	**0,9%**	**1,4%**	**1,7%**	**2,1%**	**1,6%**	**2,4%**
Nombre de laboratoires*	27	28	28	28	28	27

* total des laboratoires poursuivant systématiquement l'identification jusqu'à l'espèce

3.3. Surveillance de la méningite tuberculeuse à travers le réseau CNR-MyRMA, tendances évolutives

Le CNR-MyRMA recueille depuis 2000 le nombre de cas et l'incidence des méningites tuberculeuses (MTB) chez les enfants de 5 ans et moins car cela constitue un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de l'impact de la politique de vaccination par le BCG.

Pour cela, le CNR-MyRMA réalise une **enquête annuelle rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de ≤ 5 ans** à travers son réseau national des laboratoires qui font la culture des mycobactéries.

Le **Tableau ci-dessous** donne le nombre de cas de méningite à culture positive selon les années.

De 2000 à 2011, il y avait de manière très stable entre 0 et 2 cas par an confirmés à la culture. **A partir de 2012,** il y a eu une **légère augmentation du nombre de cas** qui est actuellement de 3 à 4 par an, chiffre stable de 2013 à 2016**.**
Le réseau du CNR-MyRMA a enregistré 2 cas de méningite en 2018. Ce chiffre très bas, équivalent à ce qui était observé avant 2011, sera à confirmer dès que d'autres données seront collectées car l'exhaustitivté du réseau n'est pas satisfaisante pour 2018 (cf. supra).
L'ensemble de ces informations est en cours de croisement avec les données de la Déclaration Obligatoire colligées par SpFrance. La modélisation réalisée par l'InVS (devenu SpFrance) avant l'arrêt de l'obligation vaccinal BCG avait permis **d'anticiper une éventuelle augmentation modérée du nombre de cas de méningite dans les 15 ans suivants la modification de stratégie** vaccinale. **C'est ce qui s'est effectivement produit**. Les données de la surveillance et celles de la modélisation imposent de continuer la surveillance.

Tableau 21. Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2017

Année	Nombre de cas à culture positive
2000	1
2001	1
2002	1
2003	1
2004	0
2005	1
2006	2
2007	1
2008	1
2009	1
2010	1
2011	0
2012	4
2013	5
2014	3
2015	**3**
2016	3
2017	6
2018	**2**

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens, de la tuberculose

Les données réunies par le réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance primaire et secondaire du bacille tuberculeux ont été envoyées comme chaque année à l'ECDC et, par ce biais, à l'OMS, grâce à la collaboration ECDC-OMS région Europe.
Ces données sont intégrées aux rapports de l'OMS.

Les données WGS des souches MDR de *M. tuberculosis* ont été envoyées à l'ECDC dans le cadre du programme européen de surveillance moléculaire de la tuberculose MDR (**cf section WGS**).

Les **données sur les cas de lèpre ont été envoyées à l'OMS** dans le cadre du « WHO Global Leprosy Programme ».

3.5. Registre des cas de tuberculose MDR

En 2019, les dernières mises à jour informatiques du registre des cas de tuberculose MDR ont été effectuées, en particulier pour ce qui concerne :

- ✓ la création des nouveaux utilisateurs par les médecins du CNR-MyRMA ;
- ✓ la déclaration des nouveaux cas pour les utilisateurs déjà enregistrés dans le système ;
- ✓ l'interface pour les comptes rendus des RCP « Groupe Thérapeutique des Infections à Mycobactéries » du CNR-MyRMA.

Le registre est donc maintenant prêt pour la mise en œuvre.

En **décembre 2019, la première réunion du Conseil Scientifique du Registre** a eu lieu.
Pour rappel, le Conseil Scientifique est constitué du Directeur du CNR-MyRMA en activité, du coordonnateur de la RCP « Groupe Thérapeutique des Infections à Mycobactéries » du CNR-MyRMA, du médecin coordonnateur du registre, d'un représentant de Santé Publique France, de médecins du Sanatorium du Centre Hospitalier de Bligny, des CHU de la Pitié-Salpêtrière et de Bichat (Paris) et du CHU de Lyon, d'un Médecin représentant la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et d'un médecin représentant la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) (absent).

Pendant la réunion**, tous les participants ont confirmés leur adhésion au projet, ont reçu des identifiants pour accéder au registre et pouvoir le tester**

Les prochaines étapes pour l'année 2020 ont été fixées :

- ✓ test grandeur nature du registre à l'occasion des RCP ; puis corrections des « bugs »
- ✓ inclusion dans le registre des patients MDR déclarées au CNR-MyRMA à partir de Janvier 2020
- ✓ mise en place et test du registre dans les centres pilotes (Lyon, Rennes, Paris-Bichat, Paris-PSL, Bligny)

Pour ce qui concerne l'activité de surveillance du CNR-MyRMA et de Santé Publique France, **la saisie rétrospective d'une proportion des cas MDR à partir de 2006** (en particulier des issues de traitement) est envisagée ; **la difficulté est celle de l'import automatisé des données informatisée au CNR qui n'est pas résolue à ce jour par les informaticiens prestataires**.

3.6. Surveillance de la lèpre en France

Depuis les actions de motivation menées en 2012-2013 par le CNR-MyRMA auprès des interlocuteurs des DOM-TOM en particulier de Mayotte, département français où la lèpre reste prévalente (~15 cas / 100 000 h), ainsi qu'auprès des dermatologues et infectiologues de métropole, nous avons reçu de nombreuses biopsies pour suspicion de lèpre.
Ceci a permis de confirmer le diagnostic :
(a) de 33 cas en 2019
(b) de 197 cas de 2013 à 2019 (24 à 33 cas selon les années, moyenne 28 cas).

Les cas découverts dans les **DOM-TOM représentent 59% du total dont 43% découverts à Mayotte** (cf tableau ci-dessous).
Les 41% restants ont été découverts en métropole chez des personnes nées à Mayotte ou des migrants venant de pays où la lèpre est prévalente (Inde, Sri Lanka, Pakistan, Bangladesh, Philippines,

RD Congo, Mali, Sénégal, Madagascar, Comores, Tchad, Cameroun, Brésil, Haïti…).

Tableau 22. Nombre annuel de cas de lèpre diagnostiqués par le CNR-MyrMA depuis 2013

Année	N cas	Nouveaux cas	Rechutes	DOM-TOM (Mayotte)*	Métropole**
2013	24	18	6	18 (13)	6
2014	31	26	5	17 (14)	14
2015	26	22	4	16 (11)	10
2016	23	22	1	14 (11)	9
2017	27	23	4	18 (13)	9
2018	33	31	2	19 (14)	14
2018	33	24	9	14 (9)	10
Total	**197**	**166**	**31**	**116 (85)**	**72**

* Autres DOM-TOM : **2013 :** 4 Nouvelle Calédonie, 1 Guadeloupe ; **2014** : 1 Réunion, 2 Tahiti ; **2015 :** 2 Tahiti, 3 Nouvelle Calédonie ; **2016** : 3 Nouvelle Calédonie ; **2017 :** 5 Nouvelle Calédonie ; **2018 :** 5 Nouvelle Calédonie ; **2019** : 1 Nouvelle Calédonie, 1 Réunion, 1 Guadeloupe, 1 Martinique, 1 Guyane.
** personnes nées à Mayotte ou migrants nés à l'étranger mais résidant en France métropolitaine

3.7. Etude génotypique des souches de *M. tuberculosis* : détection et investigation des cas groupés

En 2019, le CNR-MyRMA a réalisé le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 228 souches: 153 souches de *M. tuberculosis* non MDR et 75 souches MDR

La méthode utilisée a été l'analyse MIRU-VNTR de 24 loci pour toutes les souches, complétées si besoin par d'autres loci puis par WGS.

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M. tuberculosis* complex est ci-après classé de la manière suivante :
- suspicions de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les ARS et les structures de lutte antituberculeuse (CLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- études systématiques des souches des cas de tuberculose MDR, ce qui permet de participer au programme Euro-TB de l'ECDC.

3.7.1.Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas de tuberculose maladie non MDR »

En 2019, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le génotypage (empreintes digitales génomiques) de **136 souches de *M. tuberculosis* non MDR pour 41 situations** en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT. (tableau ci-dessous). C'est **le nombre le plus élevé depuis 2006.**

Il s'agissait de :
- **41 situations de suspicion de transmission en collectivité** (total : 130 cas).

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 29 situations et, au total, pour 76 des 130 cas (58%).**
Les 29 situations comportaient chacune de 2 à 9 cas bactériologiquement reliés :
- 4 fois au sein d'un établissement scolaire
- 4 fois dans le cadre professionnel
- 7 fois dans des foyers pour personnes en situation de précarité, **dont 1 épisode de 9 cas**
- 6 fois au sein d'une famille
- 8 fois dans un contexte communautaire

- **3 situations de suspicion de transmission en milieu des soins** (total : 6 cas).

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 2 situations et, au total, pour 4 des 6 cas (67%) dont un épisode de transmission de malade à soignant.**

Les lignées phylogéniques en cause étaient surtout les lignées classiques Haarlem (n=36) et Cameroon (n=13). **Peu de lignée Beijing (n=7).**

Tableau 23. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyrMA en 2019, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	Situations	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Clades-lignées
Collectivité				
Ecoles	1	2	0	
	2	2	0	
	3	2	2	LAM
	4	2	2	Beijing
	5	3	3	X
	6	5	4	Uganda
Entreprise	1	2*	1	S
	2	2	0	
	3	3	3	Haarlem
	4	2	2	Beijing
	5	1[µ]	1	Non typable
Foyers précarité	1	3	0	
	2	3	0	
	3	1[$]	1	West african 2
	4	5	2	Cameroon
	5	1[£]	1	Ural
	6	14	0	
	7	8	5	Haarlem
	8	12	9 et 2	Cameroon-Haarlem
	9	7	2	Haarlem
	10	9	4 et 3	Haarlem-Ghana
Famille	1 (cousines)	2	2	Delhi/CAS
	2 (mère/fille)	2	2	Delhi/CAS
	3	2	2	Haarlem
	4	2	2	H37Rv
	5	2	0	
	6	2	2	Tur
	7(ex conjoints)	2	2	Haarlem
Communautaire	1 Centre Education et Formation	2	2	Haarlem
	2 Colocation	2	2	Haarlem
	3 Lieu de culte	1[¤]	1	LAM
	4 Bar	2	2	L4
	5	2	2	Haarlem
	6 Club de jeux	3	3	Uganda
	7	2	2	EAI
	8	2	0	
	9 Milieu carcéral	2	0	
	10 Lieu de culte	2	0	
	11 Lieu de culte	2	0	
	12	2	0	
	13 Foyer de vie	3	3	Haarlem
Milieu de soins				
	1 CHU : malade - soignant	2	2	LAM
	2 CHI : malade - malade	2	2	Haarlem
	3 Centre dialyse :malade - malade	2	0	
Total	**41**	**136**	**80**	

* 2 souches de 2019 comparées à 2 souches reçues en 2015 et 2 souches reçues en 2016
[µ] 1 souche de 2019 comparée à une souche reçue en 2015
[$] 1 souche de 2019 comparée à 2 souches reçues en 2018
[£] 1 souche de 2019 comparée à 8 souches reçues en 2018
[¤] 1 souche de 2019 comparée à 2 souches reçues en 2018

Tendances évolutives 2006-2019

Comme le montre le Tableau ci-dessous, **le CNR-MyRMA a identifié par génotypage, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et les CCLIN, de 2006 à 2019 :**

- 6 à 29 épisodes/an de cas groupés dans les familles et dans la communauté, soit 226 épisodes en 14 ans totalisant 629 cas (2 à 13 cas par épisode).
- 0 à 5 épisodes/an de cas groupés en milieu de soins, soit 34 épisodes en 14 ans totalisant 85 cas (2 à 8 cas par épisode).

L'utilisation de méthodes permettant la comparaison des génotypes au cours du temps (RFLP puis MIRU-VNTR 24 loci) est particulièrement importante pour identifier des chaines de transmission s'étendant sur plusieurs années, comme le montre l'exemple de 13 cas liés identifiés sur une période de 3 ans (2012 à 2014).

Tableau 24. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* non MDR dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques dans les familles et la communauté et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2019 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage)

Année	**Familles et communauté**	**Milieu de soin**
2006	11 enquêtes (total : 28 cas suspects) 7 épisodes confirmés : total 17 cas, 2 à 4 cas/épisode	6 enquêtes (total : 23 cas suspects) 3 épisodes confirmés : total 6 cas, 2 cas/ épisode
2007	19 enquêtes (total : 50 cas suspects) 6 épisodes confirmés : total 23 cas, 2 à 5 cas/épisode	3 enquêtes (total : 9 cas suspects) 1 épisode confirmé : total 2 cas
2008	24 enquêtes (total : 65 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 45 cas, 2 à 10 cas/épisode	7 enquêtes (total : 21 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 13 cas, 2 à 7 cas/épisode
2009	12 enquêtes (total : 36 cas suspects) 12 épisodes confirmés : total 34 cas, 2 à 6 cas/épisode	6 enquêtes (total : 19 cas suspects) 5 épisodes confirmés : total 12 cas, 2 à 4 cas/épisode
2010	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 16 épisodes confirmés : total 35 cas, 2 à 5 cas/épisode	7 enquêtes (total 15 cas suspects) 4 épisodes confirmés : total 9 cas, 2 à 3 cas/épisode
2011	22 enquêtes (total : 65 cas suspects) 17 épisodes confirmés : total 44 cas, 2 à 5 cas/épisode	4 enquêtes (total 13 cas suspects) 2 épisodes confirmés : total 4 cas, 2 cas/épisode
2012	27 enquêtes (total : 91 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 64 cas, 2 à 10 cas/épisode	4 enquêtes (total 11 cas suspects) 3 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 cas/épisode
2013	26 enquêtes (total : 78 cas suspects) 14 épisodes confirmés : Total 50 cas, 1 à 8 cas/épisode À noter : 2 cas liés à 10 cas de 2012 ; 1 épisode de 5 cas liés à 4 cas de 2012 ; 1 épisode de 4 cas liés à 2 cas de 2012	1 enquête (total 3 cas suspects) 1 épisode confirmé de 3 cas, liés à 2 cas de 2012
2014	25 enquêtes (total : 61 cas suspects) 17 épisodes confirmés : Total 37 cas, 1 à 5 cas/épisode À noter : 1 cas lié à 10 cas de 2012 et 2 cas de 2013 ; 1 épisode de 3 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 épisode de 2 cas liés à 1 cas de 2013 ; 1 cas lié à 1 cas de 2013	3 enquêtes (total 19 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés
2015	19 enquêtes (total : 44 cas suspects) 13 épisodes confirmés : Total 26 cas, 1 à 3 cas/épisode À noter : 1 épisode de 1 cas lié à 4 cas de 2010, 1 épisode de 1 cas lié à 3 cas de 2012-14 ; 1 épisode de 1 cas lié à 1 cas de 2014	5 enquêtes (total 13 cas suspects) 3 épisodes confirmés de 2, 2 et 4 cas liés
2016	27 enquêtes (total : 75 cas suspects) 21 épisodes confirmés : Total 52 cas liés, 2 à 5 cas/épisode À noter : 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2014, 1 épisode de 2 cas liés à 2 cas de 2018	3 enquêtes (total 8 cas suspects) 1 épisode confirmé de 2 cas liés
2017	25 enquêtes (total : 91 cas suspects) 20 épisodes confirmés : Total 70 cas liés, 2 à 7 cas/épisode	Aucune enquête
2018	22 enquêtes (total : 79 cas suspects) 17 épisodes confirmés : Total 56 cas liés, 2 à 8 cas/épisode À noter : 1 épisode de 1 cas lié à 7 cas de 2014, 1 épisode de 1 cas lié à 1 cas de 2011	7 enquêtes (total 20 cas suspects) 3 épisodes confirmés de 8 et 2 fois 2 cas liés
2019	41 enquêtes (total : 130 cas suspects) 29 épisodes confirmés : Total 76 cas liés, 2 à 9 cas/épisode	3 enquêtes (total 6 cas suspects) 2 épisodes confirmés de 2 cas liés dont un épisode de tranmission de malade à soignant

3..1. Suspicion de rechute

En 2019, le CNR-MyrMA a reçu pour 1 patient suspect de rechute de tuberculose **2 souches isolées en 2016 et 2019**.
La rechute a été confirmée par le génotypage.

3..2. Suspicion de contamination inter-prélèvements au laboratoire

En 2019, le CNR-MyrMA a reçu **15 souches** correspondant à 7 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. **Le génotypage a confirmé la contamination au laboratoire pour 4 de ces 7 épisodes**. Ces 4 épisodes totalisaient 8 souches.

Tendances évolutives 2006-2019

Comme le montre le tableau ci-dessous, le CNR-MyRMA **a confirmé par génotypage de 2006 à 2019** :
- 0 à 5 cas de rechute par an, soit **20 cas de rechute en 14 ans** sur un total de 31 suspicions (65%),
- 2 à 19 épisodes/an de **contamination inter-prélèvements au laboratoire** soit **112 épisodes en 14 ans** (totalisant 300 cas, 2 à 8 cas par épisode) sur un total de 171 épisodes suspects (65%).

Ces % de confirmation élevés montrent que les indications sont bien posées, ce qui résulte de discussions préalables entre les collègues demandeurs et l'équipe du CNR-MyRMA.

Tableau 25. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* dans le cadre des suspicions de rechutes et de suspicions de contaminations de laboratoire : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2019

Année	**Suspicion de rechutes**	**Suspicion de contamination de laboratoire**
2006	2 suspicions 0 confirmation	25 enquêtes (total : 78 souches) 19 épisodes confirmés : Total 48 cas, 2 à 4 cas /épisode
2007	1 suspicion 1 confirmation	12 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : Total 18 cas, 2 à 3 cas/épisode
2008	3 suspicions 3 confirmations	11 enquêtes (total : 28 souches) 8 épisodes confirmés : Total 17 cas, 2 à 3 cas/épisode
2009	5 suspicions 5 confirmations	21 enquêtes (total : 59 souches) 13 épisodes confirmés : Total 36 cas 2 à 6 cas/épisode
2010	0 suspicion	8 enquêtes (total : 40 souches) 5 épisodes confirmés : Total 33 cas, 2 à 8 cas/épisode
2011	3 suspicions 3 confirmations	15 enquêtes (total : 40 souches) 9 épisodes confirmés : Total 25 cas 2 à 5 cas/épisode
2012	8 suspicions 2 confirmations	18 enquêtes (total : 45 souches) 13 épisodes confirmés : Total 28 cas, 2 à 3 cas/épisode
2013	0 suspicion	13 enquêtes (total : 34 souches) 9 épisodes confirmés : Total 22 cas, 2 à 5 cas/épisode
2014	2 suspicions 1 confirmation	13 enquêtes (total: 30 souches) 9 épisodes confirmés : Total 22 cas, 2 à 5 cas/épisode
2015	2 suspicions 1 confirmation	6 enquêtes (total: 13 souches) 2 épisodes confirmés : Total 4 cas, 2 cas/épisode
2016	1 suspicion 0 confirmation	5 enquêtes (total: 17 souches) 2 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 et 4 cas/épisode
2017	1 suspicion 1 confirmation	8 enquêtes (total: 26 souches) 4 épisodes confirmés : Total 16 cas, 2 à 8 cas/épisode
2018	2 suspicions 2 confirmations	9 enquêtes (total: 24 souches) 7 épisodes confirmés : Total 17 cas, 2 à 3 cas/épisode
2019	1 suspicion 1 confirmation	7 enquêtes (total : 15 souches) 4 épisodes confirmés : Total 8 cas, 2 cas/épisode

3..3. Souches multirésistantes (MDR)

3.8.4.1. Analyse de la répartition des lignées phylogénique des souches MDR de 2018

Nous avons **analysé de manière systématique** les **75 souches MDR/XDR reçues au CNR-MyRMA** en **2019 par la technique du MIRU-VNTR 24 loci**. Cette technique permet à la fois une analyse phylogénique (identification des clades ou lignées ou phylums) et l'identification de cas potentiellement reliés (empreintes digitales génomiques). En 2019, **l'analyse MIRU-VNTR a pu être finalisée pour 72/75 souches** (cultures négatives pour 2 souches et MIRU ininterpretable pour 1 souche).

