Rapport d'activité pour l'année 2020
Juin 2021

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

APHP.Sorbonne Université

Site Pitié-Salpêtrière

Responsable : Pr Jérôme ROBERT

Laboratoire associé

Service de mycobactériologie spécialisée et de référence

Département des agents infectieux

DMU BioGem, APHP.Paris-Nord

Site Bichat

Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

SOMMAIRE

RESUME ANALYTIQUE 2020 ..... **6**

ANALYTICAL SUMMARY 2020 ..... **9**

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR-MYRMA **12**

2. ACTIVITES 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 14
2.3. COLLECTIONS DE SOUCHES 14
2.4. RESULTATS DES EXPERTISES MICROBIOLOGIQUES 14

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE **36**

3.1. SURVEILLANCE DE LA TUBERCULOSE RESISTANTE 36
3.2. SURVEILLANCE DE LA TUBERCULOSE A *MYCOBACTERIUM BOVIS* 44
3.3. SURVEILLANCE DE LA MENINGITE TUBERCULEUSE A TRAVERS LE RESEAU CNR-MYRMA, TENDANCES EVOLUTIVES 45
3.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS, DE LA TUBERCULOSE 45
3.5. REGISTRE DES CAS DE TUBERCULOSE MDR 46
3.6. SURVEILLANCE DE LA LEPRE EN FRANCE 46
3.7. ETUDE GENOTYPIQUE DES SOUCHES DE *M. TUBERCULOSIS* : DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES 47
3.8. ETUDE GENOTYPIQUE DES SOUCHES MULTIRESISTANTES (MDR) 50

4. ALERTES **57**

4.1. TUBERCULOSE 57
4.2. MYCOBACTERIOSES 57

5. ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL **61**

5.1. FORMATIONS, INFORMATIONS ET CONSEILS DESTINES AUX PROFESSIONNELS DE SANTE 61
5.2. ACTIVITES DE CONSEILS AUX AUTORITES SANITAIRES 65

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR **67**

6.1. TRAVAUX DE RECHERCHE 67
6.2. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 68

7. COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENTAUX **72**

7.1. SANTE ANIMALE 72
7.2. ENVIRONNEMENT 72
7.3. ALIMENTATION 72

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES 2 ANNEES SUIVANTES **73**

8.1. EXPERTISE 73
8.2. TRAVAUX DE RECHERCHE APPLIQUEE 76
8.3. APPUI THERAPEUTIQUE 78
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 79
8.6. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE EUROPEENS 79

ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR **81**

ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR **88**

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Evolution des activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2020 **15**
Tableau 2. Identification des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA 2010-2020 **16**
Tableau 3. Evolution de 2006 à 2020 du nombre de souches de mycobactéries non tuberculeuses issues d'adénites cervicales chez des enfants âgés de moins de 5 ans **17**
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 2020 **18**
Tableau 5. Evolution de 2001 à 2020 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 6. Répartition par régions des laboratoires ayant envoyé l'échantillon biologique (prélèvement ou souche) des patients MDR au CNR-MyrMA depuis 2014 **20**
Tableau 7. Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2020 **21**
Tableau 8. Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2020 pour antibiogramme de 2e ligne, dans un contexte autre que la multirésistance (suspicion initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1re ligne…) **22**
Tableau 9. Nombre de recherches génotypiques de résistance par biologie moléculaire (bandelettes Hain, PCR-séquence, Deeplex, WGS) sur les souches de *M. tuberculosis* complex reçues de 2010 à 2020 **24**
Tableau 10. Distribution des mutations des gènes Rv0678 et *atpE* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2020 pour détection moléculaire de la résistance à la bedaquiline (technique : séquençage Rv0678 et atpE) **26**
Tableau 11. Distribution des mutations des gènes *rrl* et *rplC* dans les souches de *M. tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2020 pour détection moléculaire de la résistance au linezolide (technique : deeplex et wgs *rrl* et *rplC*) **27**
Tableau 12. Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2020) **29**
Tableau 13. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2010 à 2019 : distribution des cas à culture positive selon la région. Pour 2019, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année. **37**
Tableau 14. Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2019 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 2019 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA. **41**
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 1992-2019) **42**
Tableau 17. Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2010 à 2019 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA. **42**
Tableau 18. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants chez les enfants en France entre 2009 et 2019 **43**
Tableau 19. Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 1992 à 2019 **44**
Tableau 20. Nombre et % de tuberculose à *M. bovis* en France, réseau AZAY-Mycobactéries, 2014-2019 **44**
Tableau 21. Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2019 **45**
Tableau 22. Nombre annuel de cas de lèpre diagnostiqués par le CNR-MyrMA depuis 2013 **47**
Tableau 23. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyrMA en 2020, classés selon le contexte épidémiologique **48**
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 2020 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage) **48**

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 2020 **50**
Tableau 26. Evolution de 2006 à 2020 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées 1, 2 et 3, et en vert lignée 4) **51**
Tableau 27. Résumé des analyses de grappes des cas de tuberculose MDR – 2006-2020 **55**
Tableau **28**. Résumé des activités de conseil assurées par la RCP du CNR-MyrMA de 2006 à 2020 **63**

Figure 1. Organigramme du CNR-MyRMA **12**
Figure 2. Evolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2020 **20**
Figure 3. Dendrogramme circulaire (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique des 362 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* de la période 2006-2020). La longueur des branches est proportionnelle à la distance en SNPs entre les génomes. **Fig.A.** Les clades sont indiqués par des caractères de couleur (Beijing en rouge, Haarlem en vert clair, Ghana en bleu clair, LAM en bleu foncé). **Fig.B**. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite (MDR en bleu, XDR en rouge, preXDR en blanc). **31**
Figure 4 A, et B. Dendrogrammes (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique de 60 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* groupées en clusters (2006-2020). **Fig.A.** Les clades sont indiqués par des caractères de couleur. La longueur des branches en SNPs est indiquée sur les branches. **Fig.B.** La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite. **33**
Figure 5 : résultat de comparaison génomique par méthode UMPGA (74 123 SNPs) pour 9 souches de *M. chelonae* **34**
Figure 6 : Comparaison des 10 souches de *M. mucogenicum* par méthode UMPGA (57 434 SNPs) **35**
Figure 7 : Comparaison de 10 souches de *M. chelonae* **35**
Figure 8. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 1995 à 2019 : nombre total des cas inclus dans la surveillance, nombre de CHU participants et nombre de régions (ancien découpage). **36**
Figure 9. Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019 **37**
Figure 10. 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 1995-2019 **38**
Figure 11. Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019 **38**
Figure 12. Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019 **40**
Figure 13. Distribution régionale schématique des cas de tuberculose MDR en 2019 **41**
Figure 14. Dendrogramme circulaire obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M. tuberculosis* (méthode UPGMA). A) Visualisation des clades. B) Visualisation des phénotypes. Le nombre de SNP identifiés entre les groupes de souches reliées est indiqué sur les branches. **52**
Figure 15. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 74 souches de *Mycobacterium chimaera*: A) présentation de toutes les souches y compris des souches non liées à l'épidémie; B) présentation de toutes les souches du groupe 1 présentant moins de 200 SNPs entre elles; . **58**

Résumé analytique 2020

Enjeux de santé publique

Les mycobactéries comprennent 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*) 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 antituberculeux 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 (définition de la « multirésistance, MDR » jusqu'en 2020) et encore plus en cas de résistance supplémentaire aux fluoroquinolones et aux aminosides (ex. amikacine) (définition de « l'ultrarésistance, XDR » jusqu'en 2020). 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 2020

Améliorations techniques et évaluation

Evaluation d'un algorithme d'interprétation des spectres MALDI-TOF MS pour l'identification des mycobactéries
Nous avons développé une analyse des spectres MALDI-TOF MS pour l'identification des 3 sous-espèces de *Mycobacterium abscessus* (MABSC) (supsp. *abscessus, bolletii* et *massiliense*).

Diagnostic moléculaire rapide de la tuberculose et de sa résistance à la rifampicine et à l'isoniazide grâce au test automatisé MDR/MTB ELITe MGB®.
Nous avons montré que le test automatisé MDR/MTB ELITe MGB® est très prometteur et semble être un test diagnostique d'intérêt pour la détection rapide de la MDR-TB directement à partir d'échantillons cliniques.

Evaluation d'une approche combinant l'automate GeneLEADVIII et le kit Deeplex Myc-TB® pour détecter en 8 jours la résistance à 13 antituberculeux et la transmission du complexe Mycobacterium tuberculosis directement à partir de prélèvements cliniques.
Nous avons montré que la stratégie couplant l'utilisation de ces deux nouvelles plateformes permet de détecter de manière très fiable directement à partir d'échantillons cliniques, en 8 jours, le complexe *M. tuberculosis* et sa résistance à 13 antituberculeux, et d'identifier la transmission potentielle des souches de patient à patient à l'aide du spoligotypage (avec toutefois un pouvoir discriminant plus faible pour le spoligotypage Deeplex, en particulier pour le groupe des souches de la famille Beijing).

Détection de *Mycobacterium leprae* par PCR temps réel quantitative

En 2020, nous avons mis en place une amplification en temps réel quantitative (amplification des séquences RLEP) afin de mieux pouvoir quantifier la charge bacillaire. Cette détection fait l'objet d'un contrôle de qualité externe international qui a été satisfaisant en 2020.

Expertise des souches et prélèvements reçus

Activité d'expertise microbiologique
Le CNR-MyRMA a effectué 2058 actes d'expertise : 717 pour identification, 480 pour tests phénotypiques de résistance, 474 pour tests génotypiques de résistance, 155 pour génotypage et 63 (biopsies) pour diagnostic de lèpre.

Identification des espèces sur les souches reçues
M. tuberculosis complexe : 94% *M. tuberculosis*, 2,7% *M. africanum*, 2,4% *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 66 souches en 2020 dont 6 XDR.
- Résistance aux principaux antituberculeux de 2ème ligne parmi les souches MDR : 16% à au moins un des 3 aminosides (kanamycine, amikacine, capréomycine), 18% aux fluoroquinolones, 1% à la bédaquiline et aucune résistance au linézolide et au délamanide.

Mycobactéries non tuberculeuses
Proportion de résistance acquise chez les souches de patients déjà traités (résistance 2aire par sélection de mutants sous traitement) : (a) clarithromycine : 16,4% chez *M. avium-intracellulare* complex, 3,2% chez *M. abscessus subsp. abscessus* ; (b) amikacine 7,5% chez *M. abscessus* ; (c) 1,4% à la rifampicine chez *M. kansasii*.

M.leprae
Aucun cas de résistance à la dapsone ou la rifampicine parmi les 12 cas de lèpre diagnostiqués en France et testés en 2020.

WGS
169 séquençages complets de génomes (WGS) ont été effectués en 2019 : 125 souches de *M. tuberculosis* et 44 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
- 1823 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2019 par 43 CHU (recueil mené en 2020)
- caractéristiques principales des cas : 5,8 % antécédents de traitement ; 5,1 % VIH+ ; 72,3 % nés à l'étranger
- taux de résistance 1aire (pas d'antécédent de traitement) : 10,4 % à au moins un des 4 antituberculeux de 1ère ligne (10,4 chez les patients nés en France mais 10,0 % chez ceux nés à l'étranger), 5,7 % à l'isoniazide ; 1,9 % à la rifampicine : taux de multirésistance 1aire : 1,6% (inférieur à 2018)
- taux de résistance 2aire (antécédents de traitement) élevé : 27,7% à l'isoniazide, 20,8% à la rifampicine et 19,8% 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 (94%) 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 très complexe en raison de la pandémie Covid-19 et le taux de réponse est faible (44% vs 77% en 2018 et >90% les autres années). Au total, 2415 cas de tuberculose à culture positive ont été enregistrés en 2019,
- 81 cas MDR en 2018, soit quasi identique à 2018 (n=82)
- 51% des cas sont en Ile-de-France, 79% nés à l'étranger.

Surveillance de formes particulières de tuberculose
- Tuberculose à *M. bovis* en 2019 (à travers le réseau AZAY-Mycobactéries des CHU) : 2,4% des cas de tuberculose ce qui est, avec 2018, le pourcentage le plus élevé depuis 2014 (0,9 à 2,1%).
- 3 cas de méningite tuberculeuse chez les enfants ≤ 5 ans ce qui ne confirme pas l'augmentation de 2017 mais proche des chiffres de 2014 à 2016.

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

- 7 cas de lèpre ont été bactériologiquement confirmés en 2020 (< 2018) par le CNR-MyRMA sur le territoire français et transmis à l'OMS. Ce sont tous des nouveaux cas : 3 originaire de Mayotte, 1 chez des malades issus de chacun des pays suivants : Inde, Népal, Burkina-Faso, Sénégal.

Etude génotypique des souches de *M. tuberculosis* pour l'investigation de cas groupés
Tuberculose sensible
- le génotypage de 55 souches a permis de confirmer une relation entre les cas dans 13 situations soumises à enquête (total 34 parmi 55 cas) qui comportaient chacune de 2 à 5 cas reliés (contextes variés : famille, professionnel, scolaire, foyers, communautaire).
- en milieu de soins, le génotypage a permis de confirmer une relation dans 1 situation (2 cas) de transmission malade à malade.

Tuberculose MDR
L'analyse détaillée de 65 souches MDR-XDR de 2020, incluant le résistome et le WGS, a permis d'établir un lien bactériologique très probable pour 27 (42%) souches avec des cas MDR des années antérieures (11 clusters), ou avec d'autres cas de 2020 (8 clusters).

Interactions avec les autorités sanitaires

Alertes aux autorités sanitaires (ARS, InVS, DGS) pour :
- 27 épisodes de cas groupés de tuberculose par génotypage (14 de TB sensibles et 13 de TB MDR) ont fait l'objet de d'échanges d'alertes notamment les CLAT correspondants.
- Dans le cadre des suites de l'épidémie européenne d'infections post-CEC à *M. chimaera,* le CNR-MyRMA a finalisé l'étude par WGS des souches françaises (cas et environnement).
- 1 enquête autour de cas d'infections à *M. chelonae* associées aux soins (infections sur cathéters), sans mise en évidence de la source.

Information et formation
- le site internet http://cnrmyctb.free.fr a été régulièrement mis à jour.
- en 2020 accueil de 3 stagiaires.
- en 2020 les missions avec déplacement ont été annulées.

Réunions de Concertation Pluridisciplinaires des infections à mycobactéries organisées par le CNR-MyRMA
RCP du Groupe thérapeutique « Tuberculose » :
- 167 dossiers pour 130 patients ont été discutés dont 69 cas de tuberculose MDR-XDR de 2020 ou des années précédentes, 22 pour sujets « contact » de cas R ou MDR pour discussion de prophylaxie, 4 cas de tuberculose MDR non diagnostiqués en France, 34 cas de tuberculose compliquée non MDR.
- RCP du Groupe thérapeutique « Mycobactériose » et RCP « lèpre » :
- 12 réunions pour discuter des cas de 85 patients atteints de mycobactériose et 10 réunions spécifiques lèpre pour analyser 21 dossiers.

Conseils auprès des autorités sanitaires et scientifiques
Nationales
- SpFr : infections à MNT liées aux soins, lèpre, eDO;
- HCSP et HAS : lèpre.
- INSERM - AVIESAN : pilotage de « l'Action Tuberculose » de l'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M).
- CA-SFM : antibiogramme des MNT
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 les tests de sensibilité aux antituberculeux, et WGS.
- EUCAST (European Union Committee 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 et détermination des CMI ; activité de trésorier de l'ESGMYC.
- OMS : Technical Advisory Group « Lèpre » (élaboration du programme de lutte contre la lèpre) ; surveillance de la résistance aux antibiotiques (OMS NTD)
ERS : membre du collège d'expert et de 'ERS fellowship and awards working group ».

Publications et communications en relation avec le travail mené au CNR

- 22 publications internationales et 2 nationales ou ouvrages
- 11 conférences sur invitation : 8 internationales, 3 nationales
- 16 communications : 10 internationales, 6 nationales
- 1 organisation de colloque / congrès

Analytical summary 2020

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*) 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 locally-born (mainly >60 years), and young (mainly 20-44 years) foreign-born patients.
Resistance to antituberculous drugs is a major issue because of the risk of failure of the standard treatment regimen. Resistance to both INH+RIF (defining "multi-drug resistance, MDR-TB", up to 2020) dramatically restricts the therapeutic options, even more in case of additional resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides (e.g. amikacine) (defining "extensively-resistance, XDR-TB " up to 2020). In these situations, 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 antileprosy 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 for 2020

Technical improvement and evaluation of new methods

Evaluation of an algorithm for interpreting mass spectrometry spectra for mycobacteria identification
we developed a new analysis of MaldiTof-Ms spectra for identifying sub-species of *M. abscessus* (subsp. *abscessus, bolletii* and *massiliense*).

Rapid molecular diagnosis of TB and drug resistance to isoniazid and rifampicin by using the automated MDR/MTB ELITe MGB® assay
We have shown that the new MDR/MTB ELITe MGB® assay was very promising and seems of interest to be used for rapid detection of MDR-TB directly from clinical samples.

Evaluation of a new strategy combining the GeneLEADVIII automated assay to the Deeplex Myc-TB® assay for detecting resistance to 13 antituberculosis drugs and cross-transmission directly from clinical samples
This strategy has been proven to be effective in detecting drug resistance to most antituberculosis drugs and for evaluating cross-transmission by using spoligotyping (although a low discriminant power for isolates of the Beijing family).

Detection of *M. leprae* in clinical samples by using quantitative realtime PCR
In 2020, we have implemented a new quantitative realtime PCR in order to better evaluate bacillary load in clinical samples. The quality of this method has been evaluated by an international EQA, which was satisfactory in 2020.

Analysis of isolates and samples

In 2020, the NRC performed 2058 microbiological analyses including: 717 for identification, 480 for phenotypic AST, 474 for genotypic AST, 155 for genotyping and 63 for leprosy.

Species identification
- Among *M. tuberculosis* complex isolates: 94% *M. tuberculosis*, 2.7% *M. africanum*, 2.4% *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
- In 2020, 66 MDR strains were sent to the CNR-MyRMA, including 6 XDR isolates.
- Among all MDR isolates, 16% were resistant to at least one of second line injectable drugs (kanamycin, amikacin, capreomycin), 18% to fluoroquinolones, 1% to bedaquiline and none to linezolid and delamanid.