Sur le plan phylogénique (**tableau ci-dessous**), on voit que la proportion de souches MDR appartenant à la lignée Beijing, qui avait plus que doublé entre 2006 (11/57, 19%) et 2013 (41/83, 49%) en relation avec l'augmentation de la part des cas qui concernait des patients nés en ex-URSS (en particulier en Géorgie), était redescendu depuis 2014 autour de 40%. **En 2019, la proportion des souches Beijing était de 39%, ce qui confirme la stabilisation du nombre de cas de tuberculose MDR causés par des souches Beijing.**

Les autres lignées importantes sont les lignées LAM (14% du total) et Ghana (6,5%)

Tableau 26. Evolution de 2006 à 2019 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées 1, 2 et 3, et en vert lignée 4)

Années	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Total
Groupe PGG1															
EAI	2	1	0	0	0	0		2	3			1		1	10
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	1	1	2	8	1	3	25
Beijing	**11**	**9**	**15**	**17**	**19**	**23**	**38**	**41**	**52**	**34**	**30**	**29**	33	**28**	**379**
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	4
West African 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	3
Canetti	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Groupe PGG2															
Haarlem et X	5	0	2	2	2	3	2	**10**	**9**	**10**	**6**	**17**	**10**	**7**	**85**
LAM	**5**	**7**	**3**	**3**	**4**	**8**	**16**	**10**	**19**	**22**	**12**	**7**	**9**	**12**	**137**
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	4	2	2	1	3	2	27
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1		1	1	1	3	4	13
S	2	2	3	1	3	3	3	2	1	2	3	2	3		30
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3				2	2	2	1	22
Ghana	4	1	5	6	2	3	1	1	3	4	**7**	**5**	**13**	**10**	**65**
H37Rv											1	2		2	5
T1-T2-T3 et « nt »	**19**	**14**	**18**	**19**	**12**	**19**	**21**	**11**	**18**	**20**	**3**	**3**	3	2	**182**
Autres															
NEW-1	0	0	0	0	0	1							1		2
M. bovis	0	0	0	0	0	1				1	1				3
Total	**57**	**37**	**51**	**52**	**45**	**67**	**91**	**83**	**110**	**98**	**70**	**78**	**82**	**72**	**993**

La stratification des cas de TB-MDR par régions géographiques de naissance des patients montre clairement (tableaux ci-dessous) en 2019 comme pour la période cumulée 2006-2018 la prédominance :

- des lignées Haarlem, LAM, L4/nt et Beijing en France, Maghreb et Afrique du centre
- de la lignée Ghana en Afrique de l'ouest
- des lignées Cameroon et Ural-Tur en Afrique de l'est
- de la lignée Beijing en Russie, Asie centrale (dont Géorgie) et Asie

Tableau 27. Répartition (en nombre) des souches MDR 2019 selon les lignées phylogéniques et les régions géographiques de naissance de 65 patients

	France	Maghreb	Afriq ouest	Afriq centre	Afrîq est	Europ est	Russie Ukrain	Géorgie	Asie centre	Asie est
N cas MDR-TB	13	5	10	8	1	6	2	14	5	1
EAI										1
CAS-DELHI									3	
Beijing	2	1	2	2		1	2	**14**	2	
West Afr										
Haarlem-X	4	1	1	1		1				
LAM	4	3		3		1				
L4/nt			1							
Ural-Tur				1	1	2				
S										
Cameroon						1				
Ghana	2		6	1						
Uganda	1									
H37Rv	1					1				
bovis										

Tableau 28. Répartition (en %) des souches MDR 2006-2018 selon les lignées phylogéniques et les régions géographiques de naissance des patients

	France	Maghreb	Afrique ouest	Afrique centre	Afrique est	Europe est	Russie Ukraine	Géorgie	Asie centre	Asie est
N cas MDR-TB	124	41	82	103	28	69	54	155	62	86
EAI	2				8					5
CAS-DELHI	<1				4			1		**17**
Beijing	21	11	9	27	4	22	**69**	**82**	**84**	**53**
West Afr	<1		2							
Haarlem-X	**18**	**30**	9	**18**	11	**19**	2	3		
LAM	**21**	**20**	5	**15**	4	6	16	10	8	1
L4/nt	**23**	**27**	**16**	**13**	10	**30**	6	3	4	19
Ural-Tur	3				**25**	14	7	1	4	1
S	2	12			8	8				4
Cameroon	<1		3	**9**	**22**	1		<1		
Ghana	4		56	9	4					
Uganda	2			1						
H37Rv	<1			7						
bovis	2			1						

3.8.4.2. Regroupement en clusters des souches MDR 2019 par l'approche MIRU

Le tableau ci-dessous présente le regroupement en **clusters de 72/75 souches MDR de 2019 sur la base du MIRU-VNTR 24 loci**. Ce tableau liste **32 clusters MIRU pour un total de 60 des 72 souches (83%) de 2019** partageant des codes MIRU-24 identiques entre elles et avec des souches de la période 2006-2018. Ces 32 clusters concernent surtout des lignées Beijing (7 groupes pour 26 souches de 2019), Haarlem (6 groupes pour 7 souches de 2019) et LAM (7 groupes pour 12 souches de 2019). Les autres clusters sont rattachés aux lignées Ghana, URAL, Delhi/CAS, TUR, Ugandal, Cameroon, H37Rv-like et L4(T).

Tableau 29. Regroupements en clusters par approches MIRU et WGS des souches de *M. tuberculosis* MDR/XDR reçues au CNR-MyRMA en 2019

Famille	Cluster MIRU (code MTBC 15-9)	N souches reçues en 2019	Phénotype	N souches 2006-2018 reliés aux souches 2019	Numéro des clusters WGS identifiés	N souches 2019 (N 2006-2019)	N SNPs souches 2019 (souches 2006-2019)
Beijing	100-32	15	**XDR** (4)	82	Nr 2	2 (6)	12 (2 à 12)
			MDR (11)		Nr 4	1 (2)	(1)
	94-32	4	**XDR** (2)	78			
			MDR (2)				
	?-32*	1	MDR	1	Nr 12	1 (2)	(9)
	1066-32	1	**XDR**	10	Nr 3	1 (2)	(10)
	10315-32	1	MDR	2			
	900-32	2	MDR	0			
	19006-32	2	MDR	0			
Ghana	11550-25	2	MDR	0			
	67-25	1	MDR	24			
	11464-25	1	MDR	2			
	11437-25	1	MDR	2			
Haarlem	190-31	1	MDR	8	Nr 7	1 (10)	(0 à 11)
	5322-15	2	MDR	1	Nr 6	2	0
	6550-69	1	MDR	2			
	?-15	1	MDR	1			
	?-31	1	MDR	6			
	7389-15	1	MDR	1			
LAM	384-54	1	MDR	5			
	16296-54	3	MDR	9	Nr 5	3 (5)	3 (0 à 3)
	300-53	3	MDR	7	Nr 10	2 (2 en 2020)	1 (<3)
	255-56	1	MDR	1			
	?-51	2	MDR	0	Nr 1	2	0
	10965-85	1	MDR	1			
	11422-62	1	MDR	2			
URAL	163-15	1	**XDR**	9	Nr 9	2 (6)	22 (11-40)
		1	MDR				
Delhi/CAS	1473-32	1	MDR	5	Nr 11	1 (2)	(3)
	1220-15	1	MDR	1			
TUR	11329-15	2	MDR	2	Nr 8	2 (3)	14 (9)
Ugandal	11062-15	1	MDR	4			
Cameroon	644-15	1	**XDR**	1			
H37Rv-like	11230-15	1	MDR	4	Nr 13	1 (2)	(3-9)
L4(T)	?-15	1	MDR	4			

** ?= pas de code de référence dans la base de données MIRU*

3.8.4.3. Analyse détaillée des clusters identifiés par Whole Genome Sequencing pour les souches MDR 2019 préalablement analysées par l'approche MIRU

La technique **MIRU 24 loci n'étant pas assez discriminante pour certaines lignées (en particulier pour la lignée Beijing)**, le regroupement de souches en « clusters MIRU » au sein des lignées doit être analysé avec prudence avant de conclure à un lien bactériologique, et bien sûr davantage encore à un lien épidémiologique.
Chaque cluster MIRU a donc été analysé plus avant en tenant compte des comparaisons des génomes complets (WGS) disponibles pour la majorité des souches de 2019 (63/72), ainsi que de marqueurs complémantaires **:** (a) caractéristiques des souches (**phénotype et génotype de résistance**), (b) caractéristiques des patients (**pays de naissance, ville** où le diagnostic a été fait**, liens familiaux)**, (c) résultat du **typage complémentaire des souches Beijing par l'analyse de 4 loci supplémentaires dits « hypervariables »** (technique mise en place en 2015).

Les conclusions de cette analyse sont données ci-après (seuls les clusters d'intérêt sont détaillés) :

Lignée Beijing

Cluster WGS Nr 2 (100-32):
- 1 souche MDR de 2019 d'un patient (n°1) né en Georgie, proche par WGS (<12 SNP) de la souche N°2-**XDR** isolée en 2019 d'un autre patient géorgien. L'analyse WGS (figure ci-dessous) indique qu'il n'y a pas eu transmission directe d'une même souche entre ces 2 patients. En revanche, le dendrogramme WGS montre que 4 autres patients, tous nés en Géorgie, présentent des distances en SNP en faveur d'une chaine de transmission (de 2 à 5 SNPs). Les 6 souches partagent le même phénotype et génotype de résistance (à l'exception des souches XDR qui ont acquis une mutation additionelle D94G dans GyrA). **Ces résultats suggèrent une chaine de transmission entre ces 6 patients mais il est probable que cette transmission n'ait pas eu lieu en France.** Une enquête épidémiologique est en cours.

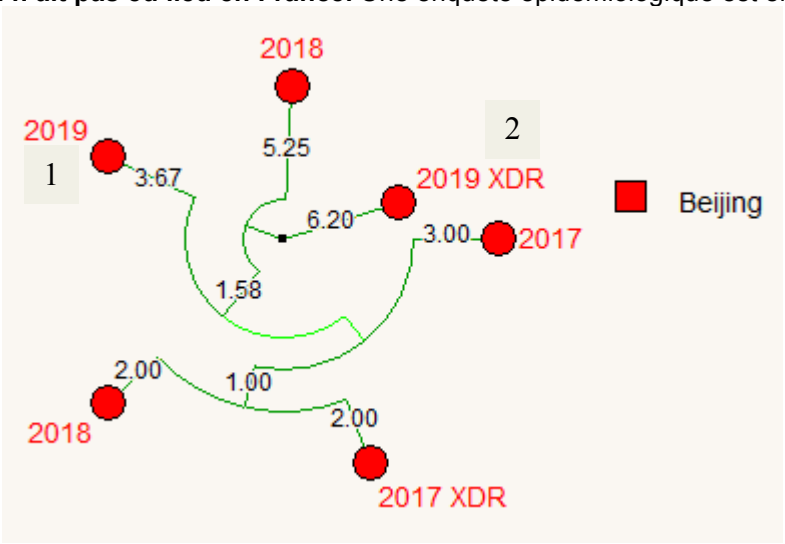


Figure 13. Dendrogramme circulaire obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M.tuberculosis* (méthode UPGMA) pour le cluster Nr 2 des souches Beijing 100-32. Le nombre de SNP identifiés entre les groupes de souches reliées est indiqué sur les branches.

Cluster Nr 3 (1066-32)
1 souche **XDR** de 2019 d'un patient Géorgien (A) et 1 souche MDR isolée en 2017 d'un autre patient Géorgien (B), **indistingables par MIRU complémentaire et par génotype de résistance. Ces résultats suggèrent une transmission croisée entre ces 2 patients** mais en raison de la chronologie **cette transmission n'a pas pu avoir lieu en France**. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse WGS qui montre 10 SNP de différence entre les 2 génomes, une distance trop grande pour qu'il y ait eu transmission directe entre les 2 patients.

Cluster Nr 4 (100-32)
- 1 souche MDR de 2019 d'un patient (C) né en France identique à une souche de 2018 d'un patient (D) né au Congo. Les 2 souches ont le même MIRU-VNTR et le même génotype de résistance. Les génomes complets des 2 souches ne montrent qu'une seule différence. **Une transmission a eu lieu entre ces 2 patients appartenant à la même famille** (Tante/neuveu).

Cluster Nr 12 (?-32)
1 souches MDR isolé en 2019 d'un patient né au Congo, **proche** par génotype de résistance (1 différence dans PncA) et par analyse WGS (9 SNP). Ces résultats ne sont pas en faveur d'une transmission directe entre ces 2 patients. Une enquête épidémiologique est en cours.

Lignée LAM
Cluster WGS Nr 1 (?-51)
2 souches (E et F) de 2019 (patients nés au Mali et au Maroc) dont les génomes complets sont parfaitement identiques. **Une transmission de la même souche entre ces 2 patients est donc très probable**. Une enquête épidémiologique est en cours.

Cluster WGS Nr 5 (16296-54)
3 souches de 2019, 31822, 10144 et 6224, ont des génomes qui ont ≤ 3 différences l'un par rapport à l'autre (voir figure). Le génome de 31822 est identique à celui de 08050 étudié en 2018. Ces 2 souches sont également reliées par un nombre très faible de SNPs à 46746 isolée en 2020. Tous les patients sont nés en France. Les premiers éléments de l'enquête épidémiologique confirment l'hypothèse d'une **transmission entre ces patients** qui vivent dans un même immeuble.

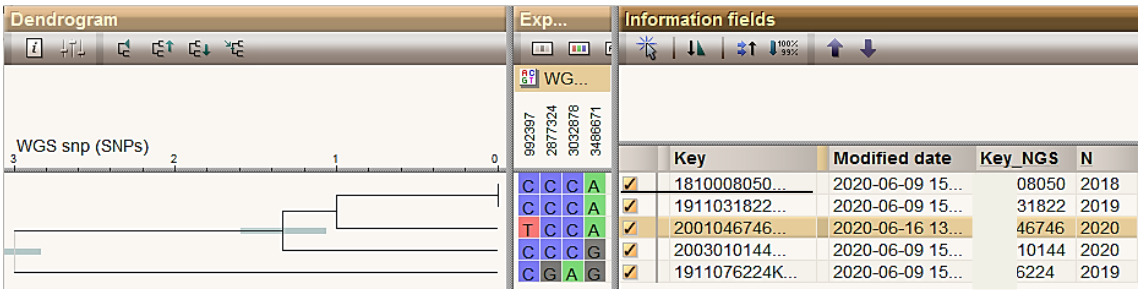


Figure 14. Dendrogramme pour le cluster Nr 5 des souches LAM 16296-54.

Cluster Nr 10 (300-53)
3 souches de 2019 (2 patients nés en France, 1 en Algérie) ont un code MIRU indistinguable. Une analyse WGS a été réalisée pour **2 (58648 et 69203) des 3 souches de 2019** (1 génome en cours), ainsi que pour **2 souches de 2020 (60859 et 60851)**. Les résultats montrent que les 2 souches de 2019 diffèrent par seulement 1 SNP, ce qui est en faveur d'une transmission. **Un lien épidémiologique a été mis en évidence entre ces patients ayant partagé la même habitation**. L'analyse des 2 génomes déterminés en 2020 montre que la souche **60859 est identique à 58648** (patient né en France), et très proche de 60851 (patient né en Algérie). **Une enquête épidémiologique est en cours** (contexte familial et de voisinage)

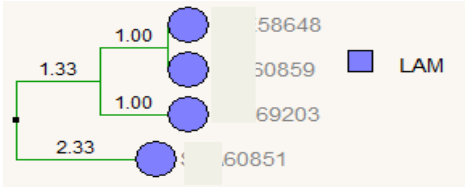


Figure 15. Analyse WGS du cluster 10

Lignée Haarlem

Cluster Nr 6 (5322-15)
2 souches de 2019 (G et H, patients nés en France) avec un code MIRU et un génotype de résistance **indistinguables**. L'analyse **WGS n'a détecté aucun SNP** entre les souches, en adéquation avec les marqueurs ci-dessus. **L'enquête épidémiologique a identifié un lien familial** entre les 2 patients.

Cluster Nr 7 (190-31)
1 souches de 2019 (75232) a un code MIRU et un génotype de résistance **indistinguables** de 9 souches isolées entre 2015 et 2018. Toutes proviennent de patients originaires de Papeete (Polynésie). Par **WGS**, 8 souches isolées entre 2015 et 2018 se différencient par seulement **≤2 SNP**, ce qui suggère un lien très probable entre ces souches. **La souche de 2019 (**75232**) et 1 souche de 2017 (13689) ont 5 SNP de différence entre elles** et 11 SNP avec le groupe précédent, ce qui suggère que des patients n'ont pas encore été détectés dans la chaine de transmission et que les 2 patients 75232 et 13689 ont été infectés bien avant les 8 autres. Une enquête épidémiologique est en cours.

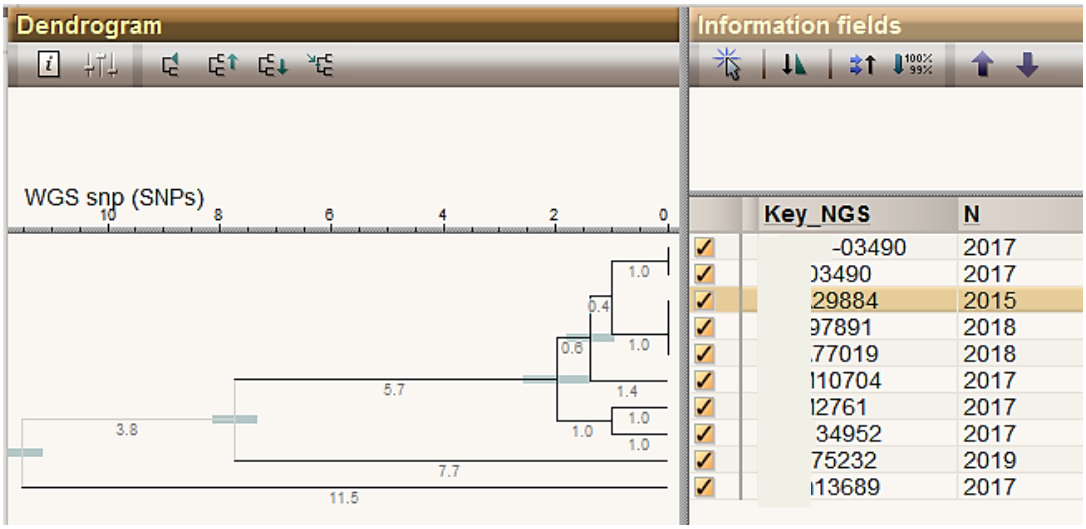


Figure 16. Dendrogramme obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M.tuberculosis* (méthode UPGMA) pour le cluster des souches Haarlem 190-31

Lignée TUR

Cluster Nr 8 (11329-15)

Deux patients de 2019 (I et J, nés en Somalie) distants de 14 SNPs, reliés à une souche d'un patient de 2018 (K) avec une distance de 9 SNP. Ces distances ne sont pas en faveur d'une transmission directe entre ces patients. On note toutefois que **l'enquête épidémiologique indique un contexte familial.**

Lignée URAL

Cluster Nr 9 (163-15)

2 souches de 2019 isolées de 2 patients nés en Moldavie, 1 **MDR** (6822) et 1 **XDR** (7064) ont un code MIRU indistingable de 4 souches isolées entre 2012 et 2017 de patients essentiellement originaires de Moldavie, Lituanie et Ukraine. Le lien possible entre ces patients est infirmé par l'analyse WGS qui montre que les 6 souches forment un cluster avec >11 SNP de différence entre les souches. **La distance WGS entre la souche XDR (**7064**) et la souche MDR (**6822**) de 2019 est de 22 SNP, ce qui exclut une transmission directe entre les 2 patients, contrairement à ce que suggérait l'analyse MIRU.**

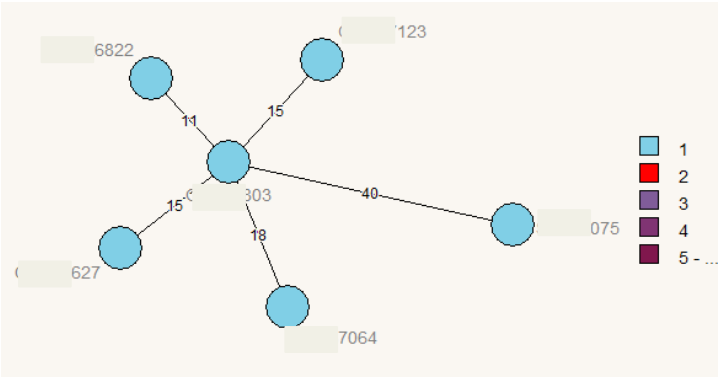


Figure 17. Minimum spanning tree des 6 souches URAL du cluster 163-15

Lignée Delhi/CAS

Cluster Nr 11 (1473-32)

1 souche (K) isolée en 2019 d'un patient né au Pakistan, présentant 3 SNP de différence avec 1 souche (L) isolée en 2017, également originaire du Pakistan. **Une transmission directe est probable.** Une enquête épidémiologique a été déclenchée.

Lignée H37Rv-like

Cluster Nr 13 (11230-15)
1 souche de 2019 (M, patient né en France) a un code MIRU et un génotype de résistance indistinguables de 2 souches isolées en 2017-2018 de 2 patients nés en Roumanie et en Bulgarie. La souche de 2019 est reliée par 9 SNP par analyse WGS aux 2 autres souches qui sont elles distantes de 3 SNP, ce qui **n'est pas en faveur d'une transmission directe pour le patient né en France**. L'enquête épidémiologique est en cours.

Souches en « cluster MIRU » non reliees au décours de l'analyse WGS

En 2019, l'analyse WGS a permis d'écarter un lien bactériologique et épidémiologique pour 46/60 souches qui étaient à priori regroupées en clusters par le marqueur MIRU. L'intérêt du WGS est particulièrement évident pour les souches Beijing qui sont difficilement différenciables par MIRU-VNTR. Par exemple, parmi les 15 souches Beijing d'haplotype 100-32, **seule 1 souche de 2019 était indiscutablement reliée** à une souche isolée en 2018. Les 4 souches XDR 100-32 ne montraient pas de liens avec les autres souches Beijing 100-32 de notre database. L'analyse WGS a également montré **l'absence de liens pour les 9/10 souches XDR analysées par cette approche**. Globalement, l'approche WGS a considérablement clarifié la situation épidémiologique des souches MDR en 2019, en réduisant le nombre de souches potentiellement reliées de 60 (32 clusters) par MIRU à 14 (8 clusters) par WGS.

Souches difficilement analysables par WGS, mais analysées par MIRU

Le génome complet n'a pas pu être déterminé pour 9 souches isolées en 2019 (défaut de croissance des souches ou qualité insuffisante des ADN extraits). Une série d'extraction/séquençage NGS a été relancée pour ces souches. Dans l'attente des résultats, nous avons réalisé une comparaison des codes MIRU-VNTR, complétée par l'analyse des caractéristiques phénotypiques et génotypiques de résistance, des caractéristiques des patients (pays de naissance, ville où le diagnostic a été fait, liens familiaux), et des résultats du typage complémentaire des souches Beijing par l'analyse de 4 loci supplémentaires dits « hypervariables » (technique mise en place en 2015).

Lignée Beijing

Cluster 100-32
2 souches MDR et 1 souche XDR de 2019 de patients nés en Georgie (MDR et XDR) et en Ukraine (MDR). Les 2 souches MDR sont **indistinguables** entre elles par MIRU-VNTR et MIRU hypervariable complémentaire. La souche XDR présente 2 variations au niveau du MIRU hypervariable. Les génotypes de résistance des 3 souches sont **distinguables** entre eux, ce qui n'est pas en faveur d'une transmission croisée. **L'analyse WGS est indispensable pour conclure à l'absence de transmission directe entre ces 3 patients**.

Lignée Uganda

Cluster 11062-15
1 souches de 2019 (patient né en France) présente le même code MIRU et la totalité des marqueurs génotypiques de résistance avec 2 souches de 2018, suggèrant une transmission croisée entre les 3 patients. Ces 3 souches sont aussi reliées à 2 souches de 2014 (patients originaires de Chine et de Roumanie) qui sont toutefois distinguables par l'absence de la mutation EmbB-S297A présentes dans les souches de 2018. **L'enquête épidémiologique est en cours**.

Lignée LAM

- 1 souche de 2019 (N, patient né en France) avec un code MIRU (haplotype 300-53) identique à celui de 2 souches isolées en 2019 (**O, P**) et de 7 souches isolées entre 2012 et 2018. L'enquête épidémiologique en cours a déjà montré que des transmissions ont pu avoir lieu entre ces patients. Le séquençage NGS des souches O et P a clairement montré que les 2 souches de 2019 diffèrent par seulement 1 SNP, ce qui est en faveur d'une transmission. **L'enquête épidémiologique se poursuit, avec 2 patients supplémentaires identifiés en 2020** (voir plus haut le paragraphe WGS du Cluster Nr 10 (300-53).

- 1 souche de 2019 (Q, patient né en Guinée) ayant un code MIRU (haplotype ?-15) très proche de 2 souches MDR isolées en 2010 et 2015 à partir de 2 patients également nés en Guinée (R et S). Leurs génotypes de résistance sont identiques. **Une enquête épidémiologique est en cours**.

- 1 souche de 2019 (**T**, patient né au Mali) présentant le même code MIRU (haplotype 10965-85) qu'une souche MDR isolée en 2015 à partir d'un patient né en France (U). Leurs génotypes de résistance sont différents, ce qui n'est pas en faveur d'un lien direct entre les 2 patients.

Souches non reliées
Les 2 autres souches non analysées par WGS (1473-32 et xx?-25), ne sont reliées à aucune autre souche (distingables par MIRU-VNTR, MIRU complémentaire, génotype de résistance, absence de lien épidémiologique).

Conclusions concernant le typage WGS des souches MDR

L'année 2019 a permis de confirmer la puissance du séquençage complet pour le typage moléculaire. Pour un coût et des délais d'obtention des résultats inférieurs à 15 jours (compétitifs par rapport à ceux de l'approche PCR-Sanger), **le WGS est supérieur à la méthode MIRU-VNTR pour l'identification de clusters, en particulier au sein de la famille Beijing,** et pour identifier des potentielles chaines de transmission sur des périodes longues. Cependant l'approche WGS se heurte parfois à de grosses difficultés d'extraction d'ADN pour certaines souches MDR qui peuvent néanmoins analysées par approche MIRU.

3.8.4.5. Tendances évolutives 2006-2019

Le Tableau ci-dessous résume **les grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement** parmi les **souches de *M. tuberculosis* multirésistantes (MDR)** reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2019, identifiées par génotypage systématique.

Tableau 30. Résumé des analyses de grappes des cas de tuberculose MDR – 2006-2019

Année	N	Cas reliés* (contexte, pays de naissance)	Lignée
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)	n.d.
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal)	LAM
		1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)	n.d.
2008	51	1 épisode de 3 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
2009	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)	Ghana
2010	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)**	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Tibet)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, Viêt-Nam)	Beijing
2011	67	1 épisode de 3 cas (famille, Arménie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (malade vers soignant, France)	Cas-Delhi
		1 épisode de 3 cas (famille, Algérie)	nt
		1 épisode de 2 cas possible (famille, Roumanie)	URAL
		1 épisode de 2 cas possibles (contact occasionnel, France)	LAM
2012	92	1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas (famille, France)	nt
		1 épisode de 2 cas (famille, Géorgie)	LAM
		1 épisode de 4 cas (famille Congo et université française)***	LAM
		1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)**	Nt
2013	83	1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas (famille, Géorgie) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas (famille, Guinée) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas (foyer, Arménie) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR (lieu de travail, France) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas (lieu de travail, Algérie) $	S
		1 épisode de 1 cas (famille, Sénégal) $	nt
		1 épisode de 1 cas (communautaire, RDC)*** $	LAM
2014	111	1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (Hôpital, Géorgie et France)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Russie)	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, Thaïlande et France)	EAI
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, France)	LAM
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Arménie)	URAL
		1 épisode de 2 cas MDR (désocialisation, France et Maroc)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (lien imprécis, Roumanie et Chine)	nt

		1 épisode de 2 cas MDR (famille, Roumanie)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)**	nt
2015	98	1 épisode de 2 cas MDR (Foyer, France et Pologne) $	LAM
		1 épisode de 6 cas MDR (famille, France)	LAM
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, RDC) $	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (famille et communauté, RDC)*** $	LAM
		1 épisode de 3 cas MDR (famille, travail, Maroc et France)	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (famille, France et Algérie) $	Haarlem
		1 épisode de 3 cas MDR (famille, Allemagne, France)	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (communautaire, Corse)** $	nt
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, communautaire, Brésil-Portugal) $	X
2016	70	1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Mongolie) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (lieu de travail, France et Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (communautaire, France et Ukraine) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Tibet) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR (hôpital, France et Russie) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (amis, France)	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Maroc) $	LAM
		1 épisode de 1 cas XDR (enquête en cours, France, Portugal et Afrique) $	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Polynésie) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (voisins, France et Portugal) $	X
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Sénégal) $	Ghana
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Soudan et Somalie)	Cameroon
		1 épisode de 1 cas MDR (famille, Albanie) $	Uganda
2017	**78**	1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, France et Géorgie) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (lieu de travail, France) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, France et Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Algérie) $	LAM
		1 épisode de 4 cas MDR (enquête en cours, famille, France (Polynésie Française)) $	Haarlem
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, famille, France) $	
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Soudan) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (famille, Cameroun) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Soudan) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) $	Cameroon
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) $	Ural
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Pakistan) $	S
		1 épisode de 1 cas MDR (pas de transmission en France, Congo) $	Delhi/CAS
2018	**82**	1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Georgie) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas XDR (famille, Georgie) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR (famille, France) $	Beijing
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Côte d'Ivoire) $	Ghana
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, famille, France (Polynésie Française) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Sénégal) $	Haarlem
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours,Foyer, France) $	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, France) $	LAM
		1 épisode de 2 cas XDR/MDR (enquête en cours, Georgie) $	URAL
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Moldavie, Ukraine) $	S
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, France) $	Ugandal
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Soudan) $	Cameroon
2019	**72**	1 épisode de 1 cas MDR (famille, France-Congo) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, famille, France (Polynésie Française) $	Haarlem
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, France) $	Haarlem
		1 épisode de 3 cas MDR (voisinage, France) $	LAM
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, France, Algérie) $	LAM
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Mali, Maroc) $	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Pakistan) $	Delhi/CAS
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, France) $	TUR

* sur la base des analyses du génome par différentes méthodes : RFLP, MIRU 24 loci, mutations conférant la résistance, WGS).
** appartiennent à un même cluster de 13 cas (famille et milieu de travail clos et étroit en Corse) étalés sur 8 ans.
*** appartiennent au même cluster de 6 cas (famille et communautaire) étalés sur 4 ans.
$ cas lié(s) avec un/des cas des années précédentes

Le nombre de grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement a évolué de 1 à 2/an en 2006-2009 à 5 en 2010-12, 7 en 2013, pour atteindre 13 en 2018 puis redescendre à 8 en 2019. L'augmentation initiale du nombre de grappes est due (a) à l'augmentation du nombre de cas MDR et (b) à l'accumulation des données sur plusieurs années qui permet l'identification de clusters s'étendant sur plusieurs années. Pour de nombreuses grappes de 2016, 2017 et 2018 le CNR-MyrRMA n'a pas eu de retour ocncernant les enquêtes de terrain menées par les autorités sanitaires.

Les lignées dominantes impliquées dans les grappes de cas MDR reliés restent en 2019 Beijing, LAM, et Haarlem. Les autres lignées (URAL, Ghana, Dehli/CAS, EIA, S, X, Uganda, Cameroon) sont rares.

4. Alertes

4.1. Tuberculose

Le CNR-MyRMA a alerté les autorités sanitaires pour les groupes de cas pour lesquels les études de génotypage (empreintes digitales génomiques) avaient permis de conclure à des liens bactériologiques (**cf. section 3 « Surveillance »**) :

- **31 épisodes de cas sensibles groupés de tuberculose** (total 80 cas)
- **13 épisodes de cas MDR groupés** de tuberculose (total 39 cas) lesquels

Ces épisodes ont fait l'objet de **multiples échanges téléphoniques et de courriers, notamment avec les CLAT correspondants.**

4.2. Mycobactérioses

4.2.1. Alerte européenne (ECDC) concernant les infections post-circulation extra-corporelle (CEC) à *M. chimaera*

Après diffusion nationale de l'alerte aux chirurgiens cardiaques, cardiologues, infectiologues et laboratoires de mycobactériologie en 2015, une enquête rétrospective avait permis d'identifier en France 2 cas confirmés d' infection post-CEC à *M. chimaera*.
Les souches des 2 cas avaient été comparées en 2016 au CNR-MyRMA par REP-PCR (profils similaires) et envoyées au CNR des mycobactéries d'Allemagne (Borstel) pour comparaison aux autres souches européennes (génome entiers quasi-identiques à celui de la souche type de l'épidémie, celle du 1er cas suisse « Zurich1 »).

L'étude par WGS des souches françaises (cas et environnement) a été menée au CNR-MyRMA en 2018 et poursuivie en 2019 (cf. section WGS). **Au total nous avons comparé à la souche type Zurich1, les génomes de 74 souches de *M. chimaera*** dont 3 souches isolées des 2 cas (un patient a fait une rechute avant son décès et deux souches distinctes ont été isolées), 36 souches isolées de l'eau des générateurs thermiques (GT) pour CEC prélevés lors de l'enquête avec Santé publique France faite en 2017-2018 et 35 souches non reliées à l'épidémie.
L'étude WGS a montré que les deux cas étaient liés à l'épidémie mondiale et que les souches isolées des générateurs thermiques (GT) dans divers établissements français, et en particulier celui où a été opéré l'un des deux cas d'infection, étaient liées à l'épidémie pour 72% (26/36) d'entre elles.
La découverte de *M. chimaera* dans l'usine de fabrication des générateurs thermiques (GT) pour CEC en Allemagne, explique la proximité génétique des souches isolées des patients et des GT, et constitue la preuve d'une source commune. Malgré cela, les GT peuvent contenir plusieurs souches de *M. chimaera*. dont certaines sont des contaminants naturels de l'eau utilisée dans chaque hôpital. Par conséquent il est logique que le profil de ces souches soit différent de la souche épidémique allemande. La figure ci-dessous représente l'étude UMPGA des 74 souches (en A vue générale des souches sur la base de 55 638 SNPs générés par les comparaisons et du groupe 1 correspondant aux souches de l'épidémie, en B détail du groupe 1 par rapport à la souche type de l'épidémie Zurich1 sur la base de 694 SNPs).

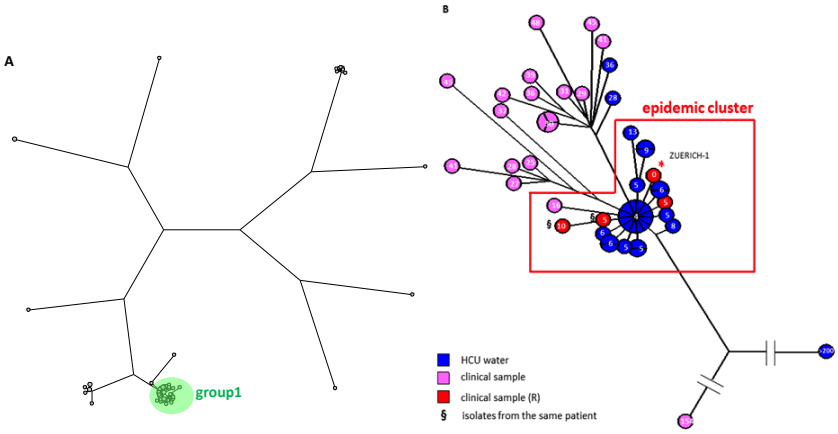


Figure 18. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 74 souches de *Mycobacterium chimaera*

Ces résultats ont été présentés à l'ECCMID en 2019 (E. Lecorche, C. Daniau, S. Kumanski, F. Mougari H. Benmansour, A. Carbonne, E. Cambau on the behalf of CNR-MyRMA . Characterization of Mycobacterium chimaera isolates from cardiologic patients with post-surgical infections and from heater–cooler units in France. 29th ECCMID, Abstract No: 6063, Environmental disinfection session) et sont en cours de publication.

Comme les industriels des GT ont recommandé une désinfection du circuit des appareils, un changement régulier de l'eau et la recherche de mycobactéries dans l'eau de ces circuits, **le CNR-MyRMA a participé à une enquête nationale avec SPF en 2017-2018 dont les résultats ont été publiés en 2019 (**Daniau C, Lecorche E, Mougari F, Fournier S, Richomme X, Bernet C, Lebreton G, Bosq E, Jehanno AC, Kassis-Chikhani N, Lucet JC, Cambau E, Berger-Carbonne A. Infections invasives à *Mycobacterium chimaera* en chirurgie cardiaque et évaluation des pratiques autour des matériels de circulation extracorporelle. Hygiènes 2019;27(6):351-359. DOI : 10.25329/hy_xxvii_6-1)
De plus, plusieurs réunions de travail ont eu lieu encore en 2019 dont une présentation au Ministère de la Santé en collaboration avec SPF.

4.2.2. Infections à mycobactérie non tuberculeuse reliées à un signalement e.sin en 2019

En 2019, nous avons répondu à deux épidémies, l'une due à *M. mucogenicum* et l'autre à *M. chelonae.*

Dans le cadre de la déclaration d'infection associée aux soins à *M. mucogenicum*, il s'agissait de 4 cas d'infections chez des patients hospitalisés dans un même hôpital pour lesquels nous avons reçu 3 souches isolées d'hémocultures. L'enquête environnementale avait retrouvé la même bactérie dans plusieurs points d'eaux dont 4 nous ont été transmis. Nous avons donc comparé par WGS les 3 souches cliniques, 4 souches environnementales et 3 souches témoins ; **soit 10 souches au total**.
Comme il s'agissait d'une espèce de mycobactérie que nous n'avions pas encore étudié sur le plan génomique, nous avons pris aussi des souches non liées et des génomes publiés (NZ_POTL01000001.1 et SRX5287783). Les données de séquençage ont été alignées sur le génome de la souche de référence DSM 44124. La profondeur moyenne a été de 32 X.
Cela a permis de calculer le nombre de polymorphisme (SNP), c'est-à-dire le nombre de différence entre les souches. Les SNPs sont retenus selon les critères suivants : une couverture minimale de 5X, avec au moins une « read forward » et une « read reverse » sur toutes les souches, et une distance minimale entre les SNPs retenus de 12 paires de bases. La comparaison des 10 souches a généré 57 434 SNPs.

Ceci a montré que les souches non liées étaient bien en dehors d'un cluster de 7 souches, dont 3 souches isolées chez les patients et les 4 souches isolées de l'eau, qui ne se différenciaient que par 0 à 7 SNPs.

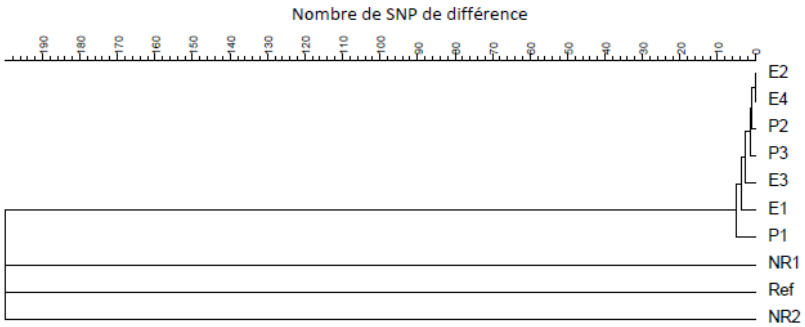


Figure 19. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 10 souches de *Mycobacterium mucogenicum*

Pour l'épidémie d'infection à *M. chelonae*, Il s'agissait d'un patient présentant une infection cutanée à *M. chelonae* dans la semaine qui a suivi une injection de mésothérapie en février 2019 (**souche P**). L'enquête épidémiologique a retrouvé d'autres cas suspects et des prélèvements environnementaux ont été faits au cabinet de mésothérapie et chez le patient. L'enquête environnementale a retrouvé la même bactérie dans plusieurs points d'eaux (**5 souches environnementales isolées**). Nous avons ajouté **3 souches témoins (**R1, R2, NR) dont 2 étaient des souches connues, R1 et R2, pour être liés à un même évènement épidémiologique et étudiées précédemment au CNR.
Les données de séquençage ont été alignées sur le génome de la souche de référence ATCC 35752. La profondeur moyenne était de 48 X.
Les résultats de la **comparaison des 10 souches analysées** sont présentés ci-dessous par méthode UMPGA en se basant sur les 67 849 SNPs trouvés.

Notre conclusion a été que les souches isolées du patient (P) et des eaux (E1 E5) n'étaient pas liées entre elles avec plus de 1000 SNPs de différence, comme avec la souches de référence (Ref) et une souche non reliée (NR).

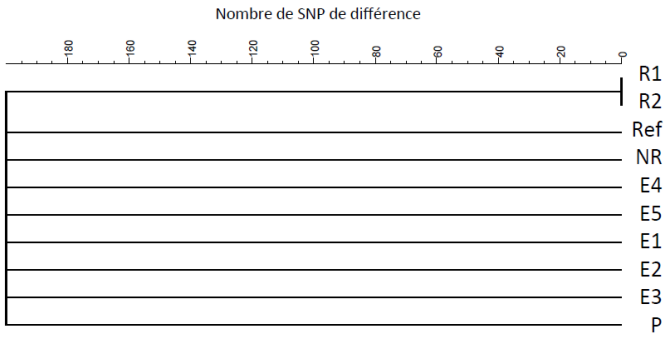


Figure 20. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 10 souches de *Mycobacterium chelonae*

4.2.3. Recensement retrospectif 2012-19 des cas d'infections à mycobactéries non tuberculeuses associées aux soins

En 2019, nous avons poursuivi l'étude rétrospective systématique des cas d'infections à MNT associées aux soins, avec SPF (Drs Anne Carbonne et Come Daniau). Nous avons confronté les signalements e-sin reçus à SPF et les cas rapportés au CNR-MyRMA et ayant fait l'objet d'envoi de souches entre 2012 et 2018. Cette analyse est encore en cours et sera présentée en 2020 en y incluant les cas de 2019.

4.2.4 Alerte concernant des cas d'infection respiratoire à MNT dans un bâtiment public

le CNR a été alerté suite au diagnostic d'infection respiratoire à mycobactéries (*Mycobacterium abscessus*) chez deux membres du personnel d'une Agence de l'Etat. **Le CNR en a informé SPF** et a entrepris plusieurs types d'**investigations menées avec la direction de l'Agence** :

1. Cartographier le système de ventilation des locaux
2. Rechercher d'autres cas possibles par l'intermédiaire des médecins du travail
3. Prélever les gaines de ventilation et les points d'eau critiques pour rechercher des mycobactéries et mesurer la charge microbienne totale

Au total, 195 prélèvements environnementaux ont été faits dans le bâtiment, et analysés au laboratoire associé du CNR-MyRMA (Hôpital Lariboisière) pour la recherche de mycobactéries .

Les recherches de mycobactéries ont été faites par culture sur milieu spécifique (Middlebrook 7H10, Coletsos) et par amplification génique (PCR) spécifique de toutes les mycobactéries (gène *atpE*) et spécifique de *M. abscesssus* (*erm41*). Pour les prélèvements d'eau, les cultures ont été faites après filtration et/ou après centrifugation.