Non-tuberculous mycobacteria (NTM)
Proportions of acquired resistance to antimicrobial agents (selection of resistant mutants) were (a) for clarithromycin: 16.4% in *M. avium-intracellulare* complex, 3.2% of acquired resistance in *M. abscessus subsp abscessus*; (b) for amikacin: 7.5% in *M. abscessus* (c) 1.4% to rifampicin in *M. kansasii*.

M. leprae
No case of resistance to dapsone or rifampicin was detected among the 12 leprosy cases tested 2020.

Whole genome sequencing
169 whole genome sequencing have been performed in 2020: 125 *M. tuberculosis* and 44 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)
- 1823 culture-positive TB cases diagnosed in 2019 (study conducted in 2020)
- Main characteristics: 5.8% previously treated TB; 5.1% HIV-positive; 72.3% born outside France.
- Primary resistance rates (untreated patients): 10.4% of resistance to at least one of the first line drugs (10.4% in patients born in France and 10.0% in foreign born patients; 57% to isoniazid, 1.9% to rifampicin, and 1.6% of MDR (lower than in 2018).
- Secondary resistance rate (previously treated patients): 27.7% to isoniazid, 20.8% to rifampicin, and 19.8% MDR.
- Nearly all MDR cases were in foreign born patients
- 94% 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% in 2018 and 44% in 2019). Overall, 2415 culture-positive TB cases were reported in 2019.
- 81 MDR cases were recorded, very similar to 2018 (n=82)
- 51% of the cases are diagnosed in Paris area, 79% are foreign-born.

Surveillance of specific forms of TB
- TB due to *M. bovis* in 2019*:* 2.4% cases reported through the University hospitals network, similar as 2018 and the highest rates since 2014 (0.9% to 2.1%).
- TB meningitis: 3 cases among children ≤ 5 yo (indicator for BCG vaccination policy efficacy) in 2019, which does not confirm the highest number of 2017 and is similar to 2014-2016.

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
- 7 cases of multibacillary (MB) form of leprosy were diagnosed in Metropolitain France in 2020 (< 2019) and notified to WHO-GLP. All were new cases, 3 coming from Mayotte, and 1 in each of the following places: India, Nepal, Burkina-Faso, Senegal.

Genotypic study of clinical isolates of *M. tuberculosis* for epidemiological purpose
Non-MDR TB
-by genotyping, we confirmed epidemiological links between TB cases in 13 different situations (total 34 cases, among 55 cases) in various contexts (family, professional exposure, school, shelter). In addition, 1 cluster of 2 cases was identified in healthcare settings, in a case of patient-to-patient transmission.

MDR-TB
By genotyping, 65 MDR-XDR isolates from 2020 (using WGS, and resistome) allowed to identify a link for 27 (42%) cases with MDR patients from previous years (11 clusters), and within the same year (8 clusters).

Interaction with health authorities

Involvement in health authorities' actions for specific events
- 27 clusters identified (14 of susceptible TB & 13 of MDR TB) led to exchanges between NRC and authorities
- NRC participated to the European investigation of the outbreak of post-cardiac surgery invasive *M. chimaera* infections – NRC completed the study of French isolates.
- 1 investigation around cases of healthcare-associated MNT catheter infections (*M. chelonae*).

Information, training, involvement in quality control for clinical laboratories
- NRC website (http://cnrmyctb.free.fr) is regularly updated
- NRC received 3 fellows.
- Missions outside France have been canceled in 2020.

Counselling for difficult to treat mycobacterial infections (therapeutic consilium)
- MDR-TB therapeutic consilium: in 2020, 167 patients' charts for 130 patients have been discussed: 69 MDR-XDR cases; 22 persons in contact with MDR-TB cases for prophylaxis; 4 MDR cases diagnosed outside of France; "' non MDR complicated TB cases.
- "NTM" consilium and "Leprosy" consilium: 12 meetings were organized in 2020 to review 85 NTM patients' charts, and 10 meetings for 21 leprosy cases.

Counselling to health and scientific authorities
National
- SPF & ANSM: leprosy, NTM infections linked to healthcare, eDO electronic mandatory notification.
- INSERM: TB thematic (scientific meetings, grant review, symposia)
- HCSP & HAS: working groups for leprosy
- CA-SFM: drug-susceptibility testing for NTM

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 program; (b) working group on susceptibility testing and on WGS
- EUCAST (European Union Committee 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. Treasurer of the ESGMYC group.
- WHO: member of the leprosy advisory group (elaboration of leprosy programm); NRC is leading the WHO surveillance network for drug resistance in leprosy; surveillance of antibiotic resistance for the NTD program
- ERS: member of the expert group for TB and of the "ERS fellowship and award" working group

Publications and communications on the theme
- 22 international and 2 national publications
- 11 invited conferences: 8 at international, and 3 at national meetings
- 16 communications during meetings: 10 internationals, and 6 national meetings
- 1 conference 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 microbiologie médicale dont les activités sont complémentaires (cf. organigramme Figure 1) ce qui permet de répondre à l'ensemble de ses missions.

Figure 1. Organigramme du CNR-MyRMA

Nom de la personne assurant les fonctions de responsable adjoint : Pr Emmanuelle Cambau

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 - 01 42 16 20 83 bureau médical - Télécopieur : +33 (0)1 42 16 20 72
DMU BioGem, Directeur Rachel LEVY
Courriel : cnr.myctb.psl@aphp.fr, francesca.catalano@aphp.fr
Responsable médical et scientifique : Pr Jérôme ROBERT - jerome.robert@aphp.fr
Responsable administratif : Marie-Anne RUDER, Directrice du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière

- ***Laboratoire associé***

Le laboratoire associé a déménagé ses locaux en 2020. Les nouveaux locaux sont situés depuis le 2 juin 2020 au rez-de-chaussée du bâtiment principal de l'hôpital Bichat (locaux conjoints avec le CNR du paludisme et IMEA). Depuis le 2 juin 2020 le laboratoire associé est hébergé par le nouveau Service de mycobactériologie spécialisée et de référence (CR 244)
Département des agents infectieux, DMU BioGem, APHP-GHU Paris-Nord
Rez de chaussée, Hôpital Bichat
46 rue Henri Huchard, 75018 Paris
01 40 25 71 73, réception ; 01 40 25 80 35 bureau médical ;
Responsable médical et scientifique : Pr Emmanuelle CAMBAU, emmanuelle.cambau@aphp.fr
Responsable administratif : Pierre ROSMORDUC, Direction DMU BioGem GHU Paris-Nord

2. Activités d'expertise

2.1. Evolution des techniques et travaux d'évaluation

Diagnostic moléculaire rapide de la tuberculose et de sa résistance à la rifampicine et à l'isoniazide grâce au test automatisé MDR/MTB ELITe MGB®.

Le kit MDR/MTB ELITe MGB® (ELITech) porté par la plateforme ELITe InGenius est un nouveau test PCR en temps réel qui permet l'extraction automatisée et la détection simultanée de l'ADN du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et des mutations des gènes *rpoB, katG* et de la région promotrice *inhA* (pro-inhA) associées respectivement à la résistance à la rifampicine (RIF) et à l'isoniazide (INH), les deux marqueurs de la tuberculose multirésistante (MDR). L'objectif de notre étude était d'évaluer les performances du nouveau test sur une collection de souches et sur un ensemble d'échantillons cliniques obtenus en routine. Des échantillons cliniques (n=242) provenant de la routine et des ADN précédemment extraits de notre collection de souches (n=54) ont été testés comparativement au diagnostic clinique de tuberculose (TB) et à l'antibiogramme génotypique (gDST) comme références. En considérant les 242 échantillons cliniques, la sensibilité et la spécificité de la détection de MTB par ELITe étaient respectivement de 90,9% et 97,5%. Pour la détection des mutations conférant une résistance sur des échantillons cliniques positifs, nous avons observé une parfaite concordance avec le gDST pour *katG* et pro-*inhA* (κ=1,0) et 2 résultats discordants pour *rpoB* en raison d'une mutation rare Asn438Asp non associée à la résistance, et d'une mauvaise interprétation par le système InGenius® sur un échantillon de type sauvage (κ=0,82). En considérant les 54 souches de notre collection, une très bonne concordance avec le gDST a été observée pour la détection des 25 mutations distinctes présentes dans *rpoB*, *katG* et pro-*inhA*, avec des valeurs kappa de respectivement 0,95 et 0,88 et 0,95. Tous les résultats discordants étaient dus à des mutations rares survenant dans des régions qui ne sont pas ciblées par le test, notamment Val251Phe sur *rpoB*, Ser140Gly, Arg249Pro et Trp689Gly sur *katG*, et -60C>G sur pro-*inhA*. En conclusion, le test automatisé MDR/MTB ELITe MGB® est très prometteur et semble être un test diagnostique d'intérêt pour la détection rapide de la MDR-TB directement à partir d'échantillons cliniques.

Evaluation d'une approche combinant l'automate GeneLEADVIII et le kit Deeplex Myc-TB® pour détecter en 8 jours la résistance à 13 antituberculeux et la transmission du complexe *Mycobacterium tuberculosis* directement à partir de prélèvements cliniques.

L'automate GeneLEADVIII (Diagenode, Belgique) est une nouvelle plateforme entièrement automatisée pour l'extraction d'ADN et la détection par PCR du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) directement à partir d'échantillons cliniques. Le test Deeplex Myc-TB® (Genoscreen, France) est un kit diagnostic basé sur le séquençage NGS à grande profondeur d'un mélange d'amplicons 24-plexés permettant simultanément la détection de la résistance à 13 antituberculeux (anti-TB) et la détermination du spoligotype de MTBC. Nous avons évalué la performance d'une stratégie combinant ces deux outils moléculaires pour (i) détecter directement à partir d'échantillons cliniques, en 8 jours, le complexe *Mycobacterium tuberculosis* et sa résistance à 13 antituberculeux, et (ii) identifier la transmission potentielle des souches de patient à patient à l'aide du spoligotypage. En utilisant cette approche, nous avons criblé 112 échantillons cliniques (dont 65 frottis négatifs à l'examen microscopique) et 94 souches de MTBC issues de notre collection. La sensibilité et la spécificité de l'approche GeneLEAD/Deeplex Myc-TB pour la détection du MTBC étaient respectivement de 79,3 % et de 100 %. Pour 46 échantillons cliniques et 94 souches, des résultats positifs ont été obtenus par Deeplex Myc-TB, dont 85,4 % présentaient une sensibilité et une résistance prédite en accord avec les tests phénotypiques. Il est important de noter que le test Deeplex Myc-TB a permis de détecter 100 % des MTBC multirésistants (MDR) testés. Les taux de concordance les plus faibles ont été trouvés pour le pyrazinamide, l'éthambutol, la streptomycine et l'éthionamide (84,5 %, 81,5 %, 73 % et 55 %, respectivement), pour lesquels la détermination de la sensibilité ou de la résistance est généralement difficile par l'approche phénotypique. L'une des principales difficultés de Deeplex Myc-TB est d'interpréter les variants non synonymes non caractérisés (NSUV) qui peuvent représenter jusqu'à 30 % des SNP détectés en Deeplex. Nous avons observé un bon niveau de concordance entre le spoligotypage donné par le Deeplex Myc-TB et ceux de l'approche de typage de référence en épidémiologie moléculaire (MIRU-VNTR). On note toutefois un pouvoir discriminant plus faible pour le spoligotypage Deeplex, en particulier pour le groupe des souches de la famille Beijing. Le temps moyen pour obtenir des résultats complets à partir d'échantillons cliniques par l'approche GeneLEAD/Deeplex Myc-TB était de 8 jours, ce qui souligne que l'approche GeneLEAD/Deeplex Myc-TB pourrait constituer une avancée majeure dans le diagnostic rapide de la tuberculose multirésistante en routine.

Détection de *Mycobacterium leprae* par PCR temps réel quantitative

Le diagnostic bactériologique de la lèpre comprend depuis 2001 la détection par PCR de l'ADN de *M. leprae*. Jusqu'à présent, cette détection était faite par PCR en point final selon le protocole décrit par Yoon et al. J Clin Microbiol 1993 ;31(4) :895-899, qui amplifie les séquences RLEP, répétées 35 à 37 fois dans le génome de *M. leprae*. En 2020, nous avons mis en place une amplification en temps réel quantitative afin de mieux pouvoir quantifier la charge bacillaire. Cette qPCR amplifie aussi les séquences répétées RLEP. Nous testons systématiquement 3 aliquots du fait de la répartition parfois aléatoire des bacilles dans l'échantillon. Ce test a été présenté lors de congrès nationaux en 2019. Cette détection fait l'objet d'un contrôle de qualité externe international qui a été satisfaisant en 2020**.**

Méthode de référence de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur *M. tuberculosis*

Dans le cadre de notre mission européenne pour EUCAST, nous avons mis au point une méthode de référence pour déterminer les CMI 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 déterminés selon un même protocole par 4 laboratoires de référence européens en multicentrique (institut de médecine tropicale, Lisbonne, Portugal ; Publich health laboratory, Stockholm, Suède ; Institut San Rafael, Milan, Italie) dont le nôtre. Le protocole a été finalisé lorsque la répétabilité et la reproductibilité supérieures à 95% étaient obtenues pour les 3 antibiotiques.
Ce protocole a été approuvé en 2019 par le comité général de l'EUCAST, et publié sur le site de EUCAST (https://eucast.org/mycobacteria). Trois publications ont été faites à ce sujet en 2020 : descriptif de la méthode, résultats de l'étude multicentrique, et commentaire sur la place de la méthode de référence et les besoins de calibration des méthodes utilisées en diagnostic et les perspectives. Ce protocole sera dorénavant celui réclamé aux industriels afin de pouvoir définir des « concentrations critiques » (CC) pour les nouveaux antituberculeux. Il permettra aussi de remettre à jour ces CC pour les anciens antituberculeux conformément à ce qui est fait au niveau européen pour toutes les bactéries et les 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 (CQE) avait 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). L'ANSM ne souhaite plus renouveler de CQE pour les mycobactéries en raison de la lourdeur et du coût de la procédure, c'est principalement pourquoi le CNR-MyRMA n'a pas organisé de nouveau CQE en 2020 car cette activité ne peut être entreprise uniquement par le CNR-MyRMA. Le contexte sanitaire 2020 a renforcé cette décision.

2.3. Collections de souches

Toutes les souches de mycobactéries reçues sont stockées et consignées dans le fichier informatique correspondant.

2.4. Résultats des expertises microbiologiques

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 Deeplex (« antibiogramme moléculaire ») : une semaine
- **antibiogramme phénotypique complet** pour *M. tuberculosis* : 1,5 à 2,5 mois.

En 2020 le CNR-MyRMA a effectué 2058 actes d'expertise pour 1 ou plusieurs tests, comme suit :
- **717 pour identification**
- **480 pour tests phénotypiques de sensibilité**
- **474 pour tests génotypiques de sensibilité**
- **155 pour génotypage épidémiologique**
- **169 pour WGS**
- **63 biopsies pour diagnostic de lèpre et tests génotypiques de sensibilité**

Tableau 1. Evolution des activités d'expertise du CNR- MyRMA de 2010 à 2020

Souches soumises à	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Identification	794	988	897	900	871	801	752	858	889	813	717
M. tuberculosis	366	385	430	492	501	417	393	460	443	336	292
Mycob. atypiques	428	603	467	408	370	384	359	398	446	477	425
Tests phénotypiques de sensibilité	468	551	542	464	548	508	480	556	560	514	480
M. tuberculosis[b]	160 (126)	170 (139)	217 (164)	211 (181)	236 (212)	240 (188)	214 (162)	277 (228)	270 (194)	261 (154)	221 (107)
Mycob. atypiques	308	381	325	253	312	268	266	279	290	253	259
Tests génotypiques de sensibilité	223	278	358	325	434	435	468	529	501	532	474
M. tuberculosis	201	232	284	267	281	285	236	280	230	220	236
Mycob. atypiques	22	46	74	78	153	150	232	249	271	312	238
Génotypage épidémiologique[c]	153	119	276*	203	227	194	160	227	445	248	155
M. tuberculosis	153	119	267*	198	225	174	153	197	344	228	140
Mycob. atypiques	-	-	9	5	2	20	7	30	101	20	15
Séquençage génome (WGS)								68	217	224	169
M. tuberculosis								38	119	141	125
Mycob. atypiques								30	98	83	44
Biopsies lèpre[d]	25 (7)	51 (22)	53 (24)	45 (25)	87 (31)	70 (30)	74 (23)	111 (27)	111 (33)	106 (33)	63 (12)

b : dont (N) souches pour lesquelles il y a eu un **antibiogramme de 1re ligne et 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

2.4.1. Identification des souches

717 souches de mycobactéries reçues en 2020 ont été soumises à identification : 292 souches étaient du complexe *M. tuberculosis* et 425 étaient des mycobactéries non tuberculeuses.

Souches de M. tuberculosis complex

Parmi les 415 s*ouches de M. tuberculosis* complexe reçues en 2020, **292 (70%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce.** La décision prise début 2017 d'identifier jusqu'à l'espèce par des méthodes moléculaires toutes les souches du complexe *M. tuberculosis* (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,* mais réalisons néanmoins systématiquement cette identification à l'espèce pour les souches MDR.
Parmi ces 292 souches on note (Tableau 2) :
- 274 ***M. tuberculosis*** (**94%**), espèce principale responsable de tuberculose humaine,
- **7 *M. bovis* (2,4%).** 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.
- **3 *M. bovis var BCG* (1%)** (nombre en baisse par rapport à 2015, dans la lignée des années précédentes),
- **8 *M. africanum* (2,7%).** Depuis 2010, ce nombre est compris entre 6 et 24.

Tableau 2. Identification des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA 2010-2020

Espèces	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Identification au sein du complexe	157	242	201	277	189	191	194	424	389	334	292
M. tuberculosis	140	212	164	240	153	169	168	390	360	290	274
M. bovis	6	12	13	11	11	6	4	5	11	12	7
M. africanum	6	7	8	15	8	14	9	24	10	23	8
M. bovis var BCG	5	9	13	11	16	2	12	5	7	9	3
M. caprae								0	1	0	0
M. canettii		1	3					0	0	0	0
M. microti		1			1		1	0	0	0	0
M. tuberculosis complex sans identification au sein du complexe	209	143	229	215	312	226	198	36	54	203	122
Total *M. tuberculosis* complex	366	385	430	492	501	417	393	460	443	537	414

Souches de mycobactéries non tuberculeuses

La répartition des principales espèces parmi les 425 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues pour identification en 2020 était la suivante :

- **181 souches du complexe *M. avium* (MAC)** (43% du total) dont 75 *M. avium,* 45 *M. intracellulare* et 50 *M. chimaera*. Parmi ces souches, **174 (96%) ont été considérées comme responsables d'infections**, essentiellemnt respiratoires.