Les investigations n'ont pas montré la présence de la même espèce de mycobactérie que celle isolée chez le cas (*M. abscessus*) mais ont montré la présence d'autres mycobactéries non tuberculeuses dans l'eau à proximité du bureau et dans d'autres points du bâtiment.
Ceci ne peut constituer une relation causale mais peut indiquer que la présence de mycobactérie a pu être possible dans les mois précédents les prélèvements. En effet, il faut rappeler que l'incident de ventilation potentiellement causal a eu lieu l'année précédente, soit 16 mois avant les prélèvements.
La forte charge microbienne trouvée dans divers points du système de ventilation a montré qu'il fallait nettoyer l'ensemble du système. Ceci a été réalisé en août 2019.
Il est possible qu'une 2ème personne ait pu être soumise à la même contamination environnementale, mais ceci n'a pas été prouvé.

Le CNR- MyRMA a recommandé d'être vigilant:
- sur la maintenance des circuits d'eaux, des fontaines à boisson, des circuits de ventilation car il s'est avéré que ces circuits étaient largement contaminés avec des microbes communs (flore totale élevée et certains points positifs à mycobactéries) pour un grand nombre d'entre eux.
- sur le suivi du personnel, car les infections à mycobactéries peuvent survenir plusieurs mois voire années après l'épisode contaminant. Il est souhaitable de renouveler l'alerte en cas de suspicion d'un nouveau cas.

5. Activités de rétro-information, formation et conseil

5.1 Formations, informations et conseils destinés aux professionnels de santé

5..1. Site internet

Le site **http://cnrmyctb.free.fr** créé en 2006 est régulièrement mis à jour et contient :

- fiche d'information téléchargeable à fournir au CNR-MyRMA pour accompagner les demandes d'expertise bactériologique (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage…),
- fiches des enquêtes annuelles sur la tuberculose multirésistante et la méningite tuberculeuse qui peuvent être, soit remplies directement en ligne sur le site, soit imprimées puis remplies manuellement et envoyées,
- résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- publications du CNR-MyRMA,
- mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA, qui précisent les techniques disponibles au CNR-MyRMA
- mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.
- Techniques de mycobactériologie rédigé par le Groupe AZAY-mycobactéries est accessible via le site.

5.1.2. Accueil de stagiaires en 2019

Laboratoire de la Pitié-Salpêtrière

Sheila CHIESI. Chercheur invité (thèse de médecine de l'Université de Vérone, Italie), sujet : Are large French cities at higher risk for tuberculosis drug resistance? A retrospective study (1998-2017) on data from the Azay-Mycobacteria network.

Laboratoire Lariboisière

- Maria SONDERMOLLE, interne en maladies infectieuses, Copenhagen, Danemark : étude des mécanismes de résistance à l'amikacine chez *M. abscessus*, 1 mois
- Fériel BOUZIANE, étudiante en Doctorat, Alger, Algerie : thèse sur la résistance de *M. tuberculosis*, 1 mois
- Hasmik MARGARYAN – Médecin biologiste d'Arménie : organisation d'un laboratoire de mycobactériologie et étude de la résistance chez les mycobactéries, 1 mois, prise en charge par l'ESCMID (observership)
- Maria Dolores Lorenzo NAVARRO, médecin infectiologue de Madrid : diagnostic de la lèpre, 1 semaine prise en charge par l'ESCMID (observership)

5.1.3. Missions en 2019

- Missions pour l'OMS, Programme de lutte contre la lèpre (E. Cambau) : réunions pendant le Congrès international de la lèpre à Manille (Philippines, septembre 2019) et une réunion téléphonique spécifique en novembre 2019.
- Mission DASS Nlle Calédonie (E. Cambau, V. Jarlier))

Enquête prospective sur le diagnostic et la surveillance de la lèpre sur l'ile de Belep, mai 2019

- Ambassade de France en Afrique du Sud et Aviesan ITMO 3MI (E. Cambau) : participation aux séminaires sur la tuberculose avec le South African Research Council – Pretoria 29 novembre et 2 décembre 2019

5.1.4. Activités de « conseil direct » aux biologistes et cliniciens (hors RCPs)

Environ 1200 contacts et conseils/an sont assurés directement par téléphone, **en sus des réunions de RCP décrites ci-dessous.** Ces conseils et contacts directs prennent place :

- lors de la réception des souches, afin (i) de s'assurer des critères justifiant la demande d'expertise, par exemple : bénéfice attendu du typage moléculaire (prise de décisions ?), réalité de l'infection à NTM et circonstances de survenue de l'infection (communautaire ou liée aux soins), (ii) d'identifier les correspondants microbiologistes et cliniciens du dossier, (iii) d'apprécier le degré d'urgence.
- lors du rendu des résultats des tests d'expertise afin de discuter avec les correspondants du traitement et d'éventuelles autres actions.

5.1.5. Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) du Groupe thérapeutique du CNR-MyRMA

Le **Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries de traitement difficile a été mis en place par le CNR-MyRMA en 2006. Une charte** régit le fonctionnement de ce groupe, dénomé **« TB-MNT-consilium France »,** qui organise des **Réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP)**. La liste des participants présents est établie lors de chaque RCP et une bibliographie à jour est mise à la disposition des participants.

Initialement centré sur les cas de tuberculose (TB-MDR ou autres TB de traitement difficile), le **CNR-MyRMA a mis en place en 2018 une RCP spécifiquement dédiée à la prise en charge des infections à mycobactéries non tuberculeuses, respiratoires et extra-respiratoires.** Une fiche de renseignements microbio-cliniques « MNT » a été élaborée pour réunir les informations données par le correspondant et nos échanges de réponses avec les résultats d'expertise **(cf annexe).**

Les activités du TB-NTM-consilium sont organisées :

- **au laboratoire coordinateur (Pitié-Salpêtrière) pour les RCP « tuberculose »,**
- **au laboratoire associé (Lariboisière) pour les RCP « infections à mycobactéries non tuberculeuses et lèpre ».**

Bilan 2019 tuberculose

Au total **298 dossiers ont été discutés** par le Groupe thérapeutique au cours des **14 sessions de 2019 pour 136 patients**, certains patients ayant fait l'objet de plusieurs présentations pour modification de traitement (**Tableau ci-dessous**). Selon leur complexité, les dossiers de ces cas ont été examinés lors de 1 à 7 réunions.

Distribution des 136 patients :

- 48 des 75 cas de tuberculose à (TB) bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2019
- 38 des 82 cas de tuberculose à (TB) bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2018
- 8 des 82 cas de TB à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2017
- 1 des 110 cas de TB à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2014
- 11 sujets contact de cas de TB MDR pour discussion de prophylaxie ou gestion de tuberculose maladie non documentée bactériologiquement (cas pédiatriques)
- 3 cas de TB de patients présents en France mais pour lesquels la souche avait été isolée à l'étranger (Allemagne, Espagne, Italie Russie) et n'était pas disponible. Pour ces cas, qui ne sont pas comptabilisés dans les 82 cas identifiés à partir des souches reçues au CNR, le RCP ne disposait que des résultats papiers émanant des laboratoires étrangers et des données cliniques.
- 27 cas de TB compliquée non MDR (5 cas d'aggravations paradoxales, 4 cas résistants à l'isoniazide, 6 cas monorésistants à la rifampicine et 12 de problèmes divers : toxicité, insuffisance rénale, etc)

En 2019, les participants réguliers aux RCP tuberculose étaient :

- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 3 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Damien Le Dû, Dhiba Marigot Outtandy),
- 1 pédiatre de l'hôpital Trousseau (Guillaume Thouvenin)
- 1 membre du SAMU social de Paris (Marie Wicky)
- 1 infectiologue de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Elise Klement)

- 1 spécialiste des dosages antibotiques de l'hôpital Saint-Joseph (Najoua el Helali)
- 1 spécialiste des réactions paradoxales (Anne Bourgarit)
- 1 membre du CLAT75 (Bénedicte Rivoire)

Bilan 2019 Mycobactérioses

10 réunions en 2019 pour 51 cas discutés d'infections respiratoires et extra respiratoires, indication de l'amikacine liposomale en ATU.

Bilan 2019 lèpre

7 réunions en 2019 pour 13 cas discutés : cas suspects avec clinique atypique (forme neurologique) ou de prise en charge difficile (mineurs, migrants en difficulté, cas signalés aux CIRE ou aux ARS).

Tendances évolutives 2006-2019 tuberculose

L'activité de conseil via les RCP, a considérablement augmenté après la phase initiale de rodage en 2006-07 : +50% de 2009 à 2011, x2 entre 2011 et 2012, +30% en 2013 et +53% 2018 puis stabilisation en 2019 (cf. tableau ci-dessous).

Tableau 31. Résumé des activités de conseil assurées par la RCP du CNR-MyrMA de 2006 à 2019

	N. RCP	N. dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (dont 1 femme enceinte)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (dont 1 enfant 18 mois) - 3 prophylaxies contacts MDR
2008	6	44	- 22 cas MDR 2008 - 19 cas MDR 2007 (suivi) - 3 prophylaxies contacts MDR
2009	8	46	- 20 cas MDR 2009 - 18 cas MDR 2008 (suivi) - 8 prophylaxies contacts MDR
2010	9	64	- 22 cas MDR 2010 - 33 cas MDR 2008-09 (suivi) - 7 cas tuberculose compliquées non MDR - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
2011	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2012	11	148	**Les 148 dossiers examinés correspondent à 83 patients :** - 48 cas MDR-XDR 2012 (dossiers examinés 1 à 5 fois) - 21 cas MDR 2011 (suivi) - 4 cas MDR 2010 (suivi) - 7 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculose compliquées non MDR
2013	14	193	**Les 193 dossiers examinés correspondent à 121 patients :** - 47 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 49 cas MDR 2012 - 2 cas MDR 2011 - 5 prophylaxies contacts MDR - 18 cas tuberculoses compliquées non MDR
2014	11	174	**Les 174 dossiers examinés correspondent à 113 patients :** - 54 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 27 cas MDR-XDR 2013 - 13 cas MDR-XDR 2012 - 3 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France - 6 prophylaxies contacts MDR - 7 cas tuberculoses compliquées non MDR - 3 cas de mycobactérioses
2015	11	160	**Les 160 dossiers examinés correspondent à 112 patients :** - 51 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 40 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 4 fois) - 3 cas MDR-XDR 2013

			- 10 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France - 4 prophylaxies contacts MDR - 3 cas tuberculoses compliquées non MDR - 1 cas de mycobactériose
2016	11	159	**Les 159 dossiers examinés correspondent à 121 patients :** - 41 cas MDR-XDR 2016 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 36 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 22 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 à 2 fois) - 3 cas MDR-XDR 2013 (dossiers examinés de 1 à 2 fois) - 2 cas pour lesquels il n'y a pas de souche disponible en France (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 9 prophylaxies contacts MDR - 7 cas tuberculoses compliquées non MDR
2017	11	167	**Les 167 dossiers examinés correspondent à 104 patients :** - 56 cas MDR-XDR 2018 (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 25 cas MDR-XDR 2016 (dossiers examinés 1 à 2 fois) - 6 cas MDR-XDR 2015 (dossiers examinés de 1 fois) - 1 cas MDR-XDR 2014 (dossiers examinés de 1 fois) - 1 cas pour lesquel il n'y a pas de souche disponible en France (dossiers examinés 1 à 4 fois) - 2 prophylaxies contacts MDR - 12 cas tuberculoses compliquées non MDR - 1 cas de mycobactériose
2018	18	294	**Les 294 dossiers examinés correspondent à 168 patients :** Il s'agissait de : - 31 des 82 cas MDR-XDR de 2018 - 42 des 82 cas MDR-XDR de 2017 - 68 des 71 cas MDR-XDR de 2016 - 51 des 98 cas MDR-XDR de 2015 - 10 cas présents en France avec documentation MDR à l'étranger - 38 sujets contact de cas MDR ou R-isoniazide - 24 cas de tuberculose compliquée non MDR - 30 cas d'infections respiratoires et extra-respiratoires à MNT
2019			**Les 298 dossiers examinés correspondent à 136 patients :** Il s'agissait de : - 48 des 75 cas MDR-XDR de 2019 - 38 des 82 cas MDR-XDR de 2018 - 9 cas MDR-XDR de 201' et 2017 - 3 cas présents en France avec documentation MDR à l'étranger - 11 sujets contact de cas MDR - 27 cas de tuberculose compliquée non MDR

Au total, que ce soit au travers des réunions plénières des RCP ou de contacts téléphoniques directs, les **4/5 des cas de tuberculose MDR-XDR identifiés en 2019 ont faits l'objet de conseils thérapeutiques par le CNR-MyRMA.**

En dehors de la RCP, l'équipe du CNR répond à **des demandes de conseils** concernant le diagnostic ou le traitement des infections mycobactériennes.

En 2019, 613 conseils ont été donnés :

- 30% pour traitement de mycobactériose
- 30% pour traitement de tuberculose compliquée
- 20% pour traitement de tuberculose MDR
- 15% pour problème diagnostique
- 4% pour conseil technique

5.2. Activités de conseils aux autorités sanitaires

5.2.1. Autorités nationales

Santé Publique France (SPF), Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) et DASS

1. Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Emmanuel Lecorche, et Jérôme Robert ont participé, avec SPF et le Ministère de la santé au suivi des signalements d'infections à M. chimaera liée à la CEC (réunions en février 2019)
2. Emmanuelle Cambau, Faiza Mougari, Emmanuel Lecorche, ont participé à des réunions de travail (janvier, juin, novembre 2019) avec SPF (Anne Carbonne, Come Daniau), sur la surveillance des infections liées aux soins à mycobactéries non tuberculeuses. Les résultats sont partiellement présentés dans la section Alertes, et sont en cours de publication.
3. Emmanuelle Cambau a été invitée par la DASS de Nouvelle Calédonie à participer à une enquête prospective sur le terrain sur le diagnostic et la surveillance de la lèpre dans l'ile de Belep où la lèpre est particulièrement prévalente. Le travail, débuté en avril 2018 par une mission assurée par Emmanuelle Cambau, s'est poursuivie par une mission sur le terrain **en mai 2019** assurée poar Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier
4. Vincent Jarlier a été auditionné le 9 mai 2019 par l'ANSM dans le cadre de la commission en charge d'élaborer la liste des micro-organismes, dont les mycobactéries qui doivent figurer sur la liste des MOT.

Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) et Haute Autorité de Santé (HAS)

1. J. Robert a participé en 2019 comme membre expert des Groupes de travail sur la saisine « Tuberculose à M.bovis » de la Direction Générale de la Santé
2. V. Jarlier a participé en 2019 comme membre expert des Groupes de travail sur la saisine « Diagnostic et prise en charge des infections tuberculeuses latentes » de la Direction Générale de la Santé
3. E. Cambau a participé fin 2019 aux premières réunions du groupe de travail sur une saisine concernant la lutte contre la lepre en France. Les réunions vont se poursuivre en 2020.

INSERM – AVIESAN (Alliance pour les sciences de la vie et de la santé)

Emmanuelle Cambau, Vincent Jarlier et Nicolas Veziris sont membres du comité de pilotage « Action coordonée Tuberculose » de L'institut Ithématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) depuis sa création en 2014 : élaboration des programmes des réunions scientifiques annuelles, des listings des équipes françaises impliquées en recherche sur les mycobactéries. Ce comité s'est réuni en janvier, Juin et novembre 2019.

.

CA-SFM

Alexandra Aubry a été invitée par le CA-SFM à venir présenter les propositions d'un groupe de travail du réseau AZAY-mycobactéries animé par le CNR concernant l'antibiogramme des mycobactéries non tuberculeuses. Ce travail devrait être intégré au CA-SFM en 2020.

5.2.2. Autorités internationales

OMS

1. Jérôme Robert fait partie des membres expert du groupe « Ulcère de Buruli » de l'OMS
2. Emmanuelle Cambau fait partie des membres expert du groupe « lèpre» de l'OMS et coordonne les activités « microbiologie » de ce groupe (surveillance internationale de la résistance aux antilépreux….). Les réunions de travail de ce groupe avec le bureau de l'OMS-Global Leprosy Program (GLP) ont eu lieu en novembre 2019 à Delhi pour le suivi du programme stratégique 2016-2020 en particulier la surveillance de la résistance et les études de prophylaxie GLP (http://www.searo.who.int/entity/global_leprosy_programme/en).

ECDC

1. Vincent Jarlier a participé à la préparation et aux débats du séminaire du 15 novembre2019 organisée par Santé Publique France et l'ECDC consacrée à la stratégie européenne en matière de séquençage WGS.
1. Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier sont membres du réseau européen des laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) depuis sa création en 2010 sous l'égide de l'ECDC. Le contrat du réseau ERLN-TB a été renouvelé en 2018 par l'ECDC pour la période 2019-2022. Ils ont participé à Ils ont participé à la 11ème réunion annuelle du réseau ERLN-TB à Bucarest .

2. Vincent Jarlier est un des 3 membres d'ERLN-TB élus (avec Daniella Cirillo, Italie, et Troels Lillebaeck, Allemagne) pour siéger au TB-Disease Network Coordination Committee de l'ECDC (TB-DNCC).
3. Emmanuelle Cambau a participé en 2018 au suivi du groupe de travail animé par l'ECDC en coordination avec SPF pour répondre à l'alerte européenne sur les infections post-CEC à *M. chimaera.*
4. Emmanuelle Cambau fait partie du groupe de relecture des guidelines ECDC pour le diagnostic de la tuberculose en ce qui concerne les recommandations des tests de sensibilité aux antituberculeux. Une mise à jour est prévue pour 2020.

EMA – EUCAST

1. Emmanuelle Cambau est la correspondante de l'EMA (European Agency for Medicine) pour l'expertise bactériologique des nouveaux antituberculeux et la détermination des concentrations critiques (en lien avec l'EUCAST).
2. E. Cambau est depuis 2016 responsable du sous-comité pour les mycobactéries (EUCAST subcommittee on antimycobacterial susceptibility testing, AMST). Les objectifs sont (1) de mettre en place une méthode standardisée de détermination des CMI, (2) de l'adapter aux principaux antituberculeux y compris les nouvelles molécules (bédaquiline, délamanide…) et (3) mettre au point les tests phénotypiques de sensibilité et génotypique de détection de la résistance. En 2019, deux réunions physiques du board AMST ont lieu en février (Nice) et avril (Amsterdam) et deux réunions téléphoniques. La méthode de référence a été publiée après consultation publique et avis favorable du steering committee de EUCAST.
3. Nicolas Veziris participe au groupe EUCASTpour la mise au point d'une méthode de référence pour tester la sensibilité aux antibiotiques de *M. tuberculosis*.

ESCMID

1. Emmanuelle Cambau et Vincent Jarlier ont participé à la réunion plénière annuelle de l'ESGMYC qui s'est tenue durant le congrès de l'ECCMID à Amsterdam 2019 pour définir les actions à venir.
2. Emmanuelle Cambau est co-organisatrice du "Guideline committee for diagnosis and treatment of respiratory infections due to nontuberculous mycobacteria" qui associe à l'ESCMID trois autres sociétés savantes internationales (American Thoracic Society, ATS ; European Respiratory Society, ERS ; Infectious Diseases Society of America, IDSA) pour rédiger des recommandations pour le traitement des infections respiratoires à mycobactéries non tuberculeuses. Le travail a été finalisé en 2019 et présenté à l'ECCMID. Les recommandations ont été soumises à une consultations publique auprès des microbiologistes et infectiologues et pneumologues en Europe et aux USA, par l'intermédiaire des sociétés savantes décrites ci-dessus. Les recommandations ont été publiées en 2020.

ISTC

Emmanuelle Cambau est expert pour la tuberculose pour le comité scientifique des projets européens venant des instituts de recherche affiliés à l'International science and technology center (ISTC) des pays de l'ex URSS.

Autres structures internationales

- E. Cambau fait partie du groupe d'experts internationaux sur la prophylaxie de la lèpre, organisé par le Netherland Leprosy Research, et participe à l'étude internationale PEP++. Meeting téléphonique et reunion pendant le congrès international sur la lèpre (International Leprosy Congress) en September 2019; Manila, Philippines
- Emmanuelle Cambau fait partie du groupe d'étude PEOPLE, financé en 2018 par l'EDCTP. 1ere réunion à Anvers, octobre 2018. Elle est responsable au sein du groupe des études moléculaires dans la lèpre (diagnostic, résistance et génotypage). En 2019, il ya eu 2 réunions : une à l'Institut Tropical de Médecine, Anvers et une pendant le congrès de International Leprosy Congress à Manille (Philippines).
- E. Cambau a participé à une réunion de Leprosy Research initiative, Pays Bas, avril 2019

5.2.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (grand public …)

Le site **http://cnrmyctb.free.fr** est accessible à tout public

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

Analyse de l'activité du TB consilium français organisé par le CNR MyRMA

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande de gérer le traitement des tuberculoses à bacilles multirésistants (TB-MDR) dans le cadre de réunion de concertation pluridisciplinaires (Consilium). Depuis 2005, le CNR Myra a mis en place un Consilium national afin de fournir un service de conseil centralisé aux cliniciens prenant en charge des cas de TB-MDR ou XDR.
Nous avons analysé l'activité de ce consilium pour la période 2005 – 2016. Durant cette période, 786 cas de tuberculose ou contacts de tuberculose ont été présentés au Consilium, dont 42% et 79% respectivement de l'ensemble des cas de TB-MDR et TB-XDR notifiés en France au cours de la même période. Depuis 2009, des schémas thérapeutiques comprenant la bédaquiline et / ou le delamanid ont été recommandés pour 42% des cas présentés au Consilium.
Les patients étaient plus susceptibles d'être présentés au Consilium s'ils étaient nés dans la région Europe de l'OMS, étaient atteints d'une TB-XDR, étaient diagnostiqués dans la région parisienne ou avaient des résistances aux antibiotiques au-delà de la TB-XDR.
En conclusion, le Consilium a aidé à superviser la prise en charge correcte des cas de TB-MDR et XDR et a facilité l'introduction de nouveaux médicaments pour le traitement de ces TB-MDR/XDR.
Ce travail a été publié en 2019 dans Inter J Tub Lung Dis et a fait l'objet d'un éditorial : Guglielmetti L, Jaffre J, Bernard C, Brossier F, El Helali N, Chadelat K, Thouvenin G, Dautzenberg B, Henry B, Jaspard M, Guillot H, Pourcher V, Le Du D, Marigot-Outtandy D, Mougari F, Raskine L, Rivoire B, Andrejak C, Jarlier V, Aubry A, Robert J, Frechet-Jachym M, Veziris N Multidisciplinary advisory teams to manage multidrug-resistant tuberculosis: the example of the French Consilium. Int J Tuberc Lung Dis. 2019 Oct 1;23(10):1050-1054

Détermination de la structure complète de l'ADN gyrase de M. tuberculosis

Nous avons déterminé la structure de l'ADN gyrase de *M. tuberculosis*, cible unique des fluoroquinolones chez cette bactérie. Cette nouvelle structure, appuyée par d'autres données biophysiques (diffusion de rayons X aux petits angles et ultracentrifugation analytique), montre que le domaine de la porte N (ATPase) se trouve dans une conformation extrêmement ouverte, non vue dans d'autres structures.
Ce travail a été publié en 2019 dans la revue Structure et a fait l'objet d'un article le commentant : S. Petrella, E. Capton, B. Raynal, C. Giffard, A. Thureau, F. Bonneté, P. M. Alzari, A. Aubry*, C. Mayer* (co-last authors). Overall structures of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase reveal the role of a Corynebacteriales GyrB specific insert in ATPase activity. Structure. 2019 Apr 2;27(4):579-589.e5.

Evaluation du niveau et des conditions d'utilisation du WGS par en Europe
Etude par questionnaire web de 26 laboratoires de reference européens.
Ce travail a été publié en 2019 dans PLoS ONE**:** Andrés M, van der Werf MJ, Ködmön C, Albrecht S, Haas W, Fiebig L, Survey study group (2019) Molecular and genomic typing for tuberculosis surveillance: A survey study in 26 European countries. 14:e0210080 . doi: 10.1371/journal.pone.0210080

Etude génétique de la résistance aux antituberculeux à Alger
En collaboration avec l'université de Chlef (Algérie) et l'Institut Pasteur d'Alger, nous avons étudié la génétique de la résistance chez 11 souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux isolées chez des patients diagnostiqués à Alger en 2014-2015. C'est la première description génétique pour les souches de ce pays d'Afrique du Nord, qui a été un des modèles de la lutte anti-tuberculeuse et dans lequel les taux de résistance sont parmi les plus faibles (1,4%).
Plusieurs outils génétiques ont été comparés : trousse commerciale GenoType MDR-TB Plus et MDR-SI, PCR suivi de séquençage Sanger pour les 10 loci le plus souvent associés à la résistance. Une analyse en NGS d' amplicons correspondant à 15 loci, dont les 10 précédents, a permis de confirmer les mutations trouvées avec les techniques classiques (trousses et PCR-Sanger) et aussi de parfaire l'outil de NGS sur amplicons. Cet outil avait été préféré au séquençage complet du génome car il n'avait pas été possible de transférer les souches d'Algérie en France, et seulement un extrait d'ADN était disponible. Les mutations classiquement décrites ont été trouvées chez 7/10 souches résistantes à la rifampicine et 9/11 souches résistantes à l'isoniazide. Une seule souche était pré-XDr avec une résistance aux quinolones et une mutation gyrA A 90V classique. Plusieurs nouvelles mutations ont été décrites dans *rpoB* (deletion 512-513-514), *katG* (S315R, M126I/ R496L), *gidB* (V124G, E92A, V139A,

G37V) et *gyrA* (P8A). L'analyse génotypique par MIRU-VNTR nous a montré que certaines souches avaient des profils identiques faisant suspecter une transmission mais les caractéristiques épidémiologiques n'étant pas en faveur. Etant donné que nous avons trouvé le même profil (lineage Cameroon) dans une souche MDR isolée en France en 2007 d'un patient venant d'Algérie, il est possible que les souches circulent depuis déjà plusieurs années.
Ce travail a été publié en 2019 : Bouziane F, Allem R, Sebahia M, Kumanski S, Mougari F, Sougakoff W, Raskine L, Yala D, Cambau E, CNR-Myra. First genetic characterization of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Algeria. J Glob Antimicrob Resist. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.010

Publications et communications

Publications Internationales

1. Rodriguez CA, Brooks MB, Guglielmetti L, Hewison C, Jachym MF, Lessem E, Varaine F, Mitnick CD (2019) Barriers and facilitators to early access of bedaquiline and delamanid for MDR-TB: a mixed-methods study. Public Health Action 9:32–41 . doi: 10.5588/pha.18.0078
2. Sane Schepisi M, Navarra A, Altet Gomez MN, Dudnyk A, Dyrhol-Riise AM, Esteban J, Giorgetti PF, Gualano G, Guglielmetti L, Heyckendorf J, Kaluzhenina A, Lange B, Lange C, Manika K, Miah J, Nanovic Z, Pontali E, Prego MR, Solovic I, Tiberi S, Palmieri F, Girardi E (2019) Burden and Characteristics of the Comorbidity Tuberculosis-Diabetes in Europe: TBnet Prevalence Survey and Case-Control Study. Open Forum Infect Dis 6:ofy337. doi: 10.1093/ofid/ofy337
1. Bouziane F, Allem R, Sebahia M, Kumanski S, Mougari F, Sougakoff W, Raskine L, Yala D, Cambau E, CNR-MyRMA (2019) First genetic characterization of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Algeria. J Glob Antimicrob Resist. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.010
2. Perrineau S, Lachâtre M, Lê MP, Rioux C, Loubet P, Fréchet-Jachym M, Gonzales MC, Grall N, Bouvet E, Veziris N, Yazdanpanah Y, Peytavin G (2019) Long-term plasma pharmacokinetics of bedaquiline for multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 23:99–104 . doi: 10.5588/ijtld.18.0042
3. Andrés M, van der Werf MJ, Ködmön C, Albrecht S, Haas W, Fiebig L, Survey study group (2019) Molecular and genomic typing for tuberculosis surveillance: A survey study in 26 European countries. PLoS ONE 14:e0210080 . doi: 10.1371/journal.pone.0210080
4. Guglielmetti L, Jaffre J, Bernard C, Brossier F, El Helali N, Chadelat K, Thouvenin G, Dautzenberg B, Henry B, Jaspard M, Guillot H, Pourcher V, Le Du D, Marigot-Outtandy D, Mougari F, Raskine L, Rivoire B, Andrejak C, Jarlier V, Aubry A, Robert J, Frechet-Jachym M, Veziris N Multidisciplinary advisory teams to manage multidrug-resistant tuberculosis: the example of the French Consilium. Int J Tuberc Lung Dis. 2019 Oct 1;23(10):1050-1054
5. Mbuagbaw L, Guglielmetti L, Hewison C, Bakare N, Bastard M, Caumes E, Fréchet-Jachym M, Robert J, Veziris N, Khachatryan N, Kotrikadze T, Hayrapetyan A, Avaliani Z, Schünemann HJ, Lienhardt C (2019) Outcomes of Bedaquiline Treatment in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. Emerging Infect Dis 25:936–943 . doi: 10.3201/eid2505.181823
6. Petrella S, Capton E, Raynal B, Giffard C, Thureau A, Bonneté F, Alzari PM, Aubry A*, Mayer C* (2019) Overall Structures of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Gyrase Reveal the Role of a Corynebacteriales GyrB-Specific Insert in ATPase Activity. Structure 27:579-589.e5 . doi: 10.1016/j.str.2019.01.004 (co-dernières auteurs)
7. Guglielmetti L, Sougakoff W, Maitre T, Brossier F, Jarlier V, Robert J, Veziris N, Aubry A, French National Reference Center of Mycobacteria (2019) Poor Performance of Rapid Molecular Tests to Define Eligibility for the Shortcourse Multidrug-resistant Tuberculosis Regimen. Clin Infect Dis 68:1410–1411 . doi: 10.1093/cid/ciy808
8. Aubry A, Veziris N (2019) Smear Microscopy Complements Xpert MTB/RIF when Considering NTM Infections. Am J Respir Crit Care Med. doi: 10.1164/rccm.201905-0965LE
9. van Leth F, Brinkmann F, Cirillo DM, Dheda K, Duarte R, Guglielmetti L, Kuksa L, Lange C, Mitnick C, Skrahina A, Zaman K, Bothamley G (2019) The Tuberculosis Network European Trials group (TBnet) ERS Clinical Research Collaboration: addressing drug-resistant tuberculosis through European cooperation. Eur Respir J 53: . doi: 10.1183/13993003.02089-2018
10. Levi LI, Schlemmer F, de Castro N, Brun O, Veziris N, Argemi X, Roupret M, Launay O, Bergeron A, Groh M; BCG infection study group. Bacillus Calmette- Guerin infection following intravesical instillation: Does the strain matter? Med Mal Infect. 2019 Aug;49(5):350-355.

11. Rollet-Cohen V, Roux AL, Le Bourgeois M, Sapriel G, El Bahri M, Jais JP, Heym B, Mougari F, Raskine L, Veziris N, Gaillard JL, Sermet-Gaudelus I. Mycobacterium bolletii Lung Disease in Cystic Fibrosis. Chest. 2019 Aug;156(2):247-254.
12. Dutertre, M ; Delobel, P ; Marchou, B ; Boyer, JF ; Mougari, F ; Martin-Blondel, G , Olecranon bursitis secondary to *Mycobacterium europaeum* infection in a patient receiving immunosuppressive drugs for rheumatoid arthritis., Med Mal Infect, 2019, 49, 358-359
13. Cambau, E ; Saunderson, P ; Gillini, L , "Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-2015" - Author"s reply., Clin Microbiol Infect, 2019, 25, 646-647
14. Decalonne M, Lecorche E, Hau E, Petiteau A, Moreau C, Milan O, Lanotte P, Mereghetti L, Cambau E, van der Mee-Marquet N. Cause Analysis of an Infection in Facelift Surgery Due to *Mycobacterium chelonae*. Frontiers in Medicine (Lausanne). 2019 Nov 7;6:243. doi: 10.3389/fmed.2019.00243. eCollection 2019

Publications nationales

1. F. Morel, J. Jaffré, W. Sougakoff, A. Aubry, N. Veziris. Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la tuberculose. Revue des Maladies Respiratoires. 2019
2. V. Baron, E. Klement, A. Pfanstiel, J. Colot, C. Cazorla, A. Merlet, E. Descloux, C. Forfait, E Cambau, J.P Grangeon. Epidémiologie de la lèpre en Nouvelle-Calédonie de 1983 à 2017. Bulletin Epidémiologique hebdomadaire 2019 ; 21 : 400-405.
3. Daniau C, Lecorche E, Mougari F, Fournier S, Richomme X, Bernet C, Lebreton G, Bosq E, Jehanno AC, Kassis-Chikhani N, Lucet JC, Cambau E, Berger-Carbonne A. Infections invasives à *Mycobacterium chimaera* en chirurgie cardiaque et évaluation des pratiques autour des matériels de circulation extracorporelle. Hygiènes 2019;27(6):351-359. DOI : 10.25329/hy_xxvii_6-1

Guide de recommandations, chapitres d'ouvrage

1. L. Marsollier, A. Aubry, E. Carbonnelle, S. Canaan, J-L. Herrmann. Les Mycobactérioses cutanées dues à *Mycobacterium ulcerans, Mycobacterium marinum, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae* et autres mycobactéries non tuberculeuses, dans l'Encyclopédie Médico-chirurgicale, édition 2019

2. E. Lecorche, F. Mougari, H. Benmansour, E. Cambau. Mycobactéries atypiques. Encyclopédie Médico-chirurgicale : 2019 ; 14 (4) : 1-7 [Article 90-05-0215-A].

Communications internationales (sans invitation)

1. W. Sougakoff, J. Jaffre, A. Aubry, N. Veziris, J. Robert, V. Jarlier. Analyse génomique des souches de *M. tuberculosis* multirésistantes en France : évolution 2006-2018. Mycobacteria 2019
2. I. Bonnet, J. Jaffre,G. Millot, A. Aubry, J. Robert, W. Sougakoff. First evaluation in routine use of the combination of GeneLeadVIII to extract and detect *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA and Deeplex-MycTB to predict drug resistance and TB transmission in less than 7 days from clinical samples. Mycobacteria 2019.
3. E. Haddad, J. Jaffré, E. Caumes, M. Frechet Jachym, D. Marigot Ourrandy, D. Le Du, N. Veziris, I. Escau, H. Guillot, V. Zarrouk, T. Perpoint, V. Pourcher, G. Catho, R. Brault, C. Michau, B. Lafondesmurs, A. Raffetin, V. Zeller, S. Jaureguiberry, A. Aubry, pour le groupe CRIOAC Pitié-Salpêtrière et le groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter. Management of multidrug-resistant osteoarticular tuberculosis in France from 2007 to 2017. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2019
4. J. Jaffré, W. Sougakoff, F. Brossier, A. Aubry, N. Veziris, on behalf of the CNR MyRMA. Delamanid primary resistance: myth or reality ? 50th Union World Conference on Lung Health. 2019
5. F Kort, L Fournier Le Ray, A Chauffour, L Guglielmetti, V Jarlier, A Aubry, N Veziris. Sterilizing activity of weekly bedaquiline-rifapentine regimens in a murine model of tuberculosis. 50th Union World Conference on Lung Health. 2019.
6. M. Bachir, L. Guglielmetti, N. Veziris, F. Brossier, J. Jaffré, V. Jarlier, W. Sougakoff, Jérôme Robert, A. Aubry, on behalf of the CNR MyRMA and Tuberculosis Consilium of the CNR MyRMA. High dose isoniazid for MDR-TB treatment: is it worth trying? 50th Union World Conference on Lung Health. 2019.
7. J. Jaffré, W. Sougakoff, F. Brossier, A. Aubry, N. Veziris, on behalf of the CNR MyRMAHigh prevalence of delamanid resistance among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in France. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2019
8. Bonnet I, Jaffré J, Millot G, Aubry A, Robert J, Sougakoff W. First evaluation in routine use of the combination of GeneLead-VIII to extract and detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA and Deeplex-MycTB to predict drug resistance and TB transmission in less than 7 days from clinical samples. ESM, Valence 2019
9. E. Lecorche, C. Daniau, F. Mougari, H. Benmansour, J. Robert, A. Berger-Carbonne, E. Cambau for CNR-MyRMA Use of Whole Genome Sequencing for investigating of iatrogenic infections due to Non-Tuberculous Mycobacteria. Annual congress of the European Society of Mycobacteriology 2019, poster paper session, Valencia, Spain
10. E. Lecorche, C. Daniau, S. Kumanski, F. Mougari, H. Benmansour, A. Carbonne, E. Cambau on the behalf of CNR-MyRMA. Characterization of *Mycobacterium chimaera* isolates from cardiologic patients with post-surgical

infections and from heater-cooler units in France. European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2019, poster paper session: Environmental disinfection, Amsterdam, Pays-Bas

11. C. Forfait, E. Klement, J. Gaumery, A. Pfannstiel, J. Colot, E. Descloux, C. Cazorla, A. Geluck, E. Cambau, B. Cauchoix, JP. Grangeon, V. Baron. Leprosy screening campaign on the Belep archipelago (New Caledonia). International Leprosy Congress, Manilla Philippines, novembre 2019
12. MDL Navarro, A. Chauffour, B. Cauchoix, R.C. Johnson, M. Gado, M. Kodio, A. Randianantoandro, E.Lecorche, F. Mougari, F. Sanchez, S. Cole, V. Jarlier, E. Cambau. Epidemiological, clinical and microbiological analyses of patients included in the WHO surveillance network of antimicrobial resistance of leprosy: results 2009-2018 from one reference center. International Leprosy Congress, Manilla Philippines, novembre 2019

Communications nationales (sans invitation)

1. J. Jaffré, W. Sougakoff, C. Eckert, F. Brossier, N. Veziris, A. Aubry, on behalf of the CNR MyRMALa résistance au délamanide en France existe déjà. Congrès national de la Société Française de Microbiologie. 2019
2. F. Kort, A. Chauffour, L. Guglielmetti, V. Jarlier, N. Veziris. Analyse de l'activité stérilisante de régimes hebdomadaires à base de bédaquiline et rifapentine dans un modèle murin de tuberculose. 23e Congrès de Pneumologie de Langue Française. Marseille, France 2019.
3. Chiesi S, Guglielmetti L, Bachir M, Aubry A, Veziris N, Lemaitre N, Robert J. Are french large cities at risk for tuberculosis drug resistance? 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 2019
4. M Bachir L. Guglielmetti, S. tunesi, S. Chiesi, V. Martinez, F. Schramm, H. Langris, J. Jaffré, T. Billard-Pomares, N. Lemaitre, J. Robert. Monorésistance à l'soniazide en France : déterminants et prise en charge. 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 16-17 décembre 2019.
5. F. Morel, J. Jaffré, A. Aubry, N. Veziris, J. Robert, V. Jarlier, W. Sougakoff. Analyse génomique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes en France : évolution 2006 – 2018. 39ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris 16-17 décembre 2019.
6. I. Bonnet, J. Jaffré, G. Millot, J. Robert, A. Aubry, W. Sougakoff. Détection rapide et simultanée du génotype et de la résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* grâce au Genelead VIII combiné au Deeplex-MycTB. Congrès national de la Société Française de Microbiologie. 2019.
7. I. Bonnet, J. Jaffré, G. Millot, V. Enouf, A. Aubry, J. Robert, W. Sougakoff. GeneLead-VIII and Deeplex-MycTB allow prediction of drug resistance and transmission of *Mycobacterium tuberculosis* complex in less than 8 days from clinical samples. 37ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2019
8. Henry S, Lecorche E, Meunier F, Mougari F, Jacquier H, Benmansour H, Cambau E. Approches qualitative et quantitative de la détection de *M. leprae* par PCR en temps réel et comparaison avec différents couples d'amorces. Réunion SFM Mycoclub, Angers sept 2019
9. F.Méchaï*, H.Cordel, T.Billard-Pomares, M.Jankovic, M.Viveiros, M.Santin, O.Bouchaud, E.Carbonnelle, D.Goletti, E.Cambau. Diagnostic de la tuberculose: les pratiques sont-elles homogènes en Europe ? Journées nationales d'infectiologie 2019
10. F.Méchaï*, H.Cordel, M.Jankovic, M.Viveiros, M.Santin, O.Bouchaud, D.Goletti, E.Cambau. Tuberculose: les pratiques d'isolement et de traitement sont elles homogènes en Europe ?