- **80 souches de *M. abscessus*** (19% du total) : 63 *M. abscessus subsp. abscessus,* 6 *M. abscessus subsp. bolletii*, 11 *M. abscessus subsp. massiliense*, **dont 57 (71 %) responsables d'infections**
  - 73 étaient issues de prélèvements respiratoires (dont 29 de patients atteints de mucoviscidose), et **50 considérées comme responsables d'infections**
  - 7 étaient issus de prélèvements cutanéo-muqueux (5), ou ostéo-articulaires (1) **considérées comme responsables d'infections**.

- 46 **souches de *M. xenopi*** (11% du total) toutes considérées comme responsables d'infections.

- **26 souches de complexe *M. fortuitum* et apparentés** (6% du total) dont 16 *M. fortuitum fortuitum*, 3 *M. mucogenicum,* 4 *M. peregrinum*, 2 *M. septicum,* 1 *M. conceptionense* **dont 20 (77%) considérées comme responsables d'infections** : 5 infections respiratoires, 5 infections sur dispositif vasculaire (PAC), 5 infections cutanéo-muqueuses, 3 infections ostéo-articulaires, 1 adénopathies, 1 ORL

- **30 souches** (7% du total) **de *M. chelonae et apparentées (M. salmoniphilum)*** dont **22 (73%) considérées comme responsables d'infections** : 21 infections extra-respiratoires (12 cutanéo-muqueuse,1 ostéo-articulaire, 2 kératites conjonctives, 6 bactériémies) et 1 infection pulmonaire.

- **17 souches de *M. kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose, **toutes considérées comme responsables d'infections.**

- **12 souches de *M. simiae*** dont **9 considérées comme responsables d'infection**

- **33 souches réparties en 14 espèces rares hors complexes *avium*, abscessus, *fortuitum* et *chelonae*** (7% 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. szulgai (n=5), M. malmoense* (n= 5), *M. lentiflavum (n=2), M. herakliense* (n=2), *M. goodii (n=1), M. wolinskyi (n=1).*

Quelques souches de mycobactéries non tuberculeuses (n = 10) appartenant à des espèces rares n'ont pas été identifiées jusqu'à l'espèce car il n'y avait pas d'indication médicale.

Au total, 89% des souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2020 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 2006-2020

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 2020.
On note une diminution semblable à celle des années 2014-2018 alors qu'il y avait eu une augmentation en 2019 du nombre de souches du complexe MAC reçues.
L'augmentation du nombre de souches *de M. chimaera* (5 en 2014, 29 en 2015, 44 en 2016, 63 en 2017, 56 en 2018, 68 en 2019 et 46 en 2020) 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 souche de *M. avium* reçue en 2020 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 3**).**

Tableau 3. Evolution de 2006 à 2020 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
2020	1

2.4.2. Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

Tests phénotypiques de sensibilité de M. tuberculosis complex

Les tests de sensibilité sur **221 souches de *M. tuberculosis* en 2020** ont consisté en :

- seulement un **antibiogramme** « **standard de 1ère ligne** » (antituberculeux **de 1ère ligne**) pour **54 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. A noter l'utilisation de l'automate Bactec MGIT 960 pour cette indication depuis 2020.

- un antibiogramme « **complet** » (antituberculeux **de 1ère ligne et de 2ème ligne**) pour **107 souches**, **dont 66 envoyées pour multirésistance** et **43 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 avaient des **intolérances médicamenteuses**).

- un **antibiogramme partiel** pour **un seul antibiotique pour 60 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 médicamenteuse et pour lesquels il était prévu de prescrire une fluoroquinolone).

Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne des 161 souches reçues pour cela en 2020

- **23%** étaient **multisensibles**, c.a.d. sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine)

- **77%** étaient **résistantes** à au moins un des 4 antibiotiques ci-dessus, dont **40%** étaient **phénotypiquement multirésistantes** (MDR) c.a.d. résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine. (Tableau 4).

La proportion de souches multisensibles parmi les souches *de M. tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA a encore baissé en 2020 (42% en 2019 vs 23% en 2020), 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 autres laboratoires de mycobactériologie, 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 génotypique à ces antibiotiques, et uniquement lorsque le laboratoire d'origine n'est pas en mesure de réaliser cette analyse.

Résistance aux antituberculeux de 2ème ligne de 167 souches reçues en 2020

Souches reçues pour multirésistance (MDR) (n = 66)

Sur les 66 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 plus élevées pour les antituberculeux de première ligne (streptomycine, éthambutol, pyrazinamide), éthionamide et la cyclosérine (Tableau 4).
Pour les antituberculeux qui entrent dans la définition de l'ultrarésistance (XDR) avant le changement de définition par l'OMS, la résistance à **au moins un injectable de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) était de 16%, et de 18% aux fluoroquinolones.**

Les pourcentages inquiétants de résistance à la bédaquiline, au délamanide, ou au linezolide observés en 2017-18, n'ont pas été retrouvés en 2019-2020. Cependant il faut noter que le délamanide n'a pu être testé que sur une partie des 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 2020

	Années (n souches testées)	**2010 (45)**	**2011 (64)**	**2012 (92)**	**2013 (83)**	**2014 (111)**	**2015 (98)**	**2016 (71)**	**2017 (79)**	**2018 (80)**	**2019 (69°)**	**2020 (66°)**
a	Ethambutol	66	70	58	66	70	65	55	53	66	58	55
	Pyrazinamide				40	50	43	48	48	60	66$^{\mu}$	63$^{\mu}$
	Streptomycine	75	80	70	73	81	69	72	67	79	78	70
b	Amikacine	13	9	13	20	12	14	12	4	9	6*	3*
	Kanamycine	20	23	27	41	31	26	20	22	21	15*	15*
	Capréomycine	12	11	14	23	18	13	14	5	9	10*	5*
c	Fluoroquinolones	23	22	28	30	39	20	17	18	25$^{\$}$	17$^{\$}$	18
d	Ethionamide	75	82	62	73	64	71	52	23	36	87	95$^{\#}$
e	PAS	9	17	17	24	14	5	10	9	14	24$^{\mu}$	12$^{\mu}$
	Cyclosérine	9	18	28	24	19	10	13	13	21	48	44
	Bédaquiline					3	2	0	3	6	0	1
	Linézolide	0	0	1	0	1	1	1	4	4	1	0
	Délamanide									5$^{£}$	0$^{£}$	0$^{£}$

a: antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine
b: aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition XDR pre-2021) ; c : entre dans la définition de XDR
d : ou prothionamide ; e : antibiotiques de « dernière ligne »
$^{\mu}$ % calculé sur respectivement 59 et 49 souches en 2019 et 57 et 50 souches en 2020 qui ont eu un test de sensibilité au pyrazinamide et au PAS
* 4 souches résistantes aux 3 aminosideszn 2019, 2 en 2020

$ 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 en 2019.
§% 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 et 10 souches en 2020
° : 4 souches non testées phénotypiquement (trop dysgoniques) en 2019 et 2020
: sur 41 souches uniquement, car problème de fournisseur

La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **aussi** aux fluoroquinolones **et** à au moins un injectable de réserve (définition **XDR avant 2021**) était de **9%** soit **5 souches XDR identifiées en 2020 par méthode phénotypique et une par méthode génotypique (**Tableau 5**).**

Tableau 5. Evolution de 2001 à 2020 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	82µ	78	100	10	12
2018	82µ	81	100	11	13
2019	73**	82	89	10	14
2020	66	nd*	nd*	6	9

* 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 recensés au total en 2019 par le CNR, 2 ont été diagnostiqués seulement par les tests génotypiques sur prélèvement, la culture étant restée négative.
µ souches MDR provenant de Polynésie et NIle Calédonie, alors que le réseau de laboratoires du CNR MyRMA ne couvre pas les TOM

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. Il semble y avoir un impact majeur de la pandémie de Covid-19 en 2020 avec diminution notable du nombre de souches reçues.**
Le **nombre de souches XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 **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 5) a augmenté entre les périodes 2001-02 (~60 %) et 2010-15 (98-100 %). **Le CNR-MyRMA reçoit donc la quasi-totalité des souches MDR de France, en cohérence avec les recommandations du HCSP.** Seul un Laboratoire n'adresse pas ses souches mais participe à la surveillance (déclare les souches MDR) par le réseau de laboratoire.

Evolution 2006-2020 de la distribution par pays de naissance des patients porteurs des souches MDR reçues au CNR-MyRMA

Le CNR-MyRMA adresse en début d'année un rapport à Santé Publique France dès que les données annuelles sur les souches MDR reçues dans l'année sont disponibles. Ces données sont reprises ici.

La Figure 2 montre l'évolution de la distribution du nombre de cas MDR selon la zone géographique de naissance des patients sur les 15 dernières années. **En 2020,** cette distribution est globalement superposable à celle de la décennie précédente. En effet, les cas MDR de 2020 sont principalement dus aux patients nés dans les pays d'ex-URSS, en Afrique (hors Maghreb) et en France.

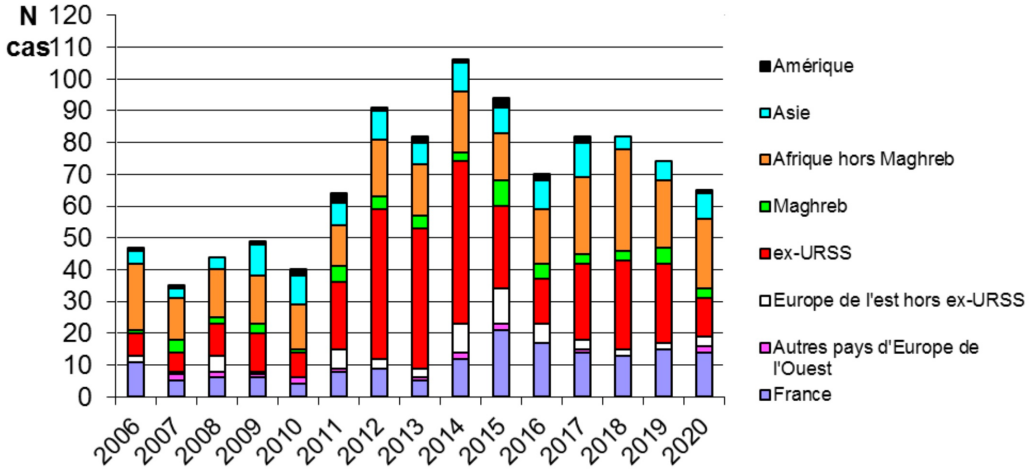


Figure 2. Evolution de la distribution des cas MDR selon le pays de naissance de 2006 à 2020

Le Tableau 6 ci-après montre que les souches MDR reçues au CNR ces six dernières années (hormis 2018 faisant exception) sont majoritairement adressées par les laboratoires franciliens. La dispersion des cas MDR sur le territoire français en 2020 est ainsi superposable à celle des années antérieures. Une des souches MDR de 2020 est issue de Polynésie Française, seule région d'Outre-mer (avec La Réunion) à faire face à des cas MDR.

Tableau 6. 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**	**2020**
Auvergne, Rhône-Alpes	13	11	5	5	9	4	7
Bourgogne, Franche-Comté	2		1		1		2
Bretagne		2	2	3	4	3	4
Centre-Val-de-Loire	2	1	1	3	4	1	
Corse	1	1					
Grand-Est	5	3	4	2	7	4	2
Guadeloupe							
Guyane							
Hauts-de-France	8	6	4	4	6	4	6
Île-de-France	58	48	32	41	29	42	30
La Réunion	2			1			
Martinique							
Mayotte							
Normandie	6	3	3	4	2	2	
Nouvelle-Aquitaine	2	11	6	6	7	5	5
Occitanie	7	5	2	3	5	3	4
Pays de la Loire		4	2	3	2	3	2
Provence-Alpes-Côte d'Azur	6	3	8	2	4	3	3
Nouvelle Calédonie							
Polynésie Française		1	1	4	2	1	1
Total	**112**	**99**	**71**	**82**	**82**	**75°**	**66**

° 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 7 **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. Le nombre de 2020 est en baisse notable par rapport à ces années.**
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). Ils **sont très majoritairement nés en Géorgie**.
A noter aucun cas XDR né en France en 2019 et 2020**.**

La proportion de souches XDR parmi les souches MDR a varié notablement depuis 2001 : 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 ces dernières années.**

Tendances évolutives 2006-2020

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 entre 70 et 80 cas par an jusqu'en 2019. En 2020, le nombre de souches a été de 66, soit bien inférieur aux années précédentes, mais ce nombre demeure cependant au-dessus de la moyenne de la période avant 2010.**

En 2020, 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 <u>nombre</u> 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 <u>proportion</u> 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%, en étant toutefois inférieure à 10% en 2020.**

Le nombre de **souches « pré-XDR »** (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones **<u>ou</u>** à un des trois injectables 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). Il existe depuis une légère diminution des cas.

Tableau 7. Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2020

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique sub-saharienne	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)**
2020			6 (3 Géorgie, 1 Moldavie, 1 Russie, 1 Tchéthénie)	**6 (9,1)**

Souches de M. tuberculosis complex reçues dans un contexte autre que la multirésistance (n=101)

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine sont plus basses parmi les 101 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 8 **ci-dessous**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui est bien sûr logique **: fait important et positif aucune résistance à l'amikacine ni aux fluoroquinolones n'ont été détectées dans ces autres souches non MDR.**

La faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR (<1% pour la période 2010-20209) 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 8. Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches de *M. tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2010 à 2020 pour antibiogramme de 2e 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)**	**2020 (101)**
Ethambutol	13	13	3	5	4	2	5	1	7	0	5
Streptomycine	43	43	28	36	22	24	26	20	25	5	11
Amikacine	3	3	0	1	0	1	0	0	1	0	0*
Fluoroquinolones	0	0	1	2	2	0	0	2	0	0	0*
Ethionamide	59	59	66	40	62	-*	-*	-*	-*	5*	6*
PAS	11	11	3	8	8	6	5	2	3	3	2*

*les antituberculeux non utilisés hors multirésistance, ne sont plus testés systématiquement sur les souches non MDR

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 259 souches des espèces médicalement importantes et soumises à tests phénotypiques de résistance sont les suivants :

***M. avium* complex** : parmi 181 souches reçues en **2020, 88 ont fait l'objet d'un antibiogramme phénotypique** (49%) **(52 *M. avium,* 18 *M. intracellulare, 18 M. chimaera*). Parmi ces 88 souches,** 12 (13,6%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI entre 32 et > ou = 64 mg/l en milieu MH). Parmi les patients ayant des antécédents connus de traitement (n=61), 10 avaient une souche résistante à la clarithromycine, soit **16,4 % de résistance secondaire. Il y a eu tout de même**1 cas de résistance primaire, pour lequel le dossier clinique est étudié pour savoir s'il y a eu une prise de macrolides antérieurement.

M. xenopi : **28 des 34 souches** reçues en 2020 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 adressée n'était pas pure). 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 17 souches** reçues en 2020 ont fait l'objet d'un antibiogramme. **Au total, entre 2012 et 2020, une seule des 71 souches de *M. kansasii* reçues était résistante à la rifampicine,** il s'agissait d'un cas de résistance secondaire.

Espèces à croissance rapide (130 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. En fonction du polymorphisme de ce gène, est corrélée une résistance naturelle inductible (variant *erm41 abscessus T28 / boletti*) ou bien une sensibilité naturelle (variant *erm41 abscessus C28/ massiliense)*. (cf plus loin détection des résistances génotypiques).

- Parmi les 80 **souches de *M. abscessus*** testées phénotypiquement (57 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=62) :
- 57 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
- **2 souches avaient une résistance acquise** dès la lecture précoce (confirmée par biologie moléculaire (cf plus loin)
- 3 souches étaient phénotypiquement sensibles

. *M. abscessus subsp massiliense* (n=12) : 9 souches étaient normalement sensibles à la clarithomycine et **3 souches avaient une résistance acquise de haut niveau** (CMI > 16 mg/l)
. *M. abscessus subsp bolletii* (n=6) : toutes avaient la résistance naturelle inductible propre à cette sous espèce.
Les souches de *M. abscessus* ayant une résistance acquise de haut niveau à la clarithromycine étaient issues de patients atteints de mucoviscidose pour 4 /5 d'entre elles.
Par ailleurs, **6 de ces 80 souches** (2 *M. abscessus, 4 M. massiliense*) avaient une **résistance acquise** à **l'amikacine** dont 4 étaient issues de prélèvements respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose.

- Parmi les 24 souches du complexe *M. fortuitum* testées :
  . 18 souches (16 *M. fortuitum fortuitum, 1 M. septicum, 1 M. houstonense*) étaient normalement résistantes à la clarithromycine (résistance naturelle) mais sensibles aux fluoroquinolones
  . 3 souches de *M. mucogenicum, 2 M. peregrinum,* et 1 souche de *M. conceptionense* étaient normalement sensibles à la clarithromycine et aux fluoroquinolones.
- Parmi les 26 souches de *M. chelonae* testées, toutes étaient normalement sensibles à la clarithromycine et à la tobramycine.

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

En 2020, les nombres de souches testées pour détection moléculaire de mutations impliquées dans la résistance sont les suivants :

- **236 souches de *M. tuberculosis* pour un total de 2014 recherches génotypiques de résistance.**
- **238 souches de mycobactéries non tuberculeuses**
- **12 biopsies positives pour la recherche de *M. leprae*** (directement à partir des biopsies puisque cette espèce ne cultive pas)

En 2020, 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.

Mutations impliquées dans la résistance de M. tuberculosis complex

Le nombre de recherches de mutations a doublé depuis 2010 (Tableau 9).

- **Rifampicine (RIF)**

Les approches d'**amplification-hybridation GenoType MTBDR*plus*®, PCR-séquençage, Deeplex et WGS** *ont* permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 117 des 209 (56 %)** tests réalisés en 2020.
La distribution des mutations était comme suit :
- **68 mutations S531L (58 % des mutations**)
- 2 mutations rares S531F
- **12 mutations D516Y (10 %) et 10 mutations L533P (8,5%) associées à un bas niveau de résistance à la rifampicine (fréquemment interprétées "Sensible")**
- 10 mutations sur le codon 526 : H526D ou H526Y (8,5 %)
- 15 mutations moins fréquentes (13 %) réparties entre les codons 513 et 533, qui **ont été identifiées par analyse du gène *rpoB par approches Deeplex ou WGS*.**

La **mutation S531L du gène *rpoB* reste la mutation dominante dans la résistance à la rifampicine (de l'ordre de 2/3 depuis 2010).** On peut noter en 2020 une **augmentation de la part des mutations associées à un bas niveau de résistance à la rifampicine** : en particulier D516Y et L533P qui représentent 18,5% du total des mutations détectées.

Tableau 9. Nombre de recherches génotypiques de résistance par biologie moléculaire (bandelettes Hain, PCR-séquence, Deeplex, WGS) sur les souches de *M. tuberculosis* complex reçues de 2010 à 2020

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Rifampicine	201	232	284	267	281	285	231	280	224	213	209
Isoniazide	198	227	280	263	284	285	236	278	230	220	211
Pyrazinamide	137	183	217	211	225	210	179	250	229	168	229
Fluoroquinolones	128	183	231	215	232	238	185	267	210	177	236
Ethionamide	50	79	103	93	119	106	70	89	88	138	199
Aminosides	56	99	159	121	156	156	172	244	206	204	208
Ethambutol	62	105	159	121	155	222	172	254	213	180	209
Linezolide								78*	90	171	198
Bédaquiline								29*	88	177	201
Délamanide*									104	109	114
Total	**832**	**1109**	**1433**	**1291**	**1452**	**1502**	**1244**	**1769**	**1578**	**1648**	**2014**

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

- **Isoniazide (INH)**

Pour l'isoniazide, des **mutations dans *katG* ou *inhA* ont été identifiées pour 164 des 211 (78 %) souches testées en 2020.**

- 111 fois**, une mutation S315T de *kat*G,** corrélée à une résistance phénotypique de haut niveau à INH, dont 94 mutations isolées, 16 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA,* et 1 associée à une deuxième mutation dans KatG (K557N).

- 2 fois, **une mutation rare S315N** qui confère la résistance à l'INH

- 11 fois, **une mutation dans *katG* à une position autre que 315. On note l'identification par le système DEEPLEX d'un mutant hétérogène présentant une double mutation (katG G279D (13%) G182V (34%).**

- 57 fois, une mutation dans la **région régulatrice du gène *inhA,* soit seule** (28 fois, alors responsable d'une résistance phénotypique **à bas niveau à INH), soit associée à une mutation dans *katG* (**17 fois**) ou InhA, la cible de l'INH (12 fois),** alors responsable d'une résistance phénotypique **à bas niveau**. A noter, ces mutations peuvent être associées dans une même souche, par exemple KatG A109T + InhA I194T + promoteur *inhA* 15C>T. **La mutation de type « -15 c>t » était la plus fréquente (n=39, 68%).**

On note en 2020 la **part dominante de la mutation isolée S315T dans KatG** qui représente 75 % des cas de résistance à l'INH (en accord avec les données internationales). Les **mutations dans KatG autres que S315T** (N=11) représentent 7% du total des mutations détectées (ces mutations sont difficiles à interpréter). Les **mutations isolées de type « -15 c>t »** dans la région régulatrice du gène *inhA* représentent quant à elles 17 % des cas. Des **mutations rares** (1%) peuvent être détectées.

En 2020, nous n'avons pas détecté de souches phénotypiquement résistantes à l'isoniazide pour lesquelles il n'a pas été détecté de mutation ni dans KatG, ni dans les régions régulatrices de *inhA,* ni dans la région codant la cible InhA.

- **Pyrazinamide (PZA)**

L**'analyse du gène *pncA*** qui code pour la pyrazinamidase, enzyme qui transforme le PZA, prodrogue inactive, en acide pyrazinoïque, antibiotique actif, a été effectuée **pour 229 souches en 2020** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).

Au total, **78 souches (34 %) avaient une mutation du gène *pncA*** (65 mutations faux-sens, 5 mutations en position –11 dans le promoteur, 3 délétions, 1 insertion et 4 mutations silencieuses). 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.

- **Éthionamide (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 199 souches en 2020**.

Des mutations ont été détectées dans ***etha-ethR*** chez 60 souches (**30%**). Ces mutations concernaient, comme classiquement décrit, essentiellement le gène *ethA* (45 mutations faux-sens, 14 délétions et 1 insertion). Nous n'avons pas détecté de mutations dans la zone intergénique *ethA-ethR* . 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.

Des mutations dans le **promoteur du gène *inhA*** (positions -8 et -15), également responsable de la résistance à l'éthionamide, ont été trouvées dans 52 souches (**26%**), soit en association avec des mutations *ethA* (10 souches), soit isolées (42 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)**

Des **mutations dans le gène *gyrA* ont été identifiées dans 22/236 souches étudiées** (**9%**)**.** Le codon **le plus souvent modifié** était le **codon 94 (12/22), ce qui est habituel, suivi du codon 90 (7/22).**

La recherche de mutations dans le **gène *gyrB*** a permis l'identification de 9 mutations pouvant être associées à un phénotype résistant (par exemple, A504V, G559A, D461N).

Aminosides

Au total, **208 souches ont été étudiées en 2020**. Les résultats montrent la présence d'une mutation **a1401g dans le gène *rrs* (résistance à KAN et AMK) pour 5 d'entre elles (2,5%). Dix-sept souches (8%) avaient des mutations dans le promoteur du gène *eis* (résistance à KAN)**: c-37t (n=3), c-14t (n=3), c-12t (n=5), g-10a (n=5), et c-15g (n=1).

- **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, **209 souches ont été étudiées** en 2019 et la présence d'une **mutation du gène *embB* a été détectée pour 73 d'entre elles (35%)**. Parmi ces 73 souches, 47 (**64%**) avaient une mutation du **codon EmbB-306** : M306V (n=28), M306I/L (n=19). Les autres principaux codons mutés dans EmbB étaient les codons 497 (n=6) et 406 (n=10), les autres étant plus rares. **10 souches avaient une mutation dans le promoteur *embB*** : --11c→a (n=1), ,--12c→t (n=3), -16 c→a ou t (n=6).

- **Bédaquiline**

L'analyse 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 effectuée au total **pour 201 souches en 2020**.
Des **mutations (Tableau ci-dessous) ont été détectées chez 9 souches dans Rv0678 (4,5 %).**

Tableau 10. Distribution des mutations des gènes Rv0678 et *atpE* dans les souches de *M. tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2020 pour détection moléculaire de la résistance à la bedaquiline (technique : séquençage Rv0678 et atpE)

Gène		**2017**	**2018**	**2019**	**2020**
Rv0678					
Mutations	L117Q	**1**			
	W42G,	**1**	**1**		
	L142R		**1**		
	R89P			**1**	
	R90L			**1**	**1**
	F100C			**2**	**1**
	I67T			**1**	
	S151P			**2**	
	E55D			**2**	**2**
	Y92Stop ou D				**2**
	M73I				**1**
	S68C				**1**
	Insertion				
	Délétion		**1**	**1**	
			1	**1**	**1**
Pas de mutation		27	84	166	183
PCR négatives ou résultat ininterprétable		1	0	0	9
Total		**29**	**88**	**177**	**201**
atpE					
Mutations		**0**	**0**	**0**	**1[a]**
Pas de mutation		28	88	83	161
PCR négatives		1	0	0	1
Total		**29**	**88**	**83**	**163**

[a] Mutation **I66M**

Pour la première fois depuis 2017, une mutation I66M a été identifiée dans AtpE

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.

- **Linézolide**

L'analyse des gènes *rrl* et *rplC*, codant pour l'ARN 23S et la protéine ribosomale L3, effectué depuis 2017 pour recherche de la résistance au linézolide, a été effectuée **pour 198 souches en 2020**. Des **mutations** (Tableau 11 **ci-dessous**) ont été détectées chez 5 souches (**2,5%**).

- **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.

Nous avons analysé 114 génomes en 2020 au niveau des gènes : *ddn*, *fgd1, fbiA, fbiB* et *fbiC.* Au total, nous avons détecté pour **Ddn** une mutation W88STOP pour 1 souche. Nous n'avons pas détecté d'autre mutation pour Fgd1, FbiA, FbiB ou FbiC.

Tableau 11. Distribution des mutations des gènes *rrl* et *rplC* dans les souches de *M. tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2017 à 2020 pour détection moléculaire de la résistance au linezolide (technique : deeplex et wgs *rrl* et *rplC*)

Gène		**2017**	**2018**	**2019**	**2020**
rrl					
Mutations	g2573t	**0**	**1**	**0**	
	G2307A	**0**	**0**	**1**	
	A1401G	**0**	**0**	**1**	
	C1093T	**0**	**0**	**1**	
	C344T	**0**	**0**	**1**	**1**
	C492T				**1**
	A2880G				**1**
	G2399A				**1**
Pas de mutation		77	89	162	183
PCR négatives		1	0	5	11
Total		**78**	**90**	**171**	**198**
rplC					
Mutations	C154R	**3**	**2**	**0**	**1**
Pas de mutation		74	88	167	187
PCR négatives		1	0	4	10
Total général		**78**	**90**	**171**	**198**

Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries non tuberculeuses

238 souches de mycobactéries non tuberculeuses reçues en 2020 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®.

- **Souches d'espèces à croissance lente du complexe MAC : 134 souches**

. résistance acquise à la clarithromycine liée à des mutations des nucléotides 2057 à 2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S : **7 des 134 souches** (**5%**) **portaient une mutation impliquée dans la résistance** (*M. avium* (n=4), *M. intracellulare* (n=2) et *M. chimaera*, (n=1).

. résistance acquise aux aminosides liée à la mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S a été détectée chez **3 souches (2%)** de *M. avium* et 1 souche de *M. chimaera*.

- **106 souches d'espèces à croissance rapide**

  - ***80 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 58/62 des souches de *M. abscessus subsp. abscessus*, et 6/6 des souches de *M. abscessus subsp. bolletii*

. **génotype sauvage (pas de mutation acquise de résistance à la clarithromycine)** chez 9/12 souches de *M. abscessus subsp. massiliense* (espèce naturellement sensible car dépourvue d'un gène *erm(41)* fonctionnel et naturellement sensible) et chez 3 des 4 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 :

- ✓ a2058c chez 1 souche de souche de *M. abscessus subsp. massiliense et 1 M. abscessus subsp. abscessus* T28 (en plus de la résistance naturelle inductible comptée ci-dessus)
- ✓ a2058g chez 1 souche de *M. abscessus subsp. massiliense*
- ✓ a2059c chez 1 *souche de M. abscessus subsp. abscessus C28.*

  - ***Résistance acquise aux aminosides***

Résistance par mutation a1408g du gène *rrs* codant l'ARNr16S chez 5 des souches déjà listées ci-dessus : 4 *M. abscessus subsp. massiliense et*1 *M. abscessus subsp. abscessus* T28.

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

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

En **2020**, nous avons reçu **63 biopsies** pour **51 patients** français ou résidants en France, ce qui est moins important que les années précédentes, du fait de la pandémie COVID-19, de la limitation de l'immigration et de l'arrêt des transports avec les territoires français d'outre-mer.

L'examen microscopique ou la PCR RLEP étaient positifs pour 23 patients (28 prélèvements) des 51 patients, soit 45% des patients et 44.4% des prélèvements. Ces cas de lèpre multibacillaires correspondaient à 10 nouveaux cas et 13 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 **10 nouveaux cas avérés** vivaient dans les **DOM-TOM (**n = 4 en Nouvelle Calédonie : 3 à Mayotte), ou étaient des **immigrants résidant en France métropolitaine (n = 3** dont 1 venant d'Inde, 1 du Sénégal et 1 du Népal).

Pour 5/10 des nouveaux cas et les 7/13 des cas de suspicion de rechute, les gènes de résistance ont pu être étudiés et toutes les souches **étaient multisensibles.**
Pour les 5 autres nouveaux cas pour lesquels la PCR des gènes de résistance était négative, la PCR RLEP était positive mais l'examen microscopique négatif (3 cas), ou faiblement positif (< 5 baar/lame, 2 cas).

Analyse rétrospective des résultats 2001- 2020 pour les cas de lèpre diagnostiqués en France

Un total de 857 biopsies a été reçue de 2001 à 2020 pour 672 patients suspects de lèpre, dont 343 biopsies positives par examen microscopique ou amplification génique (40,0%), ce qui a permis le diagnostic de lèpre pour 271 patients (40.3%) dont **88 vivants en France métropolitaine et 183 dans les DOM-TOM**. Les patients étaient originaires des DOM-TOM (n=162, 59,8%), d'Afrique (n=80, 29.5%), d'Asie (n=15, 5.5%), d'Amérique (n=7, 2,6%), 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, 2,2%).
Parmi les 284 cas diagnostiqués ou suivis, 232 étaient des nouveaux cas (81.7%) et **52 des rechutes** ou aggravation sous traitement (18.3%).

Un **antibiogramme moléculaire a été obtenu pour 257 (211 nouveaux cas et 46 rechutes) des 284 cas (90.5%) : 239 cas multisensibles et 18 cas résistants (6,3%) dont 10 primaires (8 à DDS et 2 aux fluoroquinolones) et 8 secondaires (5 à DDS et 3 à la rifampicine).** Aucun cas de multirésistance n'a été détecté.

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 12. Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2020)**.**
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 surveillance de la résistance que nous effectuons pour l'OMS en tant que laboratoire supra-national (Cambau et al. CMI 2018).

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.**

Tableau 12. Bilan de la surveillance de la résistance aux anti-lépreux chez les patients diagnostiqués en France (2001-2020)

Lieu de naissance ou contage	Cas avec antibiogramme moléculaire			Dont cas résistants		
	Total	**Nouveau**	**Rechutes**	**Primaire**	**Secondaire**	**Mutation**
DOM-TOM	62*	133*	29	8 (7 Dds, **1 Fq**)**	8 (5 Dds, **3 Rif****)**	P55L (6), T53I (4) T53A, S456L (2) S456F A91V
Etranger	95*	83*	12	2 (1 Dds, **1 Fq***)**	0	P55L, A91V
TOTAL	**257***	**216**	**41**	**10 (3.9%)**	**8 (19.5%)**	

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

Les différences observées entre les taux de résistance dans le réseau OMS et parmi les cas diagnostiqués en France sont frappantes, pas pour les nouveaux cas (3,8% vs 3.9% de résistance 1aire respectivement) mais pour les rechutes (0% vs 19.5% 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).

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

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 Bichat-Université), celle de GenoScreen (Lille) et celle de l'Institut Pasteur de Paris (P2M).
Les technologies/matériels utilisés sont : MiniSeq, 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).
Le 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, 86% en 2019 et 98% en 2020.**

Activités 2020 WGS et M. tuberculosis (Laboratoire Pitié-Salpêtrière)

Analyse phylogénique des 369 génomes de M. tuberculosis 2006-2020 (MDR/XDR)

A ce jour, la **database génomique du CNR compte au total 1064 génomes** dont

- **677 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 le 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 profil de résistance aux antituberculeux.

En 2020, 125 souches de *M. tuberculosis* 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 **: 66 MDR (dont 5 XDR)** et **59 souches non MDR** séquencées comme comparateurs. L'analyse **WGS des souches MDR 2020 a été finalisée pour 65/66 souches, dont 5/5 XDR** (pas de culture pour 1 souche).

- Mutations dans les gènes de résistance des souches MDR

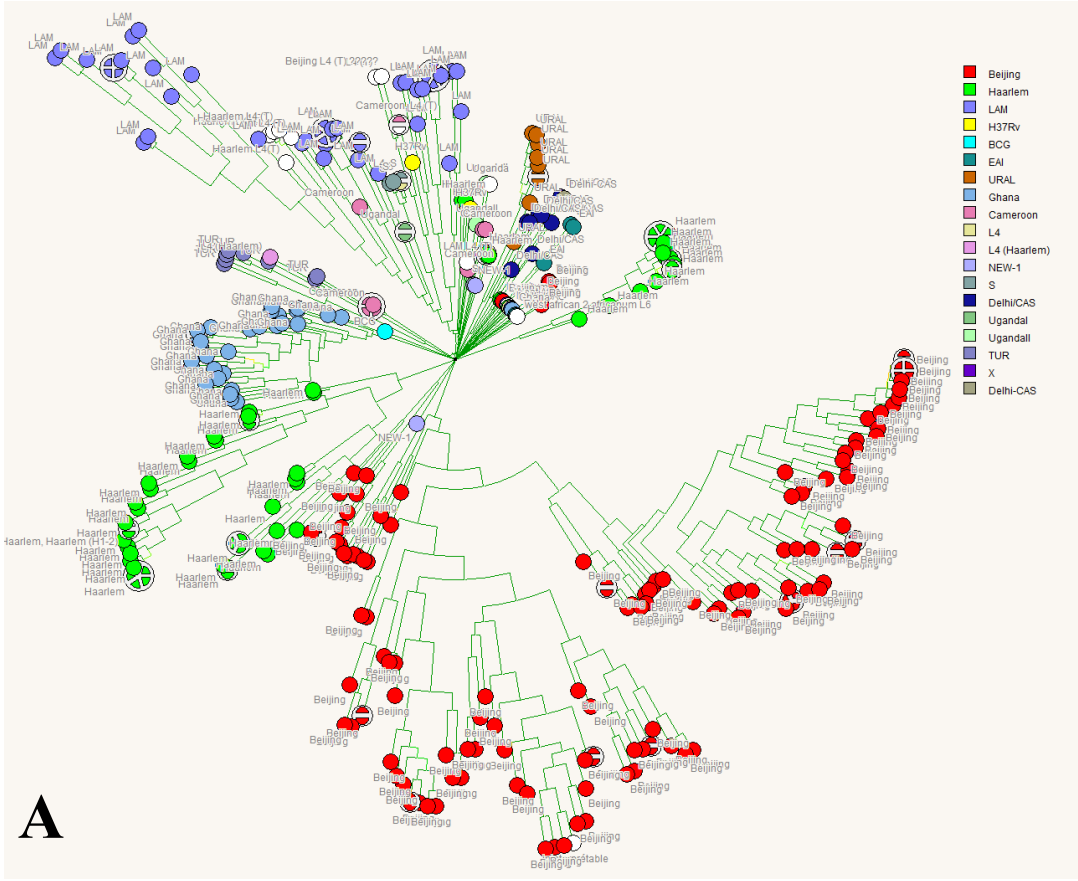
La Figure 3 ci-dessous montre le dendrogramme UPGMA de **362 génomes uniques séquencés de souches cliniques MDR-XDR** reçues au CNR, dont **296 souches MDR** (cercles de couleur bleu foncé), **32 pré-XDR** (cercles blancs) et **34 XDR** (cercles rouges).