Communications internationales sur invitation

1. A. Aubry, New treatment options for resistant tuberculosis, 14th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Stockholm, 2019
2. A. Aubry, 26ème séminaire technico-scientifique Brésil-France sur les IST, VIH/SIDA et hépatites: co infection tuberculose/VIH et 10ème rencontre thématique du programme de recherche de l'agence nationale de recherche sur le VIH/SIDA et les HEPATITES VIRALES (ANRS), 2019
3. E. Cambau. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. ECCMID Amsterdam, April 2019
4. E. Cambau. Diagnostic methods for detection and identification of nontuberculous mycobacteria. ID Week, Washington, USA, October 2019.
5. E. Cambau. New TB diagnostic tools. South Africa-France meeting, Pretoria, Dec 2019
6. E. Cambau, J Miro. TB:HIV Clinical Cases, Meet-the-Expert Session. 17th European AIDS Conference, Basel, November 2019
7. E. Cambau. The role of the microbiology laboratory in diagnosing tuberculosis. ESGMYC Post-graduate Course "Tuberculosis and mycobacterial Infections: an educational update", Singapore, september 2019
8. E. Cambau. Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. ESGMYC Post-graduate Course, "Tuberculosis and mycobacterial Infections: an educational update", Singapore September 2019
9. E. Cambau. Laboratory identification of mycobacteria. ESCMID Summer School, Liverpool, july 2019

Communications nationales sur invitation

1. A. Aubry, Cas clinique interactif : la tuberculose résistante, session de communication thématique DPC, 20ème Journées nationales d'Infectiologie, Lyon, 2019
2. A. Aubry, Journée nationale des CLAT. « PCR » et tuberculose : indications et limites, 2019
3. A. Aubry, La Croix Saint Simon, service de maladies infectieuses, Actualités dans la tuberculose, 2019
4. A. Aubry, Congrès annuel de la Société de Pathologie Respiratoire des îles de l'Océan Indien, Les MNT : du diagnostic microbiologique à l'antibiogramme, 2019

5. A. Aubry, Congrès annuel de la Société de Pathologie Respiratoire des îles de l'Océan Indien, Tuberculoses résistantes : l'apport des techniques moléculaires, 2019
6. N. Veziris, New diagnostic methods for mycobacteria : the pros and cons. Mycobacteria 2019. 6th meeting of fundamental and medical mycobacteriology. Angers, France
7. N. Veziris, Multidrug-resistant tuberculosis: choosing a regimen, ensuring that the dose is correct, managing adverse events and dealing with contacts. European Respiratory Society International Congress. Madrid, Espagne, 2019
8. N. Veziris, Atteintes cliniques à mycobactéries non tuberculeuses. 23ème Congrès de Pneumologie de Langue Française. Marseille, France 2019
9. N. Veziris, Traitement de la tuberculose multirésistante. « Mesures de renforcement de la confiance entre médecins de Tbilissi et Soukhoumi dans le domaine du traitement de la tuberculose et des coïnfections virales liées, organisée par l'Ambassade de France à Tbilissi et le Conseil d'Europe. Paris, 2019
10. N. Veziris, MDR TB : Interventions of National Reference Centre. Visite d'une délégation chinoise. Centre for Tuberculosis Control of Guangdong Province. Paris, 2019
11. N. Veziris, Mycobactéries non tuberculeuses. Congrès annuel de la Société de Pathologie Respiratoire des îles de l'Océan Indien La Réunion, 2019
12. N. Veziris, Atteintes cliniques à mycobactéries non tuberculeuses. Congrès annuel de la Société de Pathologie Respiratoire des îles de l'Océan Indien La Réunion, 2019
13. N. Veziris, Actualités de recherche sur la tuberculose. Service de Maladies Infectieuses. Hôpital Saint-Antoine. 2019
14. N. Veziris, Traitements de la Tuberculose : état et perspectives. Académie Nationale de Médecine. Paris, 2019
15. N. Veziris, Actualités du diagnostic bactériologique de la tuberculose. Département de Bactériologie. Hôpital Saint-Antoine, 2019
16. N. Veziris, Actualités de recherche sur la tuberculose. Service de Réanimation médicale. Hôpital Saint-Antoine. 2019
17. N. Veziris, Tuberculose : quoi de neuf sur les traitements ? Département de Bactériologie. Hôpital Saint-Antoine, 2019
18. Robert, Surveillance de la résistance aux antituberculeux en France. Audition à l'Académie Nationale de Médecine. Paris, 2019.
19. Robert, Bacteriological diagnosis of tuberculosis. Joint French-Chinese symposium on tuberculosis ; Académie Nationale de Médecine et Chinese Medical Academy, Les Pensières 2 décembre 2019.
20. E. Cambau. Microbiologie de la Tuberculose : tests diagnostiques et pronostiques . Académie de Médecine, mars 2019
21. E. Cambau. Diagnostic of pulmonary infections due to nontuberculous mycobacteria. Groupe des mycobactériologistes médicaux (Mycomed) de la Société Française de Microbiologie, octobre 2019.
22. E. Cambau, Lèpre ; Société de pathologie exotique : réunion peau et maladies tropicales – novembre 2019
23. E. Cambau, Données sur la lèpre en France en 2019 ; HCSP Décembre 2019
24. E. Cambau. Risque infectieux liés aux générateurs thermiques en chirurgie cardiaque point spécifique concernant *Mycobacterium chimaera.* Ministère de la Santé, février 2019

Organisation de colloques / congrès

1. N. Veziris, membre du comité scientifique du congrès Mycobacteria 2019. 6thmeeting of fundamental and medical mycobacteriology26-27-28 June 2019, Angers
2. L'ensemble des membres du CNR a participé à l'organisation de la journée nationale de la tuberculose, mars 2019
3. E. Cambau. ESGMYC Post-graduate Course "Tuberculosis and mycobacterial Infections: an educational update", Singapore 2019
4. E. Cambau. Annual meeting of the EUCAST subcommittee on antimycobacterial susceptibility testing, ECCMID Amsterdam 2019

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

10.1. Santé animale

Nous poursuivons notre collaboration avec nos collègues des laboratoires en santé animale, principalement celui de la tuberculose bovine et de mycobactériologie animale (Laboratoire National de référence, Maisons-Alfort) (Dr Maria-Laura BOSCHIROLI).
Il n'y a pas eu d'enquête spécifique en 2019.
Il n'y a pas eu de réunions spécifiques avec la MSA en 2019.

10.2. Environnement

Le risque de contracter une infection à mycobactéries « atypiques » à partir de l'environnement est bien connu, que ce soit lors d'activités de loisir (baignade, hydrothérapie, aquariophilie) ou lors de soins (mésothérapie, chirurgie).
Nos activités dans ce domaine se déroulent dans 2 axes : (a) développements techniques et (b) expertise lors d'événements.

7.2.1. Développements techniques

Nous étudions depuis une dizaine d'années les techniques de détection des mycobactéries dans l'environnement, en particulier les eaux de réseau potable et les eaux naturelles, en collaboration avec le LEESU (Laboratoire Eau-Environnement des Systèmes Urbains) de l'Université Paris 12, Françoise Lucas), le Centre de recherche d'expertise et de contrôle des Eaux de Paris (Laurent Moulin, Sophie Haenn).
Depuis 2012, nous collaborons aussi avec le laboratoire du Pr Yann Héchard à l'Université de Poitiers, sur les interactions entre les mycobactéries et les amibes dans les eaux naturelles.

Développements en 2019 :

- Le protocole de recherche des mycobactéries dans l'eau est maintenant validé et est utilisé à la fois au CNR (laboratoire associé) et au laboratoire de « Eau de Paris ».
Ce protocole a été appliqué en 2019 à la recherche de *M. chimaera* dans les eaux de générateurs thermiques et dans l'environnement direct des cas atteints d'infection liées aux soins à la recherche de MNT comme *M. abscessus*, *M. fortuitum* et *M. mucogenicum* dans les eaux et environnement hospitalier et bâtiment publics (voir § alertes et section WGS).
Ce protocole a été présenté à l'AFNOR en 2018, mais il n'y a pas eu encore de conclusions données en 2019.

7.2.2. Expertise lors d'évènements

Nous participons aux enquêtes menées par les autorités sanitaires (ARS) et les CCLIN (si évènement nosocomial) lors d'évènements d'infections à mycobactéries non tuberculeuses suspects d'être d'origine environnementale.

En 2019 (cf section 4 « Alertes » pour les détails) nous avons participé aux enquêtes concernant des cas groupés de tuberculose ou d'infections à mycobactéries non tuberculeuses.

Alimentation

L'alimentation n'a pas été jusqu'à présent impliquée dans la survenue d'infections à mycobactéries, ni dans les chaines de transmission, sauf bien entendu dans la tuberculose à *M. bovis* (consommation de lait contaminé cru). Nous n'avons pas été jusqu'à ce jour impliqué dans la recherche de *M. bovis* dans la chaine alimentaire car il existe des laboratoires spécialisés pour cela.

8. Programme d'activité pour les 2 années suivantes

8.1. Expertise

L'équipe du CNR-MyRMA est à la disposition des collègues bactériologistes des laboratoires de biologie médicale, hospitaliers et privés, soit directement par téléphone ou mail soit à travers le site internet http://cnrmyctb.free.fr. Nous avons répondu à environ 1500 appels et mails par an.

8.2.1. Nous continuerons à concentrer nos efforts d'expertise pour les laboratoires français :

- **pour *M. tuberculosis*complex : sur les souches anormales ou résistantes** et, inversement, limiter le travail sur les souches multisensibles (aujourd'hui encore ~1/3 des souches de Mtb reçues) qui peuvent plus facilement être prises en charge par les laboratoires de mycobactériologie de routine, en dehors de situations particulières (suspicion de résistance, intolérance aux antituberculeux de 1ère ligne, souche dysgonique rendant les tests de sensibilité délicats…)
Ce choix introduit délibérément un biais de recrutement et ce n'est donc pas à partir des souches reçues au CNR-MyRMA pour expertise que l'on peut établir des statistiques représentatives de résistance en France, mais des statistiques robustes sont établies par les travaux menés à travers nos 2 réseaux partenaires.
En revanche, l'analyse des souches reçues permet une étude précise et la plus exhaustive possible des mécanismes de résistance prévalents en France.

- **pour les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) : sur les cas avérés d'infections chez les patients ayant déjà fait l'objet d'un traitement (échecs thérapeutiques et rechutes).** En effet, les infections à mycobactéries atypiques n'étant pas contagieuses, **il n'y a pas a priori de résistance primaire** liée à la transmission d'une souche résistance d'un autre patient.
Nous étudions aussi les cas d'infections associées aux soins, en complétant nos analyses sur la souche responsable d'infection, par celles sur les souches de mycobactéries résultantes d'une investigation environnementale, menée souvent avec les ARS et l'aide d'organismes spécialisés dans la bactériologie environnementale, telles que « Eau de Paris ».

8.1.2. Techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents infectieux

Stratégie d'identification des mycobactéries non tuberculeuses

L'amélioration des méthodes d'extraction protéique et des bases de données nous permet maintenant de placer la **spectrométrie de masse en MALDI-TOF en 1ère intention** comme outil de screening pour l'identification des MNT les plus courantes (Brucker, bases Mycobactéries V3.0 et 4.0), si besoin après réisolement en subculture. Lorsque les résultats sont insuffisants, les méthodes de biologie moléculaire sont appliquées, en commençant par **l'amplification de un ou plusieurs gènes ou séquences cibles** parmi les suivantes (*hsp65, rpoB, rDNA16S,* région intergénique *16s-23).* Les produits amplifiés et séquencés sont comparés (outils BioEdit et Clone Manager) aux séquences des bases de données externes (NCBI) et de nos propres bases de séquences issues de l'étude de souches de référence pour constituer une banque de données internes.

Enfin, la **confrontation avec les résultats de l'antibiogramme phénotypique et moléculaire** permettra en cas de doute de **vérifier la cohérence des résultats**. En effet, chaque espèce de MNT a un profil de sensibilité aux antibiotiques propre correspondant au profil des souches sauvages.

Antibiogramme phénotypique

Mycobacterium tuberculosis
La méthode des proportioons en milieu solide (LJ) ou liquide reste la méthode de référence.

Antibiogramme propre à chaque espèce de mycobactéries non tuberculeuses
Notre **objectif** est **d'identifier de façon pertinente la résistance et la sensibilité aux antibiotiques**, afin de pouvoir proposer un traitement le plus efficace possible. Pour ce faire nous continuerons à **développer les tests phénotypiques de sensibilité** en complément des tests moléculaires (cf ci-

dessous). Les tests phénotypiques seront basés sur la détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMI) mesurées selon des conditions propres à chaque espèce ou groupe d'espèce e travail sera mené **en collaboration avec nos collègues européens du groupe ESGMYC** de l'ESCMID pour calculer les CMI modales, CMI50, CMI90 et CMI95 (correspondant à la concentration dite « epidemiological cutoff » ou ECOFF) propres à chaque MNT. Ces concentrations serviront de base à la détermination de concentrations critiques ou « breakpoints » dans le cadre du sous-groupe EUCAST sur les antimycobactériens que nous présidons depuis 2016.
Nous utiliserons aussi les recommandations qui seront issues des « guidelines » que nous sommes en train de finalise dans le cadre d'un partenariat ESCMID-IDSA-ATS-ERS.

Tests génotypiques de résistance aux antimycobactériens

- Pour les **antituberculeux « piliers » du traitement standard de la tuberculose** (**rifampicine, isoniazide)**, nous utiliserons en première ligne le test **GenoType®MTBDR*plus***. Lorsque ce test ne détectera pas de mutation alors qu'il y a une très forte suspicion de résistance à l'isoniazide (ou à l'éthionamide, proche de l'isoniazide), l'exploration moléculaire sera complétée par le **séquençage complet des gènes** *katG*, *inhA, ethA, ethR*. Nous serons plus rarement amenés à séquencer tout le gène *rpoB* car la résistance à la rifampicine causée par une mutation hors de la région « chaude » du gène *rpoB* incluse dans le test est rare. Pour le pyrazinamide, nous nous baserons sur le séquençage complet du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase, activateur du pyrazinamide.

- **Pour les souches de TB-MDR**, nous utiliserons en 1ère ligne le test **GenoType®MTB*sl*** qui explore les mutations conférant la résistance à : fluoroquinolones, amikacine, kanamycine, capréomycine. En 2ème ligne nous utiliserons la **nouvelle approche « GeneLead-Deeplex » et l'approche WGS (cf stratégie ci-dessous).**

- **La détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez les MNT sera basée principalement sur l'étude des gènes** : (a) *rrl* codant l'ARN 23S pour la résistance acquise à la clarithromycine, (b) *erm(41)* pour la résistance naturelle à la clarithromycine chez les sous-espèces du complexe *M. abscessus, (c)* gène *rrs* codant l'ARNr16S pour la résistance acquise à l'amikacine.
Nous utiliserons en 1ère ligne la trousse GenoType NTMDR® que nous avions développé un test moléculaire de détection de la résistance en partenariat avec l'industriel allemand Hain Lifesciences et qui permet une bonne détection de la résistance à la clarythromycine, principal antibiotique pour les MNT. Ce test est utilisable pour les principales espèces isolées (*M. avium* complex, *M. abscessus)* et permet aussi de différencier les sous espèces de *M. abscessus*, en donnant les résultats de génotype naturel lié aux sequevars du gène *erm(41).* Des séquençages seront effectués pour les autres antibiotiques : amikacine, rifampicine, fluoroquinolones.
De nouvelles mutations seront systématiquement recherchées chez les souches de MNT phénotypiquement résistantes aux macrolides (clarithromycine et azithromycine), en particulier dans les gènes des protéines ribosomales L4 (*rplV*) L22 (*rplD*) et *whiB*, lorsque la trousse Genotype-NTMDR® ne détectera pas de mutation dans les gènes *rrl* et *erm(41).*

- **Pour *M. leprae***, nous réaliserons le diagnostic bactériologique des cas de lèpre suspectés dans les DOM-TOM ou en France métropolitaine chez les sujets ayant vécu dans les pays d'endémie en combinant (a) l'examen microscopique d'une biopsie cutanée prélevée par punch de 3 ou 4 mm sur une lésion typique, (b) une PCR spécifique d'espèce très sensible (ciblant les séquences répétées RLEP) et (c) une PCR multiplexe des gènes de résistance à la rifampicine, aux quinolones et à la dapsone avec la trousse GenoType LepraeDR® que nous avons contribué à concevoir avec un industriel allemand (Hain Lifesciences) et qui est progressivement adoptée par le réseau de surveillance de la résistance aux antilépreux de l'OMS.

8.1.3. Stratégie d'utilisation des approches de séquençage à haut débit, intégration avec les autres approches moléculaires

8.1.3.1. M tuberculosis (laboratoire Pitié)

Nous avons maintenant à notre disposition 2 approches de NGS dont les meilleures indications sont différentes et complémentaires :

- **L'approche WGS classique (cf sections WGS et étude des souches MDR)**

- **La nouvelle approche « GeneLead-Deeplex » (cf. section 2 § nouvelles techniques)**

Cette approche combine une nouvelle technique de PCR d'identification du complexe *M. tuberculosis* et du clade (spoligotype). Un séquençage avec une très grande sensibilité (**Genelead**, Diagenode) couplée à une **analyse de séquençage NGS à haute profondeur** de produits PCR (**Deeplex**, Genoscreen). Les avantages de la technologie **Genelead** sont (a) l'extraction et l'amplification de l'ADN en un seul temps par une procédure entièrement automatisée, et (b) une grande sensibilité en terme de détection du complexe *M. tuberculosis* permettant de **travailler directement à partir du prélèvement**, **ce qui est loin d'être le cas avec l'approche WGS**. Le kit **Deeplex**, validé sur prélèvement et sur culture, est capable d'identifier et de typer *M. tuberculosis* (**spoligotype**) et p**rédire la résistance à 12 antituberculeux de 1ère et 2ème ligne**. Un séquençage avec une très grande profondeur de couverture des cibles (approche NGS **Illumina**) permet de dépister les mutations de résistance dans 18 régions du génome, et de détecter d'éventuelles hétéro-résistances. Les données brutes de séquençage sont analysées à l'aide d'une application web simple d'emploi, hébergée sur une solution Cloud sécurisée.

La stratégie que nous utiliserons en 2020 sera de de faire appel à une hiérarchisation de ces 2 approches et des approches classiques, selon le schéma ci-dessous.

Exploration des gènes de résistance

- 1ère étape de « débrouillage-confirmation » sur prélèvement ou souche, pour établir ou confirmer la résistance à la rifampicine et l'isoniazide pour tous les cas suspects, à l'aide du système **d'amplification-hybridation GenoType MTBDRplus®**

- en 2ème étape pour les cas confirmés de résistance :

- ✓ **si le matériel disponible est un prélèvement, l'approche « Deeplex» est la plus rapide et la plus sensible** (cf. ci-dessus) pour obtenir rapidement les informations utiles pour les prises de décision thérapeutiques. Cette approche est suffisante pour identifier le clade auquel appartient la souche, ce qui constitue une 1ère étape de génotypie. La génotypie sera complétée par le WGS sur culture (cf. ci-dessous).
- ✓ **si le matériel disponible est une souche, l'approche WGS est la plus efficace et donne les résultats les plus complets pour les gènes de résistance et la génotypie.**

- en 2ème étape pour les cas non confirmés de résistance (souche sensible à RIF-INH), il n'y a pas lieu, sauf cas particulier, de chercher des caractères génotypiques de résistance aux antituberculeux de 2ème ligne.
Dans ces cas particuliers (allergie aux antituberculeux de 1ère ligne…), nous étudierons la souche à l'aide du système **d'amplification-hybridation GenoType MTBDRsl®** qui permet avec une excellente VPN d'exclure la résistance aux quinolones pour ces souches au sein desquelles la résistance à ces antibiotiques est très rares (cf. section 2 de ce rapport). Le recours à l'approche Deeplex, approche NGS la plus simple, sera exceptionnelle.

Génotypage à visée épidémiologique

Souches sensibles
Il s'agit de cas suspects d'être liés sur la base des données de terrains (enquêtes autour de cas menées par les CLAT, suspicion d'épidémie dans les lieux de soins…). L'approche sera en priorité la technique Deeplex qui nécessite peu de bactéries (les souches reçues sont parfois peu abondantes) et la préparation de l'ADN est simple et rapide. Cela permettra d'obtenir le spoligotype qui, s'il est différent, excluera la relation entre les cas. Si les spoligotypes sont identiques, cela suffit dans les situations où le lien épidémiologique est fort (famille…). Dans les cas où il faudrait poursuivre plus avant l'investigation, nous utiliserons le WGS.

Souches MDR/XDR
L'approche WGS s'impose (cf. section 3 surveillance).
Il faut cependant bien avoir à l'esprit que le **WGS ne permet pas de générer le profil MIRU ce qui rend impossible la comparaison avec les données antérieures** accumulées depuis 2006 par l'approche MLIRU qui était la méthode internationale de référence (et qui est encore très utilisée dans de nombreux pays).

8.1.3.2. Mycobactéries non tuberculeuses (laboratoire Lariboisière)

Les connaissances des caractéristiques génomiques des MNT sont beaucoup plus limitées que celles de *M tuberculosis*. La connaissance de ces caractéristiques permettront progressivement (a) d'aider à la compréhension des mécanismes de résistance acquise et naturelle aux antibiotiques, (b) de mieux étudier la clonalité des souches en cas d'épidémies ou pour affirmer l'origine de contaminations, (c) d'identifier de nouvelles espèces ou sous espèces et (d) mieux connaitre leur réservoir et leur transmission à l'homme.

Nous continuerons à utiliser l'approche WGS pour (a) **l'étude des épidémies** (souches humaines et environnementales), (b) **les enquêtes sur les infections liée aux soins** et (c) rechercher les mécanismes de résistance aux antibiotiques
Notre projet est aussi de **mettre en place l'approche WGS pour l'étude de *M. leprae***, directement à partir des biopsies puisque cette espèce n'est pas cultivable.

8.2. Travaux de recherche appliquée

8.2.1. Contribution de la spectrométrie de masse MALI-TOF au diagnostic mycobactériologique

Nous développerons des algorithmes informatiques pour optimiser l'utilisation de la spectrométrie de masse MALI-TOF pour le diagnostic d'espèce mycobactérienne et de résistance aux antimycobactériens.

8.2.3. Chimiothérapie expérimentale

Boosters de l'éthionamide
L'éthionamide fait partie de ces antibiotiques qui sont activés dans la cellule bactérienne. Des molécules boosters peuvent accroitre cette activation et ainsi optimiser l'activité de cet antibiotuqe. Nous prévoyons d'évalur *in vivo* l'activité antituberculeuse d'une combinaison d'éthionamide et de booster.

Emergence *in vivo* de la résistance à la bédaquiline
La résistance à la bédaquiline est de plus en plus décrite et apparait être beaucoup plus fréquente qu'anticipé. Pour mieux comprendre ce phénomène nous étudierons cette émergence de résistance *in vitro* et *vivo* dans différents modèles murins.

8.3. Appui thérapeutique

L'appui thérapeutique reposera sur :
- des **conseils téléphoniques directs** pour les cas les plus simples
- **les Réunions de Concertation Pluridisciplinaire (RCP), ou « TB-MNT consilium France »,** organisées par le CNR-MyRMA à la Pitié-Salpêtrière (TB) et Lariboisière (MNT) dont les activités sont centrées sur les cas difficiles soumis par des collègues cliniciens.

Mise en place d'un RCP spécifique pour les cas de lèpre
Nous recevons de plus en plus de prélèvements pour les cas de lèpre cliniquement confirmés afin de démontrer la présence de *M. leprae*, et détecter une éventuelle résistance aux antilépreux, et aussi en cas de suspicion de lèpre devant une lésion cutanée ou nerveuse évocatrice, dont environ 1/3 sont confirmés comme des lèpres bactériologiquement confirmées.
Nous allons mettre en place en 2019 une **« RCP lèpre »** avec les quelques collègues cliniciens ayant une expertise dans cette infection, si possible répartis sur le territoire national afin de pouvoir venir en aide pour les cas ayant besoin d'une consultation clinique.

8.4. Registre des cas de tuberculose MDR

Les prochaines étapes pour l'année 2020 ont été fixées par le conseil scientifique :
- ✓ test grandeur nature du registre à l'occasion des RCP ; puis corrections des « bugs »
- ✓ inclusion dans le registre des patients MDR déclarées au CNR-MyRMA à partir de Janvier 2020
- ✓ mise en place et test du registre dans les centres pilotes (Lyon, Rennes, Paris-Bichat, Paris-PSL, Bligny)

Pour ce qui concerne l'activité de surveillance du CNR-MyRMA et de Santé Publique France, **la saisie rétrospective d'une proportion des cas MDR à partir de 2006** (en particulier des issues de traitement) est envisagée ; **la question technique de l'import automatisé des données informatisée au CNR devra être résolue par les informaticiens prestataires**.

8.5. Contribution à la détection et à l'investigation des cas groupés ou de phénomènes inhabituels

Nous continuerons à comparer les génotypes des souches isolées de cas suspects d'être liés ou de patients et d'environnement (MNT) dans les circonstances suivantes :

Tuberculose
- suspicions de tuberculose nosocomiale ou de transmission dans des familles ou des collectivités, pour lesquelles le génotypage complète l'enquête épidémiologique « autour d'un cas » réalisée par les ARS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
- suspicions de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicions de contamination inter-prélèvements au laboratoire,
- **étude systématique par WGS (cf § 8.1.3. ci-dessus) des souches des cas de tuberculose MDR ce qui permettra de continuer à participer au programme Euro-TB de l'ECDC.**

Mycobactéries non tuberculeuses
- dans un contexte iatrogène ou associé à des soins esthétiques (tatouage, hydrothérapie..)
- enquêtes visant à identifier la source de contamination, en lien avec les autorités sanitaires : comparaisons des souches des patients entres elles et avec celles isolées dans l'environnement.

Les méthodes utilisées seront, selon l'espèce en cause : REP-PCR ou WGS.

8.6. Contribution aux réseaux de surveillance européens

Tuberculose
- Les **données de résistance 1aire et 2aire aux antituberculeux seront envoyées à l'ECDC et, par ce biais, à l'OMS,** grâce à la collaboration ECDC-OMS région Europe.
- Les **données de génotypage WGS des souches MDR seront envoyées à l'ECDC (réseau ERLN-TB des CNR européens)** et intégrés au rapport de l'ECDC.

Pour garantir la qualité des données transmises, le CNR-MyRMA **participera régulièrement aux contrôles de qualité européens** génotypiques et phénotypique organisés par l'ECDC.

Lèpre

Nos **résultats de surveillance de la résistance aux antilèpreux seront rapportés au réseau de surveillance OMS** (nouvelle stratégie OMS 2016-2020).
Nous pourrions de plus confronter, avec l'aide de Santé Publique France, les cas de lèpre des DOM-TOM à celui des déclarés à l'OMS par les pays limitrophes, ceci en particulier pour les DOM de l'Océan Indien (Mayotte, Ile de la Réunion) qui sont très proches de deux pays endémiques (Comores et Madagascar) et pour la Nouvelle Calédonie.

Mycobactérioses
Nous participerons aux actions de surveillance menés par l'ECDC sur les infections à MNT comme nous l'avons fait depuis 2015 sur les infections à *M. chimaera* post chirurgicales.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Mission du CNR « Mycobactéries et résistance aux antituberculeux »

Le CNR Mycobactéries et résistance aux antituberculeux s'engage à assurer les missions définies par le décret n° 2016-806 du 16 juin 2016 relatif aux centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et par l'arrêté du 16 juin 2016 fixant le cahier des charges des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles.
Il sera en outre particulièrement demandé à ce CNR les missions suivantes :

1. Expertise
- en développant et en évaluant les nouvelles techniques de diagnostic de la maladie et de l'infection tuberculeuse ainsi que le diagnostic des infections à mycobactéries atypiques et à mycobactéries dites rares ;
- en développant une collection de souches ;
- en identifiant les souches de mycobactéries du complexe tuberculosis et les autres espèces de mycobactéries adressées par les laboratoires ;
- en étudiant la sensibilité des souches mono, multi et ultra résistantes, y compris vis-à-vis des anti-infectieux non utilisés usuellement, en développant les techniques adaptées, notamment les méthodes moléculaires de diagnostic rapide ;
- en contribuant à l'étude des mécanismes de résistance aux antituberculeux en collaboration avec le CNR Résistance aux antibiotiques ;
- en participant au contrôle de qualité des tests de sensibilité aux antituberculeux pratiqués par les laboratoires de biologie médicale ;
- en assurant un appui méthodologique au diagnostic aux biologistes confrontés à des souches résistantes et un appui thérapeutique aux cliniciens/centre de lutte antituberculeuse pour l'établissement de protocoles de traitement/prophylaxie adaptés aux souches en cause.

2. Conseil
- en contribuant à l'expertise pluridisciplinaire pour la prise en charge : des tuberculoses dues à un germe présentant un profil de multirésistance aux antibiotiques ; des mycobactérioses.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique
- en contribuant à la surveillance de la méningite tuberculeuse, des mycobactérioses et de la lèpre ;
- en contribuant à l'investigation des cas groupés ou d'épidémies en réalisant l'identification, le typage moléculaire et l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de mycobactéries ;
- en contribuant à la surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antituberculeux et de la résistance multiple de *M. tuberculosis*, en s'appuyant sur les réseaux existants et en veillant à leur représentativité ;
- en contribuant à la surveillance des issues de traitement des cas de tuberculose à bacille multi-résistant et à l'amélioration sur la description du suivi des patients ;
- en contribuant à l'évolution des outils et dispositifs de surveillance de la tuberculose ;
- en participant avec l'agence nationale de santé publique aux systèmes de surveillance européens et internationaux.

4. Contribution à l'alerte
- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel : augmentation inhabituelle de cas ou modification de leurs caractéristiques ; apparition de cas groupés ; modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), modification des profils de résistance ; apparition de souches inhabituelles ; etc.

Organisation du CNR

Le CNR-MyRMA repose sur 2 laboratoires de bactériologie médicale :

Un laboratoire coordinateur : laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix à Paris, site Pitié-Salpêtrière, responsable Pr Vincent Jarlier.

Un laboratoire associé : laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe hospitalier Saint Louis-

Lariboisière à Paris, site Lariboisière, responsable Pr Emmanuelle Cambau.

Chacun de ces 2 laboratoires maîtrise les techniques phénotypiques et génotypiques en mycobactériologie médicale (tuberculose, lèpre, infections à mycobactéries non tuberculeuses), sont équipés de secteurs de sécurité L3 permettant la manipulation de M.tuberculosis, et bénéficient d'un personnel compétent en mycobactériologie. Ceci permet à ces deux laboratoires de se suppléer mutuellement et d'assurer la continuité des activités d'expertise (périodes de maintenance et de contrôle du secteur L3 de l'un d'eux, problème technique, déficit momentané en personnel, périodes de congés…).

Ces 2 laboratoires mettent aussi en commun des centres d'intérêt complémentaires :
Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour *M. tuberculosis*; surveillance épidémiologique des infections à travers les réseaux partenaires ; conseils thérapeutiques pour les infections inhabituelles (ex. tuberculose MDR…).
Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour les mycobactéries non tuberculeuse et *M.leprae* ; mycobactériologie environnementale ; conseils et alertes pour les infections liées aux soins ou à un réservoir environnemental ; tests immunologiques de la tuberculose.

Cette complémentarité permet de répondre à l'ensemble du cahier des charges et d'optimiser (i) les appuis aux collègues microbiologistes et cliniciens, (ii) les interactions avec les autorités sanitaires (Santé Publique France, DGS, ARS, CLAT).

Le CNR-MyRMA a disposé en 2019 d'équipes médicales et techniques comme suit (cf tableau ci-dessous pour détail) :

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

- 3 PU-PH, 1 PU-PH consultant, 1 MCU-PH, et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière – Charles Foix et Université Paris 6 (**0,95 ETP**, financement APHP)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1,7 ETP)**
- 2 techniciens (1 ETP, financement AP-HP)
- 1 secrétaire (0,25 ETP, financement AP-HP)
- 1 cadre (0,1 ETP, financement AP-HP)
- 1 technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 animalier (financement fonds associatifs)

Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière)

- 1 PU-PH, 1 PHU et 1 AHU du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière et Université Paris 7 (**0,7 ETP**, financement AP-HP)
- 1 médecin biologiste, 1 ingénieur et un bioinformaticien financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2.7 ETP)
- 2 techniciens (0,5 ETP, financement AP-HP)
- 1 secrétaire (0,1 ETP, financement AP-HP)

Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordonnateur (site Pitié) et du laboratoire associés (site Lariboisière) : fonction, temps dédié au CNR-MyRMA en 2018 (en ETP), qualification, statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Jarlier	Vincent	Directeur	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuelle	Respons. labo. associé	0,15	Médecin biol.	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbio/pneumologue	0,1	Médecin	PU-PH	St Antoine*	AP-HP
Bonnet	**Isabelle**	**Microbiologiste**	**0,8**	**Pharm. biol.**	**PH contr.**	**Pitié**	**SPF**
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,5	Médecin biol.	PU-PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Guglielmetti	**Lorenzo**	**Médecin**	**0,2**	**Médecin**	**Attaché**	**Pitié**	**SPF-MIGAC**
Mougari	Faiza	Microbiologiste	0.2	Médecin Biol.	PHU	Lariboisière	AP-HP
Temin	**Sabrina**	**Microbiologiste**	**1**	**Médecin Biol**	**Attaché**	**Lariboisière**	**SPF-MIGAC**
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Tomczyk	**Julie**	**Technicienne**	**1**	**Technicienne**	**Tech**	**Pitié**	**SPF**
Golamhosen	**shenaz**	**Technicienne**	**0,75**	**Technicienne**	**Tech**	**Pitié**	**SPF**
Henry	**Stéphanie**	**Ingénieur**	**1**	**Technicienne**	**Tech**	**Lariboisière**	**SPF-MIGAC**
Brisilliat	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
La	**Kevin**	**bioinformaticien**	**0,7**	**Technicien**	**Tech**	**Lariboisière**	**SPF**
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,15	Secrétaire		Pitié	AP-HP
Laurent	Caroline	Cadre	0,1	Cadre		Pitié	AP-HP
Dupriez	Isabelle	Secrétaire	0,1	Secrétaire		Lariboisière	AP-HP

*même groupe hospitalier que Pitié

Le CNR-MyRMA s'appuie sur 2 réseaux partenaires :

Le réseau Azay-Mycobactéries

Depuis 1995, le CNR-MyRMA conduit la surveillance annuelle de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux grâce à la collaboration volontaire d'une quarantaine de laboratoires hospitalo-universitaires couvrant toutes les régions métropolitaines sauf la Corse qui n'a pas de CHU. La surveillance assurée à travers ce réseau est standardisée, en particulier pour ce qui est du recueil des informations cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.
La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis publiés qui ont montré que la sensibilité du réseau et la concordance des données avec celles de la DO étaient satisfaisantes.
Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~1.500 cas de tuberculose /an.

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, à travers le réseau créé spécifiquement pour cela et qui réunit l'ensemble des laboratoires pratiquant la mycobactériologie, la surveillance annuelle à visée exhaustive du nombre de cas de tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces cas, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (« multirésistants » ou MDR).
Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculose (méningites, M. bovis...).
Ce réseau permet de recueillir des informations sur ~4.000 cas de tuberculose /an.

Le CNR-MyRMA est adossé à des unités de recherche labélisées :

Laboratoire coordinateur

Equipe INSERM « Mécanismes d'émergence et de diffusion de la multirésistance chez les Mycobactéries et les entérobactéries » intégrée à l'UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies

infectieuses (CIMI) », Paris 6, site Pitié-Salpêtrière).

Laboratoire associé
Equipe IAME (Infection, Antimicrobials, Modeling, Evolution), UMR1137 Inserm-Université Paris Diderot, IAME, Equipe 2 EVRest (ecology, evolution and therapeutic of virulence and resistance in bacteria) .

Locaux du CNR

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, site Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m2.
Les activités se déroulent :
- dans le laboratoire de sécurité L3 (150 m2) consacré à la mycobactériologie, à la manipulation des bactéries de classe 3 (salmonelles, brucelles…) et aux alertes Biotox.
- dans les pièces adjacentes (100 m2) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage…).
La gestion informatique des réseaux partenaires, ainsi que l'animalerie de chimiothérapie expérimentale, sont localisées dans la partie universitaire du laboratoire, au 5e étage de la Faculté de Médecine PM Curie, site Piitié-Salpêtrière, située sur le même campus.

Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière)
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal, site Lariboisière, situé au 2éme étage du bâtiment CIVIALE, superficie totale du laboratoire 964 m2.
Les activités du CNR se déroulent :
- dans le laboratoire de sécurité L3 (construction modulaire de 50 m2 à l'extérieur du bâtiment Civiale).
- dans des pièces (39 m2) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (coloration, microscopie fluorescente) et du génome (amplification génique, sondes moléculaires, électrophorèse, séquençage…).

Principaux équipements du CNR

Laboratoire coordonnateur (Site hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3 et ses annexes
- Equipements de cultures des prélèvements médicaux en milieux solides et liquides,
- Automate pour hémocultures des mycobactéries,
- Equipements pour antibiogrammes en milieu solide et liquide,
- Equipements pour l'identification phénotypique classique,
- Equipement pour l'extraction d'acides nucléiques (cf. ci-dessous),
- 5 postes de sécurité microbiologiques,
- 13 incubateurs,
- Automate de culture en milieu liquide MGIT
- Autoclave double entrées,
- Autoclave vertical Lequeux,
- Microscopes à fluorescence lampe LED,
- Microscopes classiques,
- Spectrophotomètre (Ultrospec10, Dutscher),
- Sorbonne pour coloration,
- Colorateur de lames,
- 4 centrifugeuses,
- bains à sec chauffants,
- Coagulateur pour la préparation des milieux de Lowenstein-Jensen.

Biologie moléculaire
- Extracteur d'acides nucléiques de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure LC,
- amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine, GeneAmp PCR system 9700),
- amplificateurs automatisés de PCR « temps réel » (Clemens25, ABI7000),
- Amplificateur FluoroCycler 12 (Hain Lifescience) pour les tests FluotoType MTB (diagnostic de tuberculose dans les prélèvements),
- Extracteur d'ADN Arrow Nordiag (Hain Lifescience) automatisé pour l'extraction de l'ADN de *M. tuberculosis*à partir de prélèvements,

- blocs d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- Automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- Imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminocence,
- BioAnalyser 2100 Agilent,
- Système de filtration sur plaques pour la purification des PCR,
- 1 bain à sec chauffant,
- Logiciel d'assemblage et d'analyse des données de séquençage WGS (BioNumerics).

- **Equipements accessibles sur la plate-forme génomique de la Pitié-Salpêtrière**
- Microdosage des acides nucléiques sur spectrophotomètre Nanodrop,
- PCR temps réel haute capacité MX4000 et MX3005,
- Bioanalyseur 2100 Agilent pour analyse des acides nucléiques sur puce,
- plateforme de génotypage de SNP à haut débit « ILLUMINA » (puces BeadChips),
- Scanner pour lecture des lames microarrays hybridées avec sondes Cy3/Cy5,
- spectromètres microplaques 384,
- Spectromètre de masse MALDI-TOF,
- Spectromètre de masse NanoLC-ESI-MS/MS,
- Robot de fractionnement Freedom EVO150 (Tecan).

Autres équipements
- Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker).

Animalerie (capacité totale : 1000 souris) :
- isolateurs rigides,
- armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients,
- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures,
- étuves,
- 1 broyeur d'organe GentleMacs (Miltenyi)
- Autoclave pour destruction des déchets,
- Accès à l'animalerie A3 de la faculté de médecine Pierre-et-Marie Curie.

Laboratoire associé (Site hospitalier Lariboisière)

Laboratoire de sécurité L3
- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux,
- 3 postes de sécurité microbiologique,
- 3 incubateurs (30 et 37°C) pour milieux solides et liquides,
- 3 automates de culture en milieu liquide (MGIT960TB®, Becton-Dickinson)
- Équipement complet de mycobactériologie médicale classique (réactifs de décontamination, centrifugeuses, coloration auramine et Ziehl, microscopes à fluorescence…),
- Matériel et équipement pour identification rapide phénotypique,
- Equipement et automate pour antibiogramme en milieu liquide MGIT,
- 1 module de suivi et d'analyse de la sensibilité des isolats aux antituberculeux de 1ere et seconde ligne (TB eXiST BD),
- 1 Système de lecture de microplaques Sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®.

Biologie Moléculaire
- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG),
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosγ Thermos),
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000,
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR,
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules),
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler),
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator,
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 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 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®,
- 1 séquenceur Miseq (Illumina) partagé avec le service de Génétique
- 1 licence de logiciel Bionumerics

Autres équipements
- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker), et base V5 CEIVD
- Automates d'immuno-analyse ETIMAX2000 et Dynex, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold Plus in Tube (Cellestis),
- 1 autoclave de destruction.

Collections de souches

Description des souches

Nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première ligne. Pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles.

Pour chaque souche de cette collection, le phénotype de résistance a été confirmé par la méthode des proportions (méthode de référence pour les antibiogrammes de M.tuberculosis), quantifié par la détermination de la concentration minima inhibitrice et le mécanisme de résistance a été caractérisé génétiquement.

Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques

Souche de *M.tuberculosis*	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	*inhA* -15c->t	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible 1mg/l
Isoniazide haut niveau	*KatG* S315T	100% résistance isoniazide 1 mg/l, sensible 10 mg/l
Rifampicine	*RpoB* S531L	100% résistance rifampicine 40 mg/l
Streptomycine	*Rpsl* L43A	100% résistance streptomycine 4 mg/l

Enfin**, le CNR-MyRMA conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise** pour une durée de 10 ans (environ 10.000 souches).

Condition de stockage

Le stockage de l'ensemble de ces souches est organisé sous forme de souchier dont le fichier est stocké sur un ordinateur situé sur le réseau de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et bénéficiant de ce fait d'une sauvegarde.

Les souches sont conservées dans du 7H9 glycérolé dans un congélateur à -80°C.

Les lépromes reçus au CNR-MyRMA pour recherche de M.leprae sont conservés à -80°C.

Parallèlement à la conservation des souches, le CNR est équipé d'un congélateur -40°C pour la conservation des ADN extraits des souches pour lesquelles une analyse de biologie moléculaire est demandée.

Conditions de mise à disposition des collections

Les souches sont à la disposition de tous les laboratoires et sont envoyées sur demande. Elles ont déjà été mises à la disposition des laboratoires de microbiologie du groupe Azay-mycobactéries (constitué par une trentaine de laboratoires des hôpitaux universitaires participant à la surveillance de la résistance primaire et secondaire) pour ceux qui voulaient organiser des contrôles de qualité internes.

Les souches de *M. tuberculosis*résistantes aux antituberculeux ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français possédant un local de sécurité biologique de niveau 3 (P3) et réalisant des tests de sensibilité. Les souches résistantes aux antituberculeux de deuxième ligne ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.

L'envoi de souches XDR fait l'objet d'une réglementation particulière et n'est possible qu'à des laboratoires détenteurs d'une autorisation MOT.

Démarche qualité

Techniques standardisées

Le groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries ») a rédigé des techniques communes disponible sur le site « azaymycobacteries.free.fr » et sur www.microbes-edu.fr, et accessibles via le site http://CNR-MyRMAmyctb.free.fr. Ce guide comporte les chapitres suivants :
Mode opératoire : Préparation technique, Décontamination des prélèvements, Colorations et Examen microscopique, Culture des mycobactéries sur milieux spécifiques, Identification des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Antibiogramme des mycobactéries par méthodes phénotypiques et génotypiques, Amplification génique pour diagnostic.
Procédure : Les mycobactéries, Hygiène et sécurité, Contrôle de qualité, Elimination des déchets, Biologie moléculaire, Souchothèque.
Procédure annexe : Prélèvements.