On peut voir :

- que les clades **Beijing, Haarlem, LAM et Ghana restent les clades les plus représentés parmi les souches MDR/XDR**

- que **la très grande majorité des souches XDR et préXDR (cercles rouges et blancs sur la figure B) est distribuée au sein de la lignée Beijing (30/34 souches XDR, soit 88%; et 26/32 préXDR, soit 81%).**

- Qu'une **plus grande diversité de lignées est observée pour les 296 souches MDR** (Beijing, 28%; Haarlem, 22,4%; LAM, 15,8%; Ghana, 10,8%; L4(T), 4,7%; Delhi-CAS, 3,5%; Cameroon, 3%; EAI, 1,8%; autres, 10%).



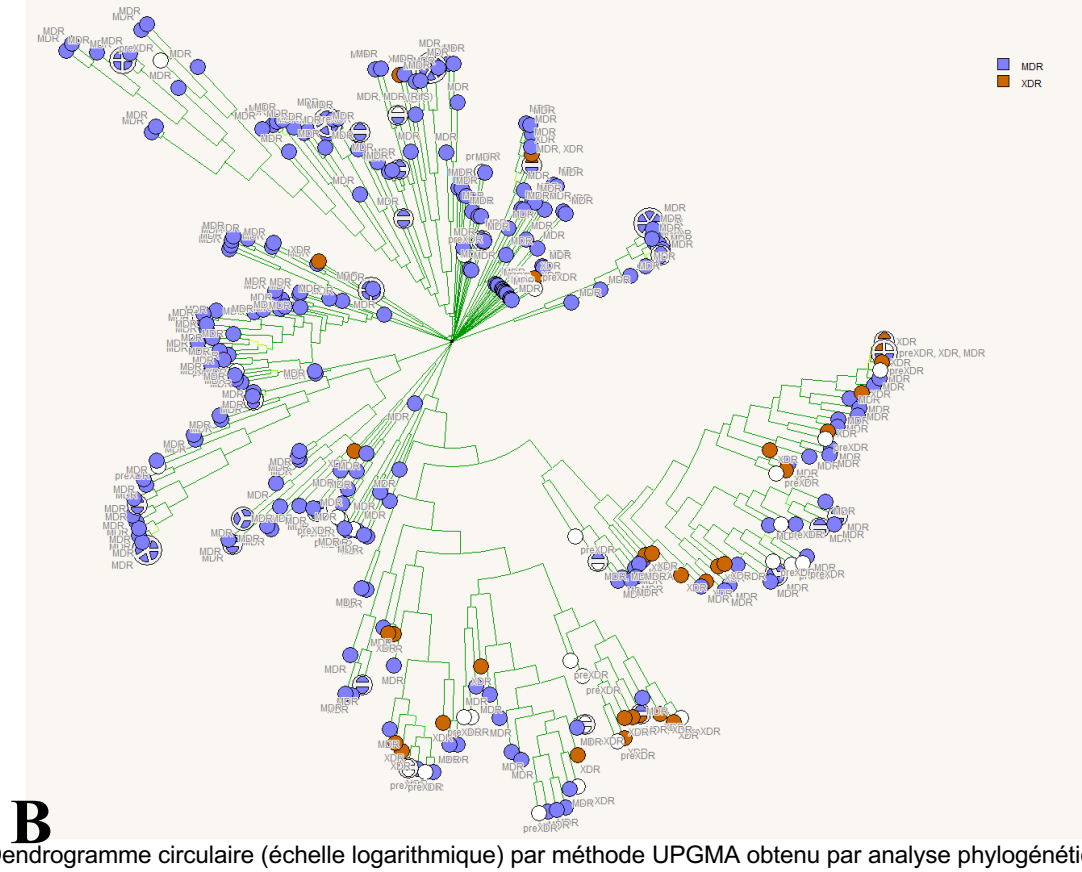


Figure 3. Dendrogramme circulaire (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique des 362 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* de la période 2006-2020). La longueur des branches est proportionnelle à la distance en SNPs entre les génomes. **Fig.A.** Les clades sont indiqués par des caractères de couleur (Beijing en rouge, Haarlem en vert clair, Ghana en bleu clair, LAM en bleu foncé). **Fig.B**. La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite (MDR en bleu, XDR en rouge, preXDR en blanc).

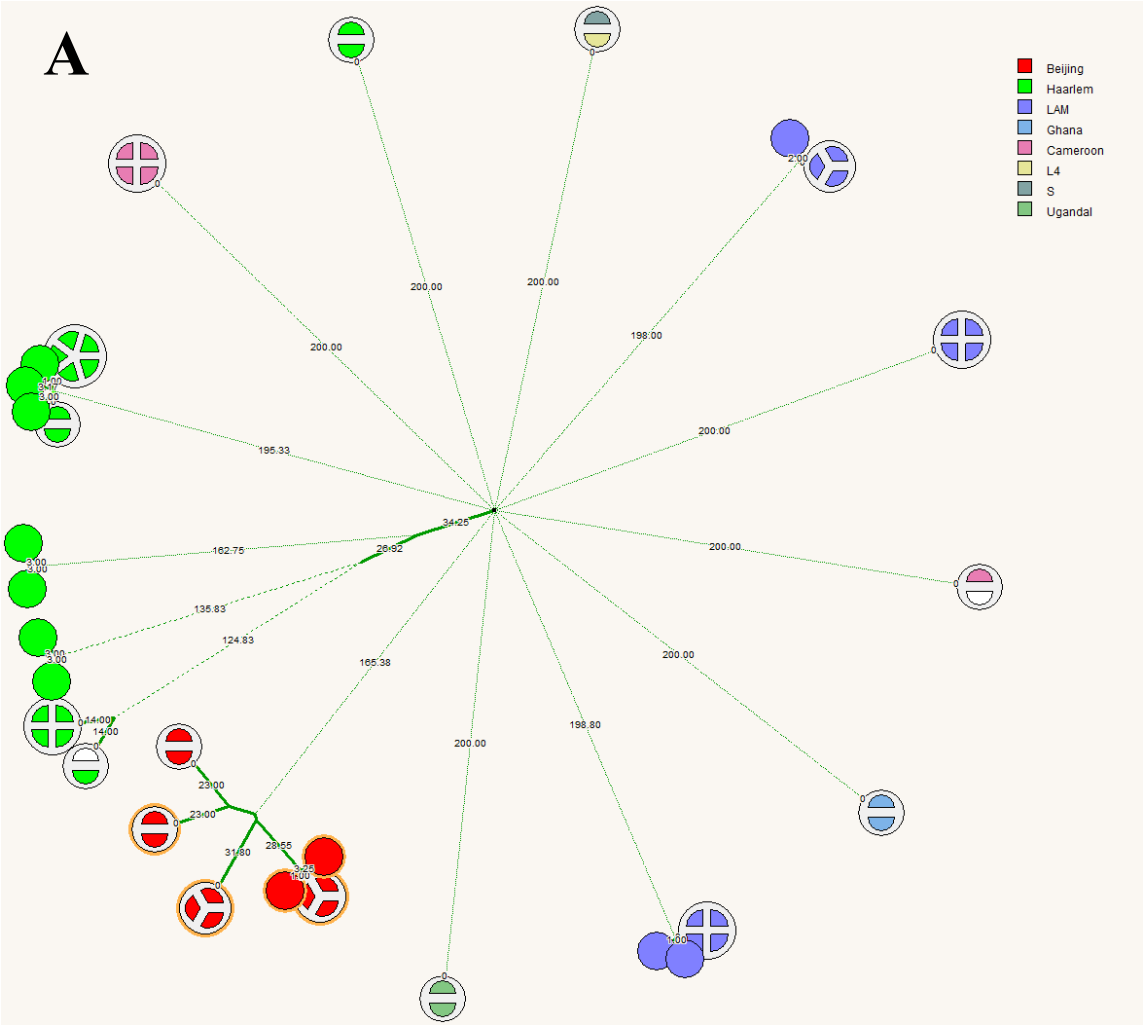
La Figure 4 **A et B** ci-dessous montrent la topologie des 18 clusters trouvés pour les souches MDR/XDR.

Pour les souches **Beijing** (**Figure A**), on observe **4 clusters de 2 à 5 souches** qui présentent des génomes très proches (**0 à 3 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 le cluster de 5 souches comporte des souches XDR (n=2) et pré-XDR (n=1) (Figure B). Les souches de ces 4 clusters ont été isolées de patients originaires de Géorgie. Aucune autre souche XDR n'a pu être identifiée sur l''ensemble des souches analysées.

Pour les souches **Haarlem** (n=22**)**, on détecte 6 **clusters de 2 à 10 souches** avec ≤ 3 SNP d'écart. Le cluster à 10 souches est un cluster de la Polynésie française.

Pour le clade **LAM (n=14)**, le WGS identifie 3 clusters de 0 à 2 SNP. Le cluster de 6 souches correspond à des patients nés en Mauritanie (n=2) et en France (n=4).

Autres clusters identifiés : **Cameroon** (n=2), **Ghana** (n=1), **Uganda** (n=1) et **L4(S)** (n=2).



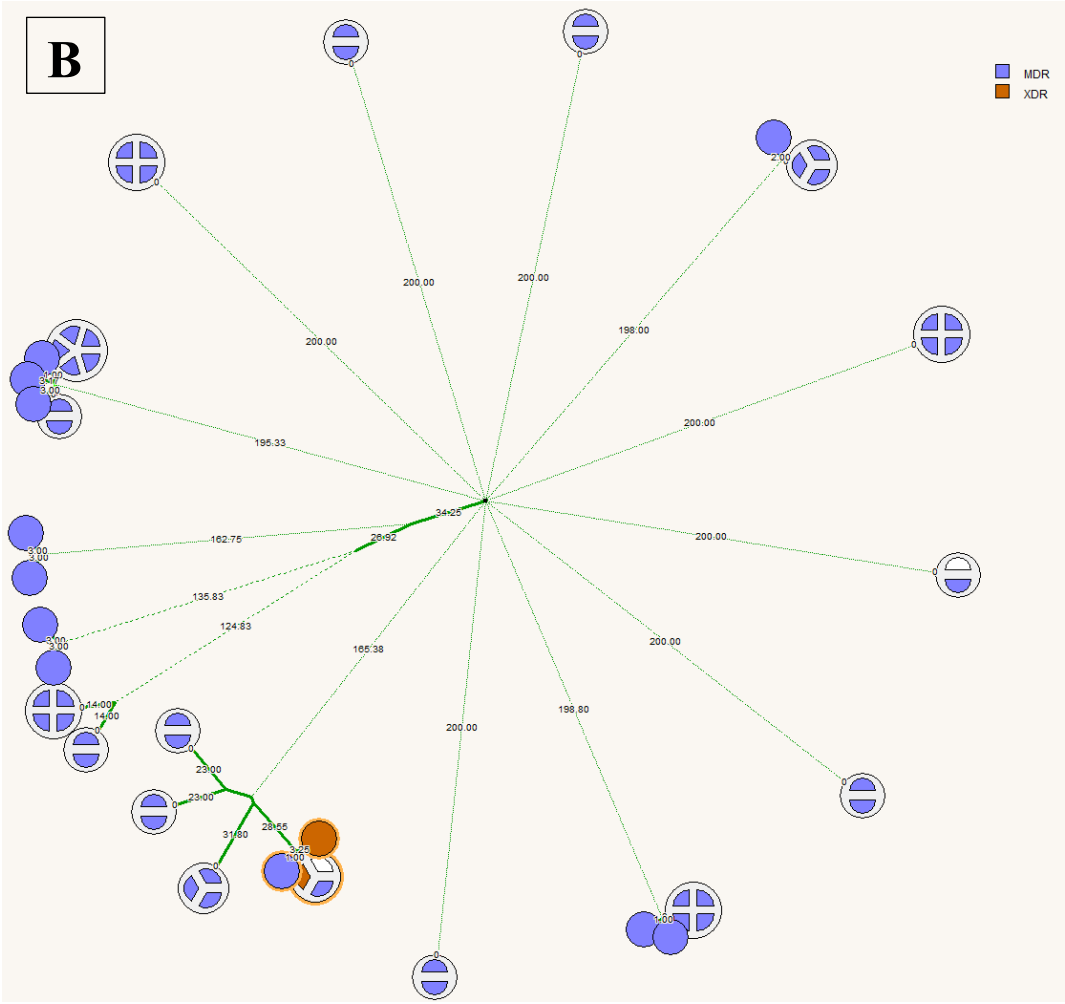


Figure 4 A, et B. Dendrogrammes (échelle logarithmique) par méthode UPGMA obtenu par analyse phylogénétique de 60 génomes complets des souches MDR, pré-XDR et XDR de *M. tuberculosis complex* groupées en clusters (2006-2020). **Fig.A.** Les clades sont indiqués par des caractères de couleur. La longueur des branches en SNPs est indiquée sur les branches. **Fig.B.** La couleur des cercles indique le phénotype de la souche selon le code couleur indiqué en haut à droite.

L'analyse phylogénique détaillée des souches MDR/XDR menée dans le cadre des **études de transmissions survenues en France en 2020** est donnée dans **la section « Surveillance » § 3.8**

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 clôture du projet).

Cette étude montre que **≥ 80% des cas de tuberculose Rif-R/MDR sont d'origine étrangère en France et dans plusieurs autres pays de l'UE/EEE.**

Ces résultats ont été publiés en 2021

Use of a whole genome sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study. Tagliani E, Anthony R, Kohl TA, de Neeling A, Nikolayevskyy V, Ködmön C, Maurer FP, Niemann S, van Soolingen D, van der Werf MJ, Cirillo DM; ECDC molecular surveillance project participants. **Eur Respir J. 2021 Jan 5;57(1):2002272**.

Activités 2020 WGS et mycobactéries non tuberculeuses (Laboratoire Lariboisière)

Depuis 2018, le séquençage génomique des MNT est fait sur une plateforme Illumina sur MiSeq (plateforme Lariboisière jusqu'en juin 2020) et MiniSeq (depuis juillet 2020, plateforme universitaire Paris Diderot site Bichat unité IAME). Nous utilisons pour les analyses le logiciel Bionumerics®. En 2020, nous avons aussi commencé à utiliser des programmes ouverts de bio-informatique, type Samtools pour la conversion de format de fichiers, BWA pour l'alignement et Freebayes pour les études de variants ("variant calling).

Nous avions séquencé 98 génomes de MNT en 2018 et 83 génomes en 2019. En 2020, notre activité a été plus restreinte du fait du déménagement du laboratoire et de la mise en place de nouveaux protocoles sur le nouveau site (janvier à juin 2020), de l'activité Covid très importante du laboratoire pendant la première vague (de mars à juin 2020) et de la diminution des demandes en lien avec des cas groupés. Au total, nous avons poursuivi notre activité de séquençage avec 44 génomes : 13 *M. abscessus,* 16 *M. chelonae,* 3 *M. avium* et *1 M. chimaera,* 6 *M. leprae*, 8 *M. marinum*, 1 *M. mucogenicum*, 2 *M. salmoniphilum.*

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 environnementale pour *M. chimaera, M. avium, M. marinum, M. chelonae, M. salmoniphilum, M. mucogenicum*), 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 ailleurs (§ alertes) et dont les résultats ont été publiés en 2020 et 2021.

La 2ème application a concerné plusieurs souches de *M. chelonae* isolées chez des patients dans le cadre de l'investigation de cas groupés d'infections liés aux soins dans un centre anti-cancéreux (voir alertes). La comparaison génomique des souches isolées chez 5 patients déclarés (P1 à P5) est montrée ci-dessous, en prenant en témoins des souches que l'on sait être reliées (R1 et R2) et des non reliées (souche de référence *M. chelonae* ATCC 353752 et autre souche non reliée). Bien que certaines souches aient très peu de différences entre elles (de 2 à 3 SNPs), cela n'a pas permis d'identifier des gestes à risque ou des lieux à risque. C'est pourquoi d'autres investigations sont menées en 2021, en particulier avec des prélèvements de l'environnement afin de trouver une source de contamination ou un geste à risque.

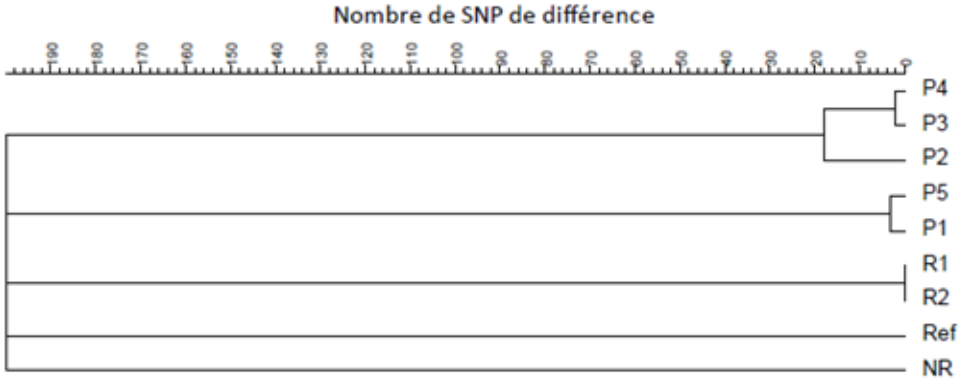


Figure 5 : résultat de comparaison génomique par méthode UMPGA (74 123 SNPs) pour 9 souches de *M. chelonae*

Les résultats de la comparaison génomique par méthode UMPGA (74 123 SNPs) de 9 souches de *M. chelonae,* dont 5 isolées de patients du même centre de soins, et reçues dans le cadre d'une alerte d'infections liées aux soins montrent que les souches non reliées à l'épidémie (Ref et NR) ont plus de 200 SNP de différence. Les 2 souches reliées (R1 et R2) n'ont aucun SNP de différence. Les souches P4 et P3 ont 2 SNP de différence et ne sont pas différenciables par la technique utilisée. Les souches P5 et P1 ont 3 SNP de différence et ne sont pas différenciables par la technique utilisée. La souche P2 a respectivement 17 et 19 SNP de différence avec P4 et P3.

La 3eme application a concerné des souches de *M. mucogenicum* isolées dans des cas groupés d'infection liées aux soins dans un autre centre anticancéreux, signalés en 2019. Dans ce cas-là, l'analyse génomique comparative a bien montré que les souches isolées des patients (3 souches

cliniques isolées dans les hémocultures) ne sont pas distinguables entre elles, et que le même profil est observé chez 4 souches environnementales : 3 souches isolées des prélèvements d'eau (E1, E2, E3) du même Institut (chambres et office infirmier) 1 souche isolée dans un liquide de rinçage d'endoscope du même hôpital mais dans un bâtiment différent.

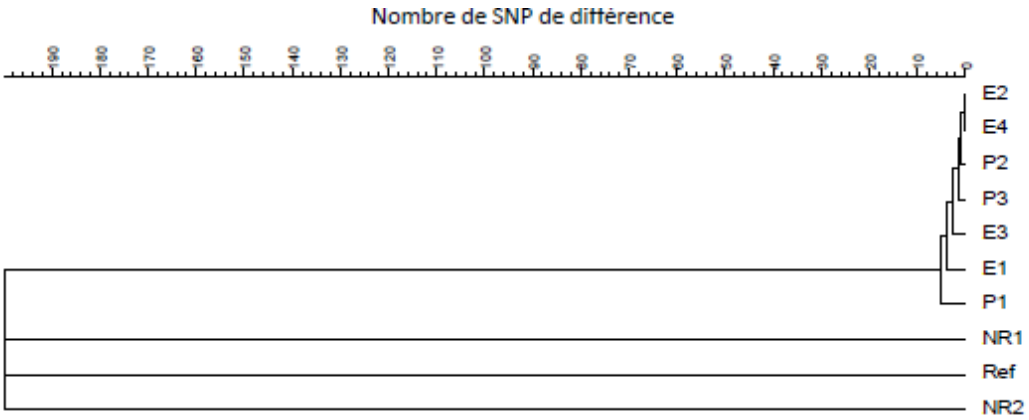


Figure 6 : Comparaison des 10 souches de *M. mucogenicum* par méthode UMPGA (57 434 SNPs)

La Figure 6 montre que les souches non reliées à l'épidémie (Ref, NR1 et NR2) ne sont pas dans le cluster de l'épidémie et ont plus de 1000 SNPs de différences entre elles. Les souches de *M. mucogenicum* isolées chez les 3 patients (P1, P2 et P3) et celles isolées dans l'environnement (E1, E2, E3 et E4) sont dans le même cluster avec 0 à 7 SNPs de différences.

Une 4ème application a recherché une source de contamination pour une patiente ayant eu une infection à *M. chelonae* suite à un acte de mésothérapie. La souche clinique et 5 souches isolées de l'eau de son domicile (suspicion d'infection post injection) ont montré des profils différents (Figure 7).

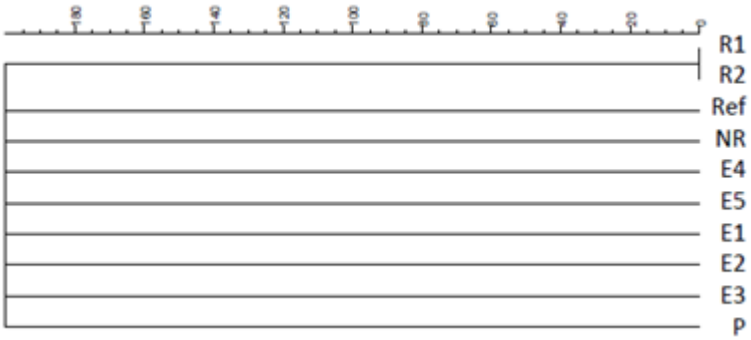


Figure 7 : Comparaison de 10 souches de *M. chelonae*

Des études génomiques complémentaires ont aussi été faites pour des alertes survenues en 2019 et les années précédentes. En effet, en 2020 nous avons finalisé l'étude rétrospective de 2010 à 2020 des enquêtes d'infections à Mycobactéries non tuberculeuses liées aux soins avec l'équipe des infections liées aux soins de Santé publique France (Anne Carbonne, Come Daniau cf section Alertes). L'étude est soumise à publication en 2021.

2.4.5. Activités 2020 WGS et lèpre (laboratoire Lariboisière)

En 2020, nous avons poursuivi notre étude génomique de souches de *M. leprae* pour les cas 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 (voir section §. C.3 ...).
Comme expliqué ci-dessus, notre activité 2020 a été réduite mais nous avons poursuivi l'étude génomique de *M. leprae* pour 6 souches dont deux souches de référence et 4 de patients de Nouvelle Calédonie (2) ou de Mayotte (2). Les génomes de référence sont faits à partir de souches cultivées sur pattes de souris et présentant pour certaines des mutations connues pour être liées à la résistance.

Les résultats seront présentés en 2021 car les génomes vont être comparés avec les données épidémiologiques des deux Iles, Nouvelle-Calédonie et Mayotte.

3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de la tuberculose résistante

3.1.1. Description des réseaux partenaires

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

A/ 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 **de la majorité des 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 démographiques, cliniques et des résultats des épreuves de sensibilité aux antibiotiques de première ligne.
Ce réseau recueille des informations sur 1.500 à près de 2.000 cas de tuberculose à culture positive/an selon les années (Figure 8**).**

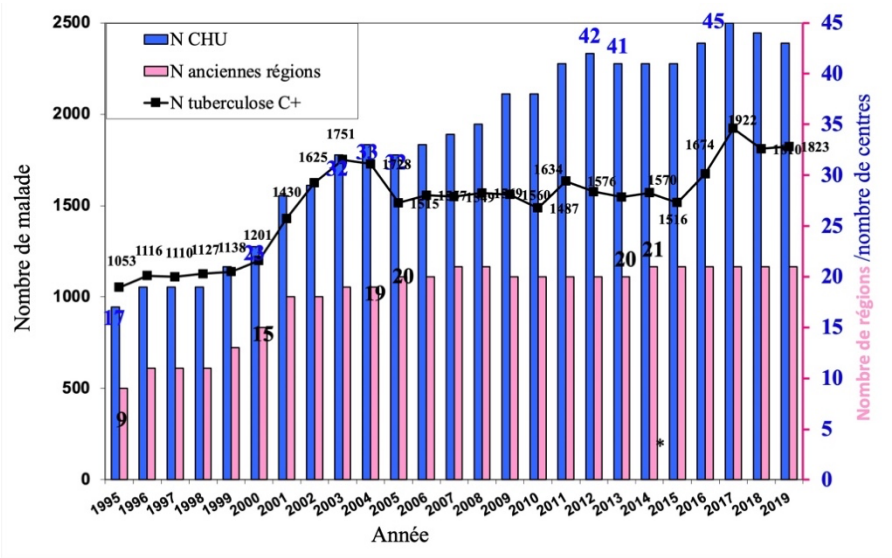


Figure 8. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 1995 à 2019 : nombre total des cas inclus dans la surveillance, nombre de CHU participants et nombre de régions (ancien découpage).

B/ Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit annuellement la surveillance 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**). Pour cela, le CNR-MyRMA s'appuie sur un réseau créé spécifiquement qui réunit **la très grande majorité des laboratoires pratiquant la mycobactériologie (~150 en 2019) en métropole et dans les DOM (devenus DROM) mais pas les TOM (devenus POM).**
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 données des cas de tuberculose à bacilles MDR sont croisées avec celles du laboratoire du CNR-MyRMA de la Pitié-Salpêtrière qui reçoit les souches MDR pour tests complémentaires et les données du réseau AZAY-Mycobactéries pour approcher de l'exhaustivité.

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 (réseau Azay-mycobactérie des CHU)

Caractéristiques des cas colligés à travers le réseau Azay-Mycobactéries

Les données recueillies en 2020 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2019. Les 43 CHU ont colligé pour 2019 les données concernant 1823 cas de tuberculose à culture positive. Ce nombre est identique à celui de 2018. La distribution des cas par région est donnée **dans le Tableau 13.**

Tableau 13. Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie sur les cas diagnostiqués de 2010 à 2019 : distribution des cas à culture positive selon la région. Pour 2019, les données sont aussi exprimées en % du total des cas de l'année.

Régions	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**	
										N	**%**
Auvergne-Rhône-Alpes	144	144	130	147	158	146	194	203	116	**87**	**4,9**
Bourgogne-Franche-Comté	28	32	37	36	55	39	35	52	46	**51**	**2,9**
Bretagne	12	15	64	67	58	48	51	52	51	**65**	**3,6**
Centre-Val-de-Loire	12	32	22	25	26	26	18	33	33	**31**	**1,7**
Corse	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**0**
Grand-Est	75	101	71	79	106	90	112	107	102	**102**	**5,7**
Haut-de-France	62	79	60	65	56	72	50	66	67	**26**	**1,4**
Ile-de-France	747	773	820	825	783	776	861	949	905	**896**	**50,0**
Normandie	70	50	66	77	69	61	71	74	107	**98**	**5,5**
Nouvelle-Aquitaine	163	181	140	84	86	101	84	139	129	**153**	**8,6**
Occitanie	42	45	52	17	56	58	66	112	111	**132**	**7,4**
Provence ACA	61	44	40	50	40	40	53	41	44	**50**	**2,8**
Pays-de-Loire	71	85	74	75	77	59	79	94	99	**99**	**5,5**
TOTAL	**1487**	**1581**	**1576**	**1547**	**1570**	**1516**	**1674**	**1922**	**1810**	**1823**	**100%**

Les proportions des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2019 par les laboratoires de CHU du réseau Azay-mycobactéries selon les **antécédents de traitement (5,8% déjà traités), le pays de naissance (72,3% nés à l'étranger) et le statut VIH (5,1% de co-infection)** sont données dans la Figure 9 **ci-dessous**.

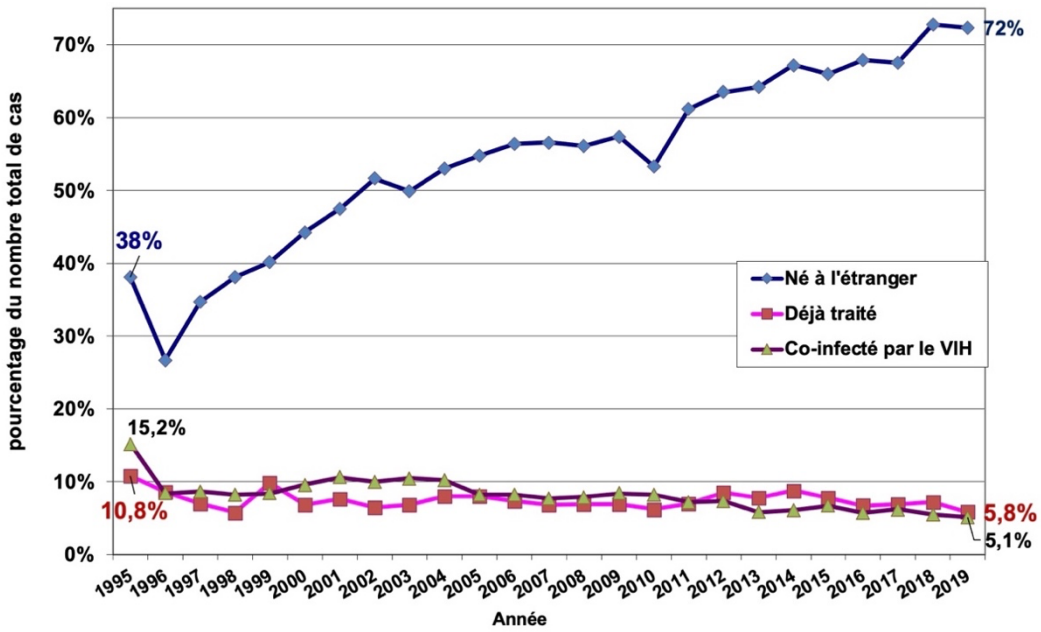


Figure 9. Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019

Sensibilité aux antituberculeux (réseau Azay-Mycobactéries)

La sensibilité à la rifampicine et l'isoniazide a été éprouvée pour 1790 des 1823 cas (98%) de 2019.

A/ Résistance primaire

Pour les 1510 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 2019** de **10,4% (Tableau ci-dessous), ce qui confirme la baisse depuis 2017 après les augmentations des années 2014-2016 (**Figure 10**).**

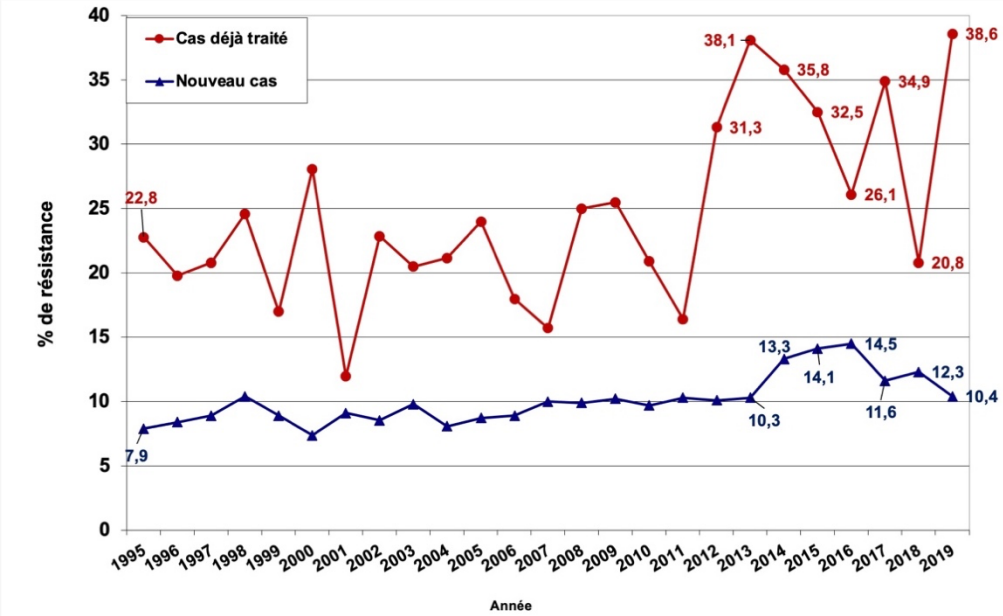


Figure 10. Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance « primaire ») et les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Tableau 14**,** et Figure 11) était en 2019, comme toujours, beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 5,7%) et la streptomycine (SM 7,7%) que pour la rifampicine (RMP 1,9%) et l'éthambutol (EMB 0,9%).

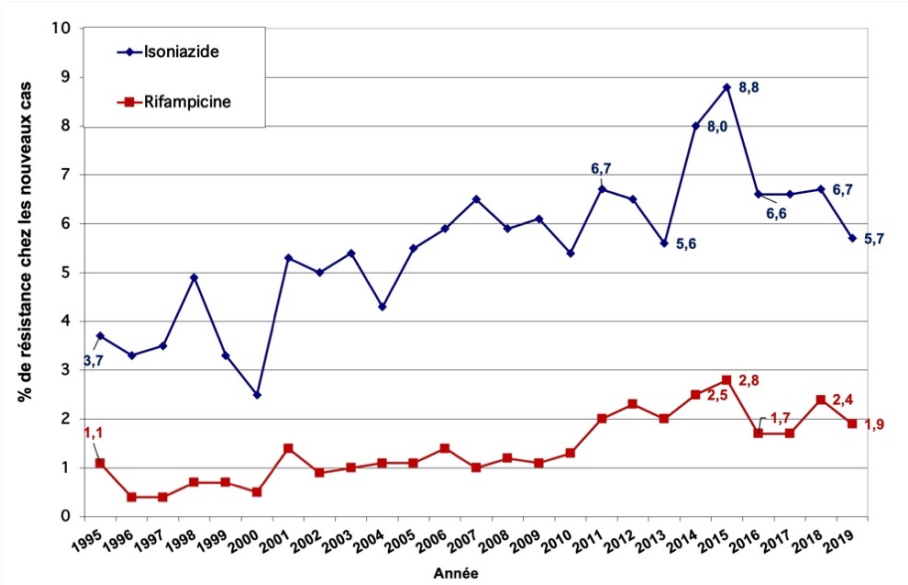


Figure 11. Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019

Le pourcentage de résistance primaire à l'INH (5,7%) est un peu inférieur à celui des dernières années et revenu au niveau de celui de 2014 (5,6%).

Comme les années précédentes, **la très grande majorité des souches résistantes à la rifampicine diagnostiquées en 2019 chez les patients sans antécédent de traitement (24/28) étaient aussi résistantes à INH (multirésistante)**.

La proportion de cas **multirésistants « primaires »** dans les CHU en 2019 dans le réseau Azay-mycobactéries (1,6%) reste inférieur à 2% comme les années passées.

Tableau 14. Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2019 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	1510	100	402	100	1080	100	101	100	14	100	87	100
Sensible	1354	89,6	360	89,6	972	90,0	62	61,4	9	64,3	53	60,9
Résistant	156	10,4	42	10,4	108	10,0	39	38,6	5	35,7	34	39,1
Résistance à au moins												
SM	105	7,7	31	8,2	71	7,5	27	31,8	3	23,1	24	33,3
INH	86	5,7	21	5,2	61	5,7	28	27,7	2	14,3	26	29,9
RMP	28	1,9	6	1,5	22	2,0	21	20,8	1	7,1	20	23,0
EMB	14	0,9	4	1,0	10	0,9	13	13,1	0	0	13	15,3
Résistance isolée à												
SM	65	4,3	20	5,0	44	4,1	10	9,9	2	14,3	8	9,2
INH	43	2,9	8	2,0	33	3,1	5	5,0	1	7,1	4	4,6
RMP	2	0,1	0	0	2	0,2	1	1,0	1	7,14	0	0
EMB	2	0,1	1	0,3	1	0,1	0	0	0	0	0	0
dont MDR	24	1,6	5	1,2	19	1,8	20	19,8	0	0	20	23,0

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol.
Pour 33 des 1823 souches, les antibiogrammes n'ont pas été réalisés. Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 172 cas et le pays de naissance était inconnu pour 54 cas. La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 174 cas et l'éthambutol pour 10 cas.

Résistance primaire et pays de naissance
Le pourcentage de résistance primaire à au moins un des 4 antituberculeux chez les 402 patients nés en France (Tableau 14) était de 10,4% et de 10,0% chez les 1080 patients nés à l'étranger. P**armi les 24 cas MDR « primaires » de 2019, seuls 5 (20,8%) étaient nés en France.**

B/ Résistance secondaire

Chez les 101 patients diagnostiqués en 2019 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 38,6% (Tableau 14**,** Figure 10**,** et Figure 12). Cette proportion reste toujours plus élevée que pour les cas jamais traités et très fluctuante.
Pris séparément, les pourcentages de résistance "secondaire" à INH (27,7%) et RMP (20,8%) observés en 2019 reviennent au niveau de ceux de 2017 après une baisse en 2018 (Figure 12).

Résistance secondaire et pays de naissance
De manière générale, la résistance « secondaire » à chacun des quatre antituberculeux pris isolément était 2 à 3 fois plus rare chez les patients nés en France.
La quasi-totalité (n=20) des cas de tuberculose à bacilles MDR « secondaires » de 2019 a été diagnostiquée chez des patients nés à l'étranger.

Monorésistance à la rifampicine
En 2019, 2 souches monorésistantes à RMP ont été isolées chez des patients nés à l'étranger sans antécédent de traitement et une chez un patient déjà traité et né en France.

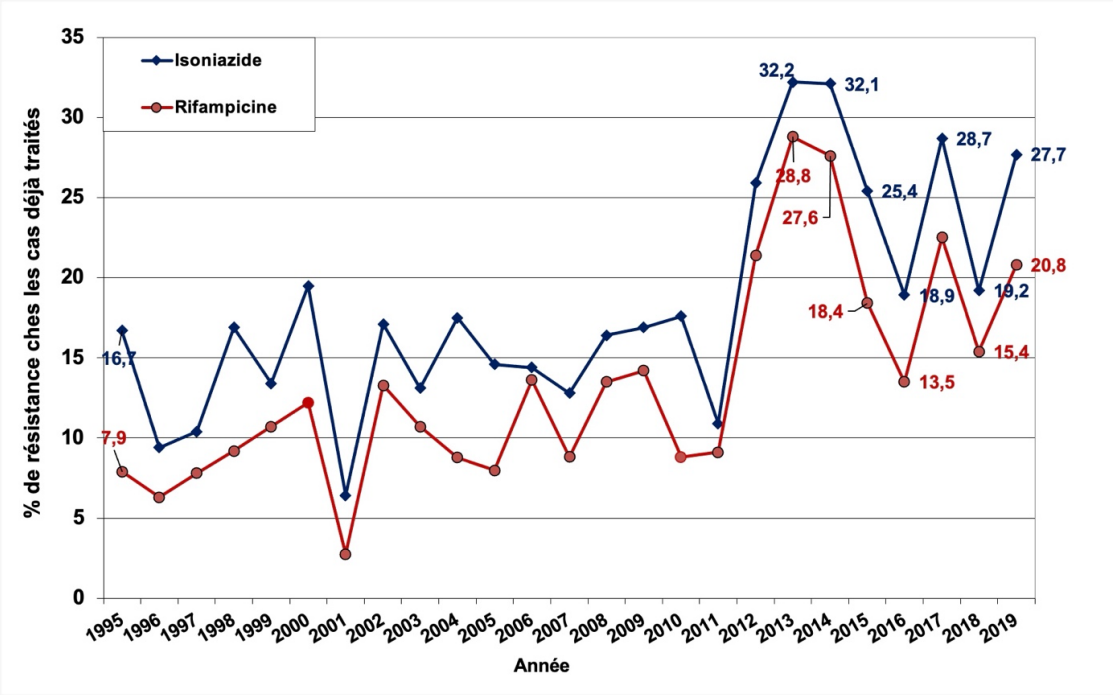


Figure 12. Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2019

3.1.3. Surveillance de la tuberculose à bacilles multirésistants (réseau du CNR-MyRMA)

Organisation de la surveillance en 2020

En 2020, le CNR-MyRMA a recueilli des données concernant les cas de tuberculose à culture positive **diagnostiqués en 2019**, à travers son réseau de laboratoires (réseau CNR-MyRMA).

En raison de la crise Covid-19 qui a touché la France, le CNR-MyRMA a fait face à des difficultés pour recueillir les informations des laboratoires du réseau. Nous nous efforcerons de recueillir à nouveau les données 2019 lors de l'enquête sur les cas de 2020. Le taux de réponse au questionnaire est à ce jour de 44%

Les données colligées à ce jour **concernent 2415 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2019.**
La région Ile-de-France a diagnostiqué un peu moins de la moitié des cas reportés de 2020 (47%), la région Auvergne-Rhône-Alpes 9%, la région Occitanie et Nouvelle-Aquitaine rapportant 7% des cas.

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants pour 2019

Le nombre de total de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en France en 2019 est obtenu comme chaque année par les informations recueillies par l'enquête auprès des 64 laboratoires ayant à ce jour répondu au questionnaire, croisées avec celles colligées avec les souches reçues au laboratoire du CNR-MyRMA pour analyse complémentaires et complétées éventuellement par les données du réseau AZAY-Mycobactéries. Le classement d'un cas dans une année se fait selon la date du prélèvement clinique ayant mené au diagnostic de TB MDR.

Le **nombre** de cas de MDR identifiés en 2019 était de **81. Ce nombre total de cas MDR est relativement stable par rapport à 2017 (79 cas) et 2018 (82 cas).** Parmi ces cas, 63 ont été déclarés dans le cadre de l'enquête annuelle et 75 souches ont été reçues au laboratoire du CNR-MyRMA pour analyses complémentaires. Pour les 6 autres cas signalés, aucune information n'est disponible. Il n'y a parmi les cas dont les informations sont disponibles aucun cas déclaré les années précédentes.
La répartition régionale des cas est donnée dans le Tableau 15 et la Figure 13 .
La proportion calculée est en hausse par rapport aux années précédentes mais n'est pas donnée

dans ce rapport car le dénominateur n'est pas complet (cf Tableau 16).

Par ailleurs, parmi les souches MDR reçues par le CNR-MyRMA en 2019, 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 2019 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA**.**

Région	**Total des cas** (à confirmer)	**Cas TB MDR**	
		N	**% du total**
Auvergne-Rhône-Alpes		6	
Bourgogne-Franche-Comté		0	
Bretagne		4	
Centre-Val-de-Loire		1	
Corse		0	
Grand-Est		4	
Hauts-de-France		6	
Ile-de-France		41	
Normandie		1	
Nouvelle-Aquitaine		5	
Occitanie		3	
Provence ACA		7	
Pays-de-Loire		3	
DOM		0	
Total		**81**	

Le poids respectif de chaque région parmi les cas de TB-MDR de 2019 est illustré dans la Figure 13. Distribution régionale schématique des cas de tuberculose MDR en 2019**.**

Figure 13. Distribution régionale schématique des cas de tuberculose MDR en 2019

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants de 2019

Les caractéristiques des 75 cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2019 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 2019 au Laboratoire du CNR-MyRMA, sont dues au fait que quelques souches reçues ne correspondent pas à des nouveaux cas de 2019 et quelques souches reçues en 2020 correspondent à des cas diagnostiqués en 2019) **:**

- 65% étaient des hommes,
- 15 (20%) étaient nés en France, et 59 (79%) nés à l'étranger (et un de pays de naissance non connu),
- parmi les 59 malades nés à l'étranger, 29 étaient nés en Europe de l'Est (dont 19 en Géorgie et 5 en Moldavie), 19 en Afrique sub-saharienne (dont 4 dans la Corne de l'Afrique), 6 au Maghreb, et 5 en Asie,
- l'âge médian était de 33 ans (1 cas de 15 ans, 3 cas de plus de 65 ans),
- 7 (9%) étaient séropositifs pour le VIH, 64 (86%) séronégatifs et 4 (5%) de statut VIH inconnu,
- 86% des cas avaient une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 53% n'avaient jamais été traités (MDR « primaire »).

Tendances évolutives 1992-2019

Evolution du nombre et de la proportion de cas MDR parmi les cas diagnostiqués

Le pourcentage de cas MDR de 2019 n'est pas calculé comme indiqué plus haut car l'enquête et le recueil du dénominateur sont encore en cours (Tableau 16).

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 1992-2019)

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]
2019	**81**	-	**-**	

*taux de réponse inférieur aux années précédentes

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA **est restée globalement constante dans la majorité des régions durant les années 2010-2019** (Tableau 17).

Tableau 17. Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2010 à 2019 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA.

Région	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Auvergne-Rhône-Alpes	5	14	11	14	17	**11**	8	9	12	6
Bourgogne-Franche-Comté	1	1	2	1	1	**0**	0	0	0	0
Bretagne	0	2	5	6	0	**2**	2	3	3	4
Centre-Val-de-Loire	0	1	3	1	2	**1**	1	2	3	1
Corse	1	0	0	0	1	**1**	0	0	0	0
Grand-Est	2	4	5	6	4	**4**	5	3	9	4
Haut-de-France	2	1	7	3	6	**5**	3	3	3	6
Ile de France	23	36	40	35	56	**51**	31	40	32	41
Normandie	4	2	0	2	7	**2**	3	4	3	1
Nouvelle-Aquitaine	1	0	7	3	4	**7**	6	6	7	5
Occitanie	2	2	5	5	4	**4**	2	3	3	3
Provence ACA	4	9	5	4	7	**3**	7	2	5	7
Pays de Loire	0	2	3	1	0	**3**	2	3	2	3
DOM	2	1	1	1	1	**0**	0	1	0	0
Total	**47**	**75**	**94**	**82**	**110**	**94**	**70**	**79**	**82**	**81**

Tuberculose multi-résistantes chez les enfants

Les données TB-MDR ont été analysées pour montrer la place des enfants parmi les cas. Le 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 18).

Tableau 18. Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants chez les enfants en France entre 2009 et 2019

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
2019	0	1

Parmi les 10 enfants de ≤5 ans de la période 2009-2019, 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 18 enfants plus âgés, il y avait 9 garçons et 9 filles, 6 étaient nés en France et 12 à l'étranger (2 en Europe de l'Est, 7 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 27 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 19).

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 2017-2019 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 2019

Caractéristiques	**1992-1996**	**1997-2001**	**2002-2006**	**2007-2011**	**2012-2016**	**2017-2019**
N total cas recensés, dont :	215	211	351	275	452	242
- 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%)**	**231 (96%)***
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%	72%
Antécédents de traitement	**73%**	**47%**	**38%**	**37%**	**37%**	**37%**
Atteinte pulmonaire	92%	91%	90%	84%	84%	83%
Né à l'étranger, dont :	**51%**	**65%**	**79%**	**83%**	**86%**	**84%**
- Europe	7%	8%	15%	31%	49%	36%
- Maghreb	15%	19%	13%	7%	6%	5%
- Afrique Sub-saharienne	17%	25%	39%	27%	20%	33%
- Autres	12%	13%	12%	18%	11%	10%
Pays de naissance inconnu	0,5%	3%	3%	8%	1%	0.4%
Examen microscopique (+)	58%	61%	62%	48%	55%	54%
Résistance à l'éthambutol	33%	30%	35%	53%	62%	64%
Résistance à streptomycine	54%	58%	63%	71%	75%	78%

* 9 malades pour qui les informations sont non disponibles

3.2. Surveillance de la tuberculose à *Mycobacterium 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 2019, 34 cas de tuberculose *à M. bovis* ont été identifiés par les laboratoires du réseau AZAY, **soit 2,4%** des 1401souches pour lesquelles l'identification a été poursuivie jusqu'à l'espèce **: 10 étaient nés en France (âges 1-89 ans),** 15 au Maghreb (10-74 ans), 2 au Moyen-Orient (25 et 40 ans), 5 en Afrique sub-saharienne (26-61 ans) et 2 d'origine inconnue (49 et 54 ans). Les 10 cas nés en France ont été signalés par 8 régions différentes.
Parmi les 3 cas nés en France et de moins de 20 ans, 1 était de la région Ile-de-France, un des haut-de-France et un du Grand-Est ; aucun n'était immunodéprimé, deux avaient une tuberculose ganglionnaire et un une tuberculose pulmonaire et cutanée.

La proportion de *M. bovis* en 2019 parmi l'ensemble des cas de tuberculose est identique à celle de 2018 et plus élevée qu'entre 2013-2017 (Tableau 20). L'augmentation du nombre de cas est principalement liée aux cas nés à l'étranger.

Tableau 20. Nombre et % de tuberculose à *M. bovis* en France, réseau AZAY-Mycobactéries, 2014-2019

Année	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**2019**
Nombre de cas *M. bovis*	**10**	**16**	**19**	**26**	**23**	**33**	**34**
Nombre de tuberculose à culture+	1119	1179	1131	1241	1487	1361	1401
Pourcentage de *M. bovis*	**0,9%**	**1,4%**	**1,7%**	**2,1%**	**1,6%**	**2,4%**	**2,4%**
Nombre de laboratoires*	27	28	28	28	28	27	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.

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 le réseau national des laboratoires qui font la culture des mycobactéries.

Le Tableau 21 ci-dessous donne le nombre de cas de méningite à culture positive selon les années. L'enquête 2019 ayant un taux de réponse inférieur aux autres années, l'évolution temporelle sera difficile à interpréter.

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 3 cas de méningite en 2019. Ce chiffre bas, équivalent à ce qui était observé entre 2014 et 2016, sera à confirmer dès que les données des autres laboratoires seront collectées (cf. supra).

Tableau 21. Nombre de cas et incidence de la méningite à culture positive chez des enfants de 5 ans et moins de 2000 à 2019

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
2019	**3**

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

Les données de la surveillance des cas MDR ont été adressées à Santé publique France dans le cadre de la déclaration obligatoire ce qui a permis pour la première fois d'intégrer les données françaises des cas MDR à la surveillance européenne.

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 transmises au Ministère de la Santé qui les a envoyées à l'OMS** dans le cadre du « WHO Global Leprosy Programme ». Les cas diagnostiqués dans les DOM-TOM ne sont pas déclarés par nous mais par les ARS respectives selon la région du Monde.

Pour l'année 2020, 7 cas ont été déclarés dont 5 multi-bacillaires et 2 pauci-bacillaires (diagnostic fait après concertation microbio-clinique dans le cadre de la RCP "Lèpre" mensuelle). C'étaient tous des nouveaux cas, diagnostiqués dans différents centres hospitaliers de métropole : Poitiers, Toulouse, Saint Louis Paris (2 cas), Clermont-Ferrand, Le Havre, Tourcoing. Les patients étaient originaires des DOM-TOM (3 originaires de Mayotte mais vivant en métropole) et des pays suivants : Inde, Népal, Burkina-Faso, Sénégal.

3.5. Registre des cas de tuberculose MDR

En 2020, la mise en œuvre du registre des cas de tuberculose MDR a été commencé.

En **novembre 2020, la deuxième 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).

La réunion a été décalée par rapport à la date qui avait été initialement identifiée, compte-tenu de l'engagement des membres du Conseil Scientifique dans la réponse à l'épidémie de SARS-CoV-2. Pendant la réunion**, tous les participants ont confirmé leur adhésion au projet.** L'accord a été de poursuivre avec une mise en place "en routine" du registre dans les centres pilotes (Paris Pitié-Salpêtrière, Paris Bichat, Bligny, Lyon, et Rennes), aidés par un guide au remplissage du registre et un document partagé en ligne (type « FAQ ») où les centres pourront ajouter leurs questions et accéder aux réponses.

Les patients sont identifiés à la fois par un code propre au registre et par un code Santé Publique France unique. **Suite à la réunion, un premier échange croisé avec la base de données de Santé Publique France a été effectué** pour optimiser les données présentes dans le registre et celles de SPF à partir de la déclaration obligatoire e-DO.

Sur le plan informatique, le registre est fonctionnel. Des mises à point additionnelles sont à envisager pour optimiser la facilité d'accès et d'utilisation d'après le retour des utilisateurs, ainsi que la mise en place d'une interface spécifique pour les RCP « Groupe Thérapeutique des Infections à Mycobactéries » du CNR-MyRMA. Cette dernière mise à jour devra être effectuée par les informaticiens prestataires.

Données présentes au 31 Décembre 2020 dans la base de données du registre :

- 47 patients atteints par tuberculose MDR, traités initialement dans 29 centres différents en France (8 en Ile-de-France, 28 en dehors d'Ile-de-France) ;
- 22 utilisateurs actifs provenant de 9 centres (sans compter le CNR-MyRMA).

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 23 cas en 2020
(b) de 220 cas de 2013 à 2020 (23 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 22).
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	Suspicions de rechute	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
2019	33	24	9	14 ()	10
2020	23	10	13	10 (4)	9
Total	**220**	**176**	**44**	**126 (89)**	**81**

* 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 2020, le CNR-MyRMA a réalisé le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 140 souches : 74 souches de *M. tuberculosis* non MDR et 66 souches MDR

La méthode utilisée a été l'analyse MIRU-VNTR de 24 loci ou 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 2020, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 57 souches de ***M. tuberculosis* non MDR pour 20 situations** en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT (Tableau 23).

Il s'agissait de :
- **19 situations de suspicion de transmission en collectivité** (total : 55 cas).

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans 13 situations et, au total, pour 34 des 55 cas (62%).**
Les 13 situations comportaient chacune de 1 à 5 cas bactériologiquement reliés :
- 4 fois au sein d'un établissement scolaire
- 1 fois dans le cadre professionnel
- 4 fois dans des foyers pour personnes en situation de précarité
- 2 fois au sein d'une famille
- 2 fois dans un contexte communautaire

- **1 situation de suspicion de transmission en milieu des soins**

Le génotypage a permis de **confirmer la relation entre les cas dans cette situation (épisode de transmission de malade à malade).**

Les lignées phylogéniques en cause étaient surtout les lignées classiques Haarlem (n=11) et Cameroon (n=7). Il y avait **peu de lignée Beijing (n=5).**

Tableau 23. Résultats du génotypage des souches de *M. tuberculosis* complex non MDR reçues au CNR-MyrMA en 2020, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	Situations (lieu)	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement	Clades-lignées
Collectivité				
Ecoles	1 (Province)	3	3	Cameroon
	2 (Paris-Ile-de-France)	2	2	Haarlem
	3 (Paris-Ile-de-France)	2	2	Beijing
	4 (Province)	1	1*	Beijing
Entreprise	1 (Paris-Ile-de-France)	3	2	Delhi/CAS
	2 (Paris-Ile-de-France)	2	0	
	3 (Paris-Ile-de-France)	2	0	
	4 (Province)	2	0	
	5 (Province)	2	0	
Foyers précarité	1 (Paris-Ile-de-France)	7	0	
	2 (Paris-Ile-de-France)	2	2£	Haarlem
	3 (Paris-Ile-de-France)	4	3$	Haarlem
	4 (Province)	3	2	New-1
	5 (Province)	4	4	Cameroon
Famille	1 (Province)	2	2	Haarlem
	2 (Province)	2	2	Beijing
Communautaire	1 (Province)	4	4	H3
	2 (Province)	6	5	LAM
	3 (Province)	2	0	
Milieu de soins	1 (Province)	2	2	Haarlem
Total	**20**	**57**	**36**	

* 1 souche reliée à 2 autres souches reçues en 2018
£ 2 souches reliées entre elles et à 2 autres reçues en 2019
$ 3 souches reliées entre elles et à 4 autres reçues en 2019

Tendances évolutives 2006-2020

Comme le montre le Tableau 24, **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 2020**
- 6 à 29 épisodes/an de cas groupés dans les familles et dans la communauté, soit 239 épisodes en 15 ans totalisant 663 cas (2 à 13 cas par épisode).
- 0 à 5 épisodes/an de cas groupés en milieu de soins, soit 34 épisodes en 15 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 2020 (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 de 2 cas liés dont un de transmission de malade à soignant
2020	19 enquêtes (total: 55 cas suspects) 13 épisodes confirmés: Total 34 cas liés, 2 à 5 cas/épisode	1 enquête (total 2 cas suspects) 1 épisode confirmé

3.7.2. Suspicion de rechute

En 2020, le CNR-MyrMA n'a pas reçu de souche pour suspicion de rechute de tuberculose.

3.7.3. Suspicion de contamination inter-prélèvements au laboratoire

En 2020, le CNR-MyrMA a reçu 17 souches correspondant à 8 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. **Le génotypage a confirmé la contamination au laboratoire pour 3 de ces 8 épisodes**. Ces 3 épisodes totalisaient 6 souches.

3.7.4. Tendances évolutives 2006-2020

Comme le montre le Tableau 25, le CNR-MyRMA **a confirmé par génotypage de 2006 à 2020** :
- 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 115 épisodes en **15 ans** (totalisant 306 cas, 2 à 8 cas par épisode) sur un total de 179 épisodes suspects (64%).

Ces pourcentages 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 2020

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
2020	0 suspicion	8 enquêtes (total : 17 souches) 3 épisodes confirmés : Total 6 cas, 2 à 3 cas/épisode

3.8. Etude génotypique des souches multirésistantes (MDR)

3.8.1. Analyse de la répartition des lignées phylogénique des souches MDR de 2020

Nous avons **analysé de manière systématique 66 souches MDR/XDR reçues au CNR-MyRMA** en **2020 par la technique du WGS qui a pu être finalisée pour 65/66 souches** (cultures négatives pour 1 souche).

Sur le plan phylogénique (Tableau 26), 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%, et en 2020 de 28%, ce qui confirme la diminution du nombre de cas de tuberculose MDR causés par des souches Beijing.**

Les autres lignées importantes sont les lignées LAM (23% du total) et Haarlem (17%).

Tableau 26. Evolution de 2006 à 2020 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	20	Total
Groupe PGG1																
EAI	2	1	0	0	0	0		2	3			1		1	3	13
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	4	1	1	1	2	8	1	3	2	27
Beijing	**11**	**9**	**15**	**17**	**19**	**23**	**38**	**41**	**52**	**34**	**30**	**29**	33	**28**	**18**	**397**
West African 2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	5
West African 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3
Canetti	1	0	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**	**11**	**96**
LAM	**5**	**7**	**3**	**3**	**4**	**8**	**16**	**10**	**19**	**22**	**12**	**7**	**9**	**12**	**15**	**152**
URAL	4	0	2	1	0	1	2	3	4	2	2	1	3	2	2	29
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0		1		1	1	1	3	4	0	13
S	2	2	3	1	3	3	3	2	1	2	3	2	3		0	30
Cameroon	2	2	3	1	3	1	3				2	2	2	1	4	26
Ghana	4	1	5	6	2	3	1	1	3	4	**7**	**5**	**13**	**10**	**6**	**71**
H37Rv											1	2		2	0	5
T1-T2-T3 et « nt »	**19**	**14**	**18**	**19**	**12**	**19**	**21**	**11**	**18**	**20**	**3**	**3**	3	2	3	**185**
Autres																
NEW-1	0	0	0	0	0	1							1			2
M. bovis	0	0	0	0	0	1				1	1				0	3
Total	**57**	**37**	**51**	**52**	**45**	**67**	**91**	**83**	**110**	**98**	**70**	**78**	**82**	**72**	**65**	**1058**

La **stratification des cas de TB-MDR par régions** géographiques de naissance des patients en 2020 est identique à celle décrite en 2019, avec une prédominance :

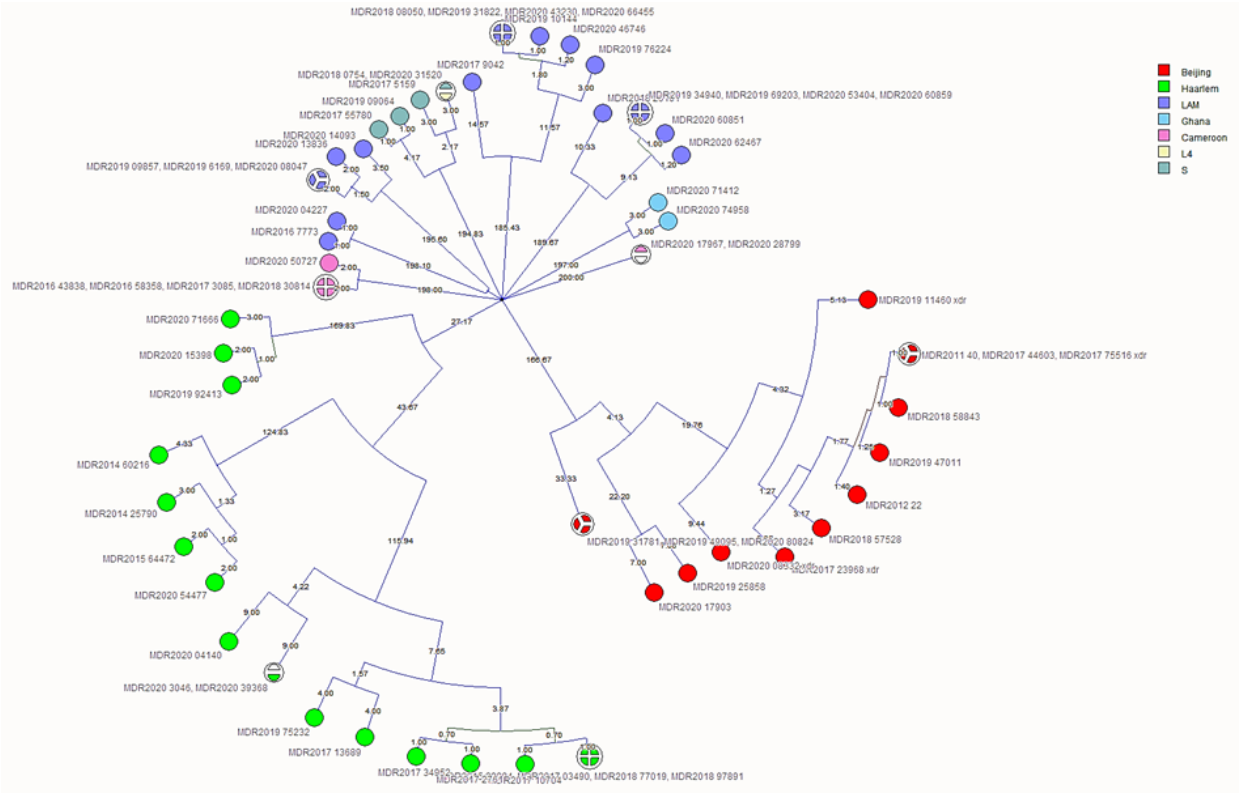
- des lignées Haarlem, LAM, L4/nt et Beijing en France, Maghreb et Afrique du centre
- de la lignée Ghana en Afrique de l'ouest
- des lignées Cameroon et Ural-Tur en Afrique de l'est
- de la lignée Beijing en Russie, Asie centrale (dont Géorgie) et Asie

3.8.2. Analyse détaillée des clusters identifiés par WGS pour les souches MDR 2020

La technique MIRU 24 loci n'étant pas assez discriminante pour certaines lignées (en particulier pour la lignée Beijing), nous l'avons remplacée à partir de 2017 par l'approche **WGS**. **En 2020, la quasi-totalité des souches MDR/XDR ont été analysées par comparaison des génomes complets (WGS), déjà disponibles pour la majorité des souches de 2018 et 2019.**
Les conclusions de cette analyse sont données ci-après (seuls les clusters d'intérêt sont détaillés).

En 2020, l'analyse WGS des souches MDR a été finalisée pour 65 souches, dont 5/5 XDR (pas de culture pour 1 souche). La figure 14 ci-dessous montre la topologie des **13 clusters trouvés par WGS pour les souches MDR/XDR** selon les **clades (A)** et les **phénotypes MDR/XDR (B).**

A



B

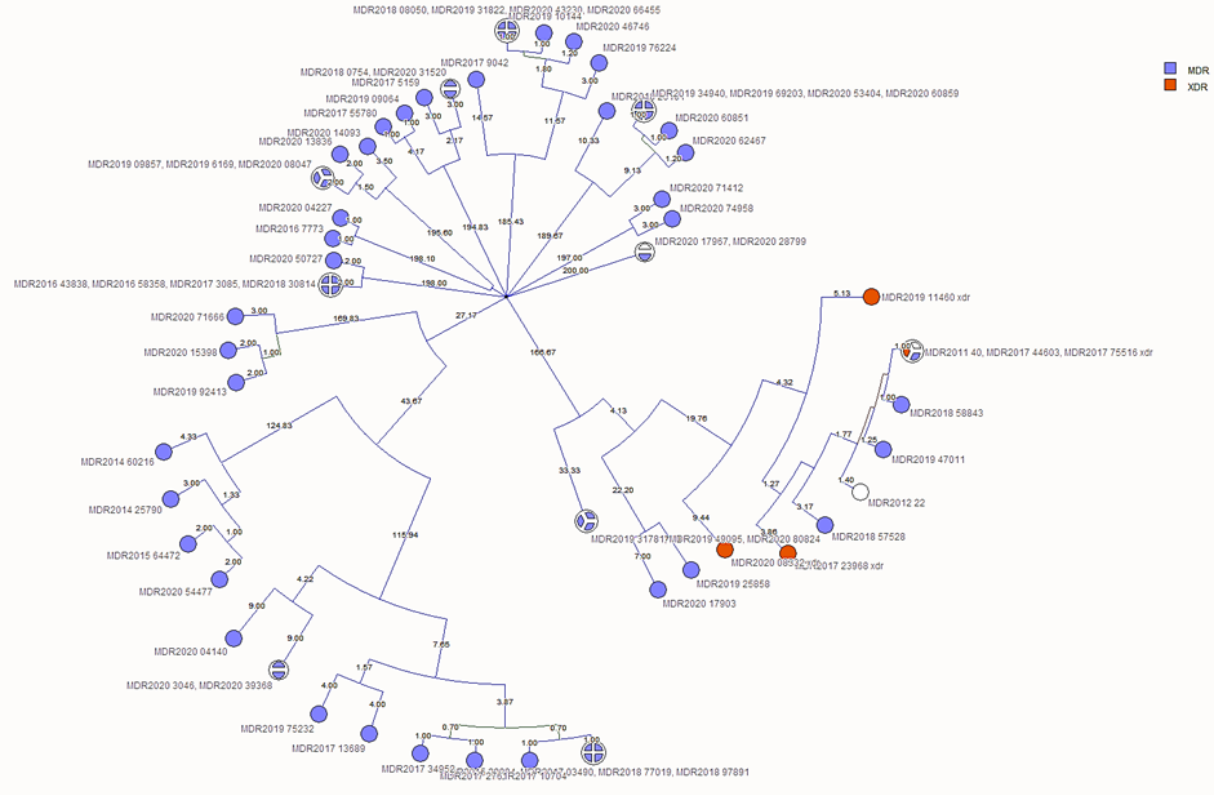


Figure 14. Dendrogramme circulaire obtenus par analyse phylogénétique des génomes (WGS) de *M. tuberculosis* (méthode UPGMA). A) Visualisation des clades. B) Visualisation des phénotypes. Le nombre de SNP identifiés entre les groupes de souches reliées est indiqué sur les branches.

Lignée LAM

Cluster WGS Nr 1 (MIRU 300-53)

4 souches MDR de 2020 dont les génomes complets sont parfaitement identiques ou très proches (1 SNP) de ceux de 2 souches isolées en 2019. Une transmission de la même souche entre ces patients est donc extrêmement probable. Une enquête épidémiologique est en cours.

Cluster WGS Nr 2 (MIRU 7874-170)

1 souche MDR de 2020 montrant <2 SNP sur la totalité de son génome à une souche MDR de 2016. Un lien microbiologique et épidémiologique a été établi. La transmission de la même souche entre ces 2 patients nés en France est confirmée.

Cluster WGS Nr 3 (MIRU ?-51)

3 souches MDR de 2020, dont 2 reliées à 2 souches de 2019 par <2 SNP, et une troisième par 5 SNP. Un lien microbiologique a été montré pour 4 des 5 souches de ce cluster (2 souches de 2020 et 2 souches de 2019). Une enquête épidémiologique est en cours.

Cluster WGS Nr 4 (MIRU 16296-54)

4 souches MDR de 2020 reliées à 2 souches de 2018 et 2019, les souches du cluster montrant <2 SNP lorsqu'on compare leurs génomes. Une 7ème souche de 2019 se rattache au cluster avec une distance de 7 SNP. Deux souches de 2020 sont parfaitement identiques à 2 souches isolées en 2018 et 2019. Un lien microbiologique et épidémiologique a pu être établi pour les souches de ce cluster.

Lignée Beijing

Cluster WGS Nr 5 (MIRU 100-32)

1 souche MDR de 2020 (patient originaire d'Algérie) dont le génome est identique à ceux de 2 souches MDR de 2019 (patients d'une même famille, originaires d'Ukraine). Une enquête épidémiologique est en cours.

Cluster WGS Nr 13 (MIRU 100-32)

1 souche **XDR** de 2020, isolée d'un patient Géorgien et rattachée à un grand cluster identifié par le code MLVA 100-32, avec une distance de 9 SNP. Il n'y a donc pas eu de transmission directe entre patients sur le territoire français pour cette souche XDR. On note ici que cette souche présente un code MIRU 24 loci et un code MIRU complémentaire 4 loci identiques à la majorité des souches du cluster 100-32. L'analyse MIRU-VNTR n'aurait donc pas permis de conclure à une absence de lien épidémiologique.

Lignée Haarlem

Cluster WGS Nr 6 (MIRU 11417-31)

1 souche de 2020 reliée à 3 souches de 2014 et 2015 par < 5 SNP. Il s'agit d'un cluster connu qui s'est développé en Corse. Le lien microbiologique et épidémiologique entre la souche de 2020 et les autres souches du cluster est clairement établi.

Cluster WGS Nr 10 (MIRU 190-31)

3 souches de 2020 retrouvées au sein d'un cluster de 12 souches liées à une épidémie de tuberculose en Polynésie française. Deux des 3 souches de 2020 sont strictement identiques, la 3ème présente 9 SNP avec les 2 premières. Deux autres souches, isolées en 2017 et 2019, présentent 4 SNP de différence. Sept souches isolées entre 2015 et 2018 forment un sous-groupe dont la divergence génomique est < 2 SNP. Une telle topologie génomique évoque une chaine de transmission active de tuberculose en Polynésie française. Si on considère les 3 souches de 2020, 2 semblent résulter d'une transmission directe récente (0 SNP) alors que la 3ème (9 SNP) doit résulter d'un ou plusieurs évènements de transmission bien antérieurs à 2020 (une dizaine d'année si on considère que le génome de *M. tuberculosis* varie de 1 SNP/an).

Cluster WGS Nr 12 (MIRU 7389-15)

2 souches de 2020 présentant <3 SNP entre elles. Un lien épidémiologique a été montré pour une souche de 2019 et une des 2 souches de 2020. Une enquête épidémiologique est en cours pour la 2ème souche de 2020.

Lignée Ghana

Cluster WGS Nr 7 (MIRU 67-25)

2 souches de 2020 isolées de 2 patients de la même famille, présentant 3 SNP de différence entre elles. Le lien épidémiologique est clairement établi. Un lien microbiologique est établi entre ces 2 souches et

une souche isolée en 2015 pour laquelle nous n'avons pas le génome. Une enquête épidémiologique est en cours.

Lignée Cameroon
Cluster WGS Nr 8 (MIRU 15418-262)
2 souches de 2020 isolées de 2 patients de la même famille, originaires d'Albanie. Les génomes des 2 souches sont strictement identiques. Les 2 souches présentent la particularité de présenter un bas niveau de résistance à la rifampicine en raison d'une mutation rare N438D dans la RRDR du gène *rpoB*. La transmission d'une même souche entre ces 2 patients est certaine.

Cluster WGS Nr 9 (MIRU 5842-15)
Une souche de 2020 isolée d'un patient Somalien, montrant 2 SNP de différence avec 4 souches MDR isolées entre 2016 et 2018 à partir de patients originaires du Soudan. Le lien microbiologique est établi. La transmission n'a probablement pas eu lieu en France car le patient de 2020 est arrivé en France après que les 4 autres patients aient été traités en France pour tuberculose.

Lignée S
Cluster WGS Nr 11 (MIRU 11230-15)
1 souche de 2020 isolée d'un patient originaire de Russie, rattachée à un cluster de 5 souches isolées entre 2017 (un patient né en France et un patient né en Bulgarie), 2018 (un patient né en Roumanie) et 2019 (un patient né en France), avec au total 5 SNP de différence entre les souches. Le génome de la souche de 2020 est strictement identique à celui de la souche de 2018. Ce cluster est connu, le cas index étant probablement le patient originaire de Roumanie.

Souches XDR
Toutes les souches XDR reçues par le CNR en 2020 appartiennent à la lignée Beijing et proviennent de patients nés dans les pays de l'ex-URSS.

L'analyse WGS montre qu'en 2020, il n'y a pas eu de transmission de souche XDR en France.

Souches non reliées au décours de l'analyse WGS, analysées par MIRU
Lorsque l'analyse du génome complet ne mettait pas en évidence de lien avec d'autres souches, nous avons poussé l'analyse des souches MDR 2020 sur la base de la comparaison des codes MIRU-VNTR 24 loci (comparaison à la database CNR établie depuis 2008), 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).

La totalité des souches non reliées par WGS