Contrôles de qualité externe

a. chacun des 2 laboratoires du CNR-MyRMA a participé en 2019 au contrôle de qualité externe (CQE) organisés par la société Instand (Dusseldorf, Allemagne), **dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB.**
Les contrôles portaient sur :
- 6 échantillons pour l'examen microscopique
- 5 échantillons pour la culture
- 5 échantillons pour le diagnostic génotypique de tuberculose (PCR)
- 5 souches de mycobactéries non tuberculeuses pour identification
- 5 souches pour les tests de sensibilité génotypiques à 9 antituberculeux, soit 45 tests
- 5 souches pour les tests de sensibilité phénotypiques à 16 antituberculeux soit 80 tests
- 4 souches de MNT pour des tests de sensibilité phénotypiques et génotypiques soit 50 tests

Au total, ce CQE représentait **196 tests à effectuer dans chacun des 2 laboratoires.**
Les résultats obtenus étaient conformes dans chacun des 2 laboratoires qui ont donc reçu un certificat de qualité.

b. le laboratoire Lariboisière a participé en 2019 à la première enquête européenne pour les tests IGRA –tuberculose organisée par l'ECDC et participe aux CQE préparés par UK-Neqas.

c. le laboratoire Pitié-Salpêtrière participe depuis 2011 aux **contrôles de qualité européens de génotypage** en tant que membre du Global Network for the Molecular Surveillance of Multidrug Resistant Tuberculosis organisé par D. van Soolingen puis depuis 2017 par Richard Anthony (Tuberculosis Reference Laboratory of National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands).
Lors de chaque contrôle, 10 à 30 extraits d'ADN de *M. tuberculosis* sont à analyser par la méthode **MIRU-VNTR 24**, et depuis 2017 aussi par la méthode **WGS (WGS pilot EQA).**
Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA ont été :
- **4 premiers CQE (2011-2014) : MIRU** très bons **(scores >90%)** (cf publications *de Beer JL et al. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669* et *de Beer JL et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 May;18(5):594-600*).
- En raison d'une erreur d'adressage, nous n'avons pas reçu les échantillons du 5ème CQE de 2015.
- **6ème CQE** en **2016** : résultats excellents pour **MIRU** (**score 100%**)
- **7ème CQE** en **2017** : **score 95% pour MIRU et 100% pour WGS**
- **8ème CQE** en **2018** : **score 100% pour MIRU et pour WGS**

- **9ème CQE** en **2019 : score 100% pour MIRU et 80/100 pour WGS**. Pour le WGS, deux discordances ont fait baisser notre score: 1) Nous n'avons pas détecté un mélange de séquences *M.avium - M.tuberculosis* car les pipelines d'analyse de routine sont conçus pour traiter des génomes de souches isolées, mais pas des mélanges (-10 points). 2) Une mutation rare silencieuse dans FabG1 (Leucine203Leucine) était considérée dans le CQE comme impliquée dans la résistance à l'isoniazide, ce que nous contestons. Nous n'avions pas rapporté cette mutation (-10 points).

Accréditation

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche générale d'accréditation (norme NF EN ISO 15189) des laboratoires des groupes Pitié-Salpêtrière – Charles Foix (AP-HP) et Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (AP-HP). Le CNR-MyRMA participe aux différents groupes de travail mis en place pour l'accréditation globale de l'ensemble des laboratoires : (1) gestion des non-conformités, (2) contractualisation prescripteurs/ laboratoires (3) infrastructures et locaux. Ces groupes de travail incluent des membres du CNR-MyRMA et, plus largement, les personnels des laboratoires hébergeant le CNR.

Chacun des deux laboratoires (coordonnateur et associé) du CNR-MyRMA est, tout au long du processus qui s'étale sur 6 ans, accrédité à travers l'ensemble des laboratoires du groupe hospitalier auquel il appartient (« pôle biologie médicale »), ensemble considéré par le COFRAC comme un laboratoire unique (cf pièces jointes).

L'accréditation COFRAC concerne pour notre CNR le « Domaine Biologie Médicale », « Sous-domaine : Microbiologie » et les lignes BM MG8, BM MG11, BM MG12, BM MG3 + BA2.

- **Laboratoire coordinateur** : l'accréditation complète est prévue pour le dernier trimestre 2020. Par ailleurs, le laboratoire est habitilité « MOT », pour la détention des souches de *M. tuberculosis* ultra-résistantes (n° d'autorisation de détention = ADE-102322018-2).
- **Laboratoire associé** : accrédité pour toutes les portées de la microbiologie : examen microscopique, culture, identification, détection moléculaire, antibiogramme. Il est aussi accrédité pour le test IGRA (diagnostic d'infection tuberculeuse),, avec extension du test Elisa sur l'automate Etimax et sur Dynex DS2 avec la trousse Quantiféron® Gold Plus (Qiagen).

D'ACCREDITATION

COMITE FRANCAIS

cofrac

EXAMENS MEDICAUX

LBM Pôle Biologie, Pathologie, Physiologie des hôpitaux Universitaires St Louis, Lariboisière, Fernand-Widal

1 avenue Claude Vellefaux
75010 PARIS

est accrédité
is accredited

par la section Santé Humaine
by Healthcare section

selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du Cofrac sous le ou les numéro(s)

in compliance with ISO 15189 standard and the Cofrac rules of application under n°

8-3305

Pour : des activités d'examens médicaux
For: medical examination activities

Les activités couvertes et la validité de l'accréditation ainsi que les sites concernés sont précisés dans la ou les attestation(s) en vigueur qui lui a (ont) été délivrée(s).
Durant cette période, l'organisme s'engage à respecter à tout moment les exigences de l'accréditation.

The activities covered and the validity of accreditation as well as concerned sites are stipulated in the accreditation certificate in force which has been issued with it.
During this period, the organisation undertakes to abide at all times by the requirements of the accreditation.

Le Directeur Général
General Director

Bernard Doroszczuk

SH FORM 18 – Rév. 02 – Novembre 2013

Convention N° 5210

Section Santé Humaine

ATTESTATION D'ACCREDITATION
ACCREDITATION CERTIFICATE

N° 8-3253 rév. 14

Le Comité Français d'Accréditation (Cofrac) atteste que :
The French Committee for Accreditation (Cofrac) certifies that :

ASSISTANCE PUBLIQUE HOPITAUX DE PARIS - HOPITAUX UNIVERSITAIRES - PITIE SALPETRIERE - CHARLES FOIX
3 Avenue Victoria
75004 PARIS 4

SIREN N° 267500452

Satisfait aux exigences de la norme **NF EN ISO 15189 : 2012**
Fulfils the requirements of the standard

et aux règles d'application du Cofrac pour les activités d'examens/analyses en :
and Cofrac rules of application for the activities of examination/analysis in :

BIOLOGIE MEDICALE / BIOCHIMIE - HEMATOLOGIE - IMMUNOLOGIE - MICROBIOLOGIE - GENETIQUE
CLINICAL BIOLOGY / BIOCHEMISTRY - HEMATOLOGY - IMMUNOLOGY - MICROBIOLOGY - GENETICS

réalisées par / *performed by* :

AP-HP LBM des Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix Pôle Bio. Méd. Pathologie

et précisément décrites dans l'annexe technique suivante.
and precisely described in the following technical annexes.

L'accréditation suivant la norme internationale homologuée NF EN ISO 15189 est la preuve de la compétence technique du laboratoire dans un domaine d'activités clairement défini et du bon fonctionnement dans ce laboratoire d'un système de management adapté (cf. communiqué conjoint ISO/ILAC/IAF en vigueur disponible sur le site internet du Cofrac www.cofrac.fr)
Accreditation in accordance with the recognised international standard ISO 15189 demonstrates technical competence of the laboratory for a defined scope and the proper operation in this laboratory of an appropriate management system (see current joint ISO-ILAC-IAF Communiqué available on Cofrac website www.cofrac.fr).

Le Cofrac est signataire de l'accord multilatéral d'EA pour l'accréditation pour les activités objets de la présente attestation.
Cofrac is signatory of the European co-operation for Accreditation (EA) Multilateral Agreement for accreditation for the activities covered by this certificate.

Date de prise d'effet / *granting date* : **05/11/2019**
Date de fin de validité / *expiry date* : **31/03/2023**

Pour le Directeur Général et par délégation
On behalf of the General Director
La Responsable de l'Unité Ile-de-France et Territoires Insulaires
Unit manager - Paris Area and Island territories Unit

Pascale LIGER-GARNIER

Site	Site Pitié Salpêtrière 47-83 Bd de l'hôpital 75651 PARIS CEDEX 13

Elle porte sur les examens(s)/analyse(s) suivante(s) :

BIOLOGIE MEDICALE / Phases pré- et postanalytiques :

Prélèvement d'échantillons biologiques, effectué par le laboratoire ou sous sa responsabilité, et communication aux patients/cliniciens de résultats interprétés en :

- Biochimie générale et spécialisée (BIOCHBM)
- Pharmacologie Toxicologie (PHARMACOSTPBM - TOXICOBM)
- Hématocytologie (HEMATOBM)
- Hémostase (COAGBM)
- Auto-immunité (AUTOIMMUNOBM)
- Allergie (ALLERGBM)
- Immunologie cellulaire spécialisée et histocompatibilité (groupage HLA; ICELHISTOBM)
- Microbiologie générale (MICROBIOBM)
- Bactériologie spécialisée (BACTH)
- Parasitologie et Mycologie spécialisée (PARASITOMYCO)
- Virologie spécialisée (VIROH)
- Génétique constitutionnelle (GENCOBM)
- Génétique somatique (GENSOBM)

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

1. Techniques de référence disponibles au CNR-MyRMA

1.1.Techniques phénotypiques

Techniques de diagnostic
- Microscopie,
- Cultures en milieux solides et liquides.

Techniques d'identification
- Techniques phénotypiques classiques (caractères culturaux, morphologiques et biochimiques),
- Immunochromatographie (AgMPT64®, Eurobio…),
- Spectrométrie de masse en MALDI-TOF

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

Techniques de routine
- Antibiogramme par la méthode de référence (méthode des proportions) en milieu de L-Jensen industriels pour *M. tuberculosis*. Les milieux pour tester la sensibilité aux antibiotiques de 2ème ligne (kanamycine, amikacine, capréomycine, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine, PAS, linézolide, bédaquiline, délamanide) n'étant pas commercialisés, ils sont préparés et contrôlés par le CNR-MyRMA,
- Antibiogramme par la méthode de référence sur milieu liquide (MGIT960 TB),
- Détermination des CMI en milieu liquide MGIT avec utilisation du logiciel TBEXiST appliqué à une détermination semi-quantitative de la résistance de *M. tuberculosis*aux antituberculeux
- Détermination des CMI en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance lente et rapide (imipénème, cefoxitine, amikacine, streptomycine, tobramycine, clarithromycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, linézolide, minocycline, docycycline, tigecycline, trimethoprime-sulfamethoxazole, rifampicine, rifabutine, isoniazide, éthionamide, éthambutol),
- Détermination des CMI par bandelettes E-test pour certaines mycobactéries à croissance rapide,
- Pour *M.leprae :* inoculation dans le coussinet plantaire de la souris (Swiss et Nude) et observation de la croissance bactérienne chez les animaux traités avec les antibiotiques, par comparaison avec des animaux témoins non traités. Le résultat est disponible après 8 à 12 mois.

1.2. Techniques génotypiques

Les techniques génotypiques utilisées sont listées dans le **Tableau ci-dessous**, séparément pour l'identification, les tests de sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

Techniques génotypiques disponibles au CNR-MyRMA

a. Identification des espèces

Mycobactéries	**Techniques commercialisées**	**Séquençage**
*M. tuberculosis*complex	Cepheid Xpert MTB/RIF Génotype MTB-DR*plus** Génotype MTB-DRsl* Real Accurate *Mycobacterium tuberculosis* (Patho Finder)	
Espèces au sein du complexe *tuberculosis*	MTBC* MIRU-VNTR 2	
Mycobactéries non tuberculeuses "courantes"	Génotype CM* Genotype NTM-DR	
Mycobactéries non tuberculeuses "rares"	Génotype AS*	
Toutes		*rpoB, gyrA, gyrB* *rrs, rrl* Intergen.16s-23s(ITS) *hsp65*
M. *abscessus* complex		*Erm(41)*
M. ulcerans		IS2404
M. leprae	Génotype Leprae-DR*	RLEP

* Gamme Genotype, Hain Lifescience , en attente nouvelle version

b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Séquençage	Antibiotiques
*M. tuberculosis*complex	CepheidXpert RIF		rifampicine
	Gén. MTB-DR*plus**		rifampicine, isoniazide, éthionamide
	Génotype MTB-DRsl*VER 2.0 DIPLEX		amikacine, kanamycine, capréomycine, fluoroquinolones
		rpoB	rifampicine
		katG	isoniazide
		inhA	isoniazide, éthionamide
		pncA	pyrazinamide
		ethA	éthionamide
		ethR	éthionamide
		rrs, eis, tlyA	amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine
		rpsL	streptomycine
		embB, embC-A	éthambutol
		rrl, rplC	linezolide
		atpE, Rv0678	bédaquiline
M. abscessus complex		*erm(41), rrl*	macrolides
Mycobactéries atypiques	Génotype NTM-DR*	*rrl*	macrolides
M. leprae	Leprae-DR*	*rpoB, gyrA*	rifampicine, fluoroquinolones,
		folP1	dapsone
Toutes espèces		*rpoB*	rifampicine
		gyrA	fluoroquinolones
		gyrB	luoroquinolones
		rrs	aminosides

* Gamme Genotype, Hain Lifescience

c. Génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques)

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Autres techniques
*M. tuberculosis*complex	MIRU-VNTR 24 loci MIRU 4 loci hypervariables si souche Beijing	
Mycobactéries non tuberculeuses	REP-PCR Diversilab	Electrophorèse en champ pulsé

d. Séquençage génome entier (WGS)

Mycobactéries	Techniques
Toutes espèces	ILLUMINA MiSeq… (cf § WGS)

2. Marqueurs épidémiologiques disponibles

- **Marqueurs de résistance** (mutations chromosomiques) pour *M.tuberculosis*
- **Marqueurs utilisés pour le typage** (phylogénie et empreintes digitales) :

✓ MIRU-VNTR 24 loci (+les 4 loci supplémentaires hypervaraiables spécifiques pour les souches Beijing) pour *M.tuberculosis*
✓ REP-PCR pour les mycobactéries non tuberculeuses
✓ Spectrométrie de masse MALDI-TOF pour les mycobactéries non tuberculeuses
✓ Electrophorèse en champ pulsé pour les mycobactéries non tuberculeuses
✓ SNP 14676, 1642875, 2935685 pour *M.leprae*
✓ **Séquençage génome entier** (**WGS**)

Stockage des souches reçues au CNR-MyRMA

Les souches reçues sont conservées dans du 7H9 glycérolé dans un congélateur à -80°C.
Les biopsies de peau reçues au CNR-MyRMA pour recherche de *M.leprae* sont conservés à -80°C.
Les fichiers des souches stockées sont informatisés sur des ordinateurs du réseau de nos 2 hôpitaux et bénéficient de ce fait de sauvegardes régulières.
Les ADN extraits des souches pour analyse de biologie moléculaire sont conservés dans des congélateurs à -20°C ou -40°C.

Stockage des souches de référence

Description des souches
Nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M. tuberculosis*résistantes aux antituberculeux de première ligne. Pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles (**Tableau ci-dessous**).
Pour chaque souche de cette collection, le phénotype de résistance a été confirmé par la méthode des proportions (méthode de référence pour les antibiogrammes de *M.tuberculosis*), quantifié par la détermination de la concentration minima inhibitrice et le mécanisme de résistance a été caractérisé génétiquement.

Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques

Souche de *M.tuberculosis*	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	*inhA* -15CT	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible 1 mg/l
Isoniazide haut niveau	*KatG* S315T	100% résistance isoniazide 1 mg/l, sensible 10 mg/l
Rifampicine	*RpoB* S531L	100% résistance rifampicine 40 mg/l
Streptomycine	*Rpsl* L43A	100% résistance streptomycine 4 mg/l

Enfin le CNR-MyRMA **conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans (environ 10.000 souches).**

Conditions de mise à disposition des collections
Les souches sont à la disposition de tous les laboratoires et sont envoyées sur demande. Elles ont déjà été mises à la disposition des laboratoires de microbiologie du groupe Azay-mycobactéries (constitué par une trentaine de laboratoires des hôpitaux universitaires participant à la surveillance de la résistance primaire et secondaire) pour ceux qui voulaient organiser des contrôles de qualité internes.
Les souches de *M. tuberculosis*résistantes aux antituberculeux ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français possédant un local de sécurité biologique de niveau 3 (P3) et réalisant des tests de sensibilité. Les souches résistantes aux antituberculeux de deuxième ligne ne sont disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.
L'envoi de souches XDR fait l'objet d'une réglementation particulière et n'est possible qu'à des laboratoires détenteurs d'une autorisation MOT.

Liste des techniques (diagnostic/identification, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR-MyRMA pour les laboratoires de Bactériologie médicale désirant pratiquer la mycobactériologie

- Microscopie à fluorescence avec lampe LED ou optique après coloration de Ziehl-Neelsen,
- Cultures en milieu solides et liquides,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification génique (ex. hybridation sur bandelettes ou PCR temps réel) directement à partir des prélèvements de tout nouveau patient pour lequel l'examen microscopique est positif (recommandations du HCSP, 2014) ,
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures par hybridation directe avec amplification-hybridation sur bandelettes ou techniques immunochromatographiques (Ag MPT64), pour tout nouveau cas (recommandations du HCSP, 2014),
- Identification des mycobactéries non tuberculeuses courantes (*M.gordonae*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. kansasii*) dans les cultures par spectrométrie Maldi-Tof ou amplification-hybridation sur bandelettes
- Tests de sensibilité aux antibiotiques de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol) par méthode des proportions en milieu solide ou liquide,
- Recherche de mutation dans le gène *rpoB* pour la détection précoce de la multi-résistance par PCR avec sondes intégrées ou pCR puis hybridation inverse sur bandelettes ou séquençage, pour tout nouveau patient pour lequel les prélèvements ont un résultat d'examen microscopique positif (M+), ou pour lequel l'examen microscopique est négatif mais la culture positive (M-C+). Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. Le résultat de ces tests doit pouvoir être disponible dans un délai maximal de 72 heures

(recommandations du HCSP, 2014).

Sur la base de l'arrêté du 16 juillet 2007 et des recommandations européennes sur le confinement dans les laboratoires de biologie, la manipulation des échantillons destinés à la recherche de mycobactérie requière les conditions suivantes :
- examen microscopique et mise en culture : confinement L2,
- identification rapide d'une culture positive sans subculture (immunochromatographie, hybridation sur sonde sans amplification, amplification-hybridation sur bandelette, amplification avec sonde intégrée) : confinement L2,
- subcultures de mycobactéries non tuberculeuses (ex. antibiogramme) : confinement L2,
- subcultures de *M. tuberculosis*complexe (ex. antibiogramme) : confinement L3.

Afin de pouvoir le plus rapidement possible fournir au personnel soignant et l'entourage familial des patients les éléments permettant de guider la prise en charge des patients et les mesures sanitaires (ex. isolement des patients et enquête dans l'entourage), l'identification des cultures positives doit être menée le plus rapidement possible (dans les 72h) avec des techniques applicables dans tous les laboratoires pratiquant les primocultures car ne nécessitant pas de subculture et donc pas de confinement L3 :
- immunochromatographie (très rapide, peu coûteux),
- amplification génique suivie d'une hybridation réverse sur bandelette,
- amplification génique en temps réel avec hybridation sur sondes intégrées.

Annexe 3 : Fiche RCP

Fiche standardisée pour les RCP mycobactéries non-tuberculeuses

RCP "MNT" du CNR-MyRMA											
Identité du patient											
Nom :	**REMPLIR LES CASES JAUNES MERCI**			**Date naissance :**			**Age:**				
Prénom :				**Sexe :**			**Poids**				
Médecin/biologiste référents											
Médecin :				**Biologiste :**							
Établissement :				**Adresse:**							
Tel:	**joignable lors de la RCP pour discuter du dossier**			**Tel:**							
email:				**email:**							
Informations sur le cas											
Identification CNR:				**Présentation clinique:**	respiratoire, extrarespiratoire (disséminée, ganglionn						
Immunodepression (ID):	exemple: aucune, vih, leucémie …			**ID médicamenteuse:**	exemple: corticoide, methotrexate, anti-TNFa						
Formes pulmonaires criteres ATS:	oui/non		**Nouveau cas:**	oui/non	**Antécédent de traitement:**	oui/non					
Si oui type de lésion à l'imagerie: nodulaire, cavitaire			**Rechute:**	oui/non	Si oui détail, exemple 3 mois d'azithromycine						
Histoire de la Maladie (synthèse)											
Historique de l'antibiothérapie et chirurgie Exemple: du 01/01/2018 au 01/02/2018 amikacine iv + tigecycline, du 02/02/2018 au 05/07/2018 azithromycine											
Prélèvements bactériologiques. JOINDRE AU DOSSIER LES RESULTATS DU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE											
Evolution Bactério	Date de prélèvement		1/1/18	MERCI DE REMPLIR LE DETAIL DES PREVELEMENT BACTERIOLOGIQUES							
	Type de prélèvement		LBA	CF EXEMPLE							
	Microscopie		5-10 BAAR/champs								
	Culture		positive M. abscessus								
Antibiotique	**Génotype CNR**	**Phéno. CNR S/ R (CMI)**									
Amikacine	*rrs*		commencé le	1/1/2018							
Azithromycine	*rrl*										
Cefoxitine											
Ciprofloxacine											
Clarithromycine	*erm41*										
Doxycycline											
Imipénème											
Linezolide											
Minocycline											
Moxifloxacine											
Tigécycline											
Tobramycine											
Cotrimoxazole											
Ethambutol											
Rifampicine											
Rifabutine											
Clofazimine											
Question posée											
Date:											
Staff N° 1		date :	**Discussion / Décision**								
Médecins présents	V. Jarlier										
J. Robert	F. Mougari										
N. Veziris	E. Cambau										
J. Jaffré	E. Lecorche										
A. Aubry	H. Benmansour										
Refaire des prélèvements			Oui	Non							
Traitement antibiotique			Mise en rout	Changement	Traitement adapté						
Traitement chirurgical à discuter			Oui	Non							
Déclaration ARS/Santé Publique France			Non	A faire	Faite n°e-sin:						
Suivi Microbiologique			Oui	Non							
Suivi Clinique et Paraclinique			Oui	Non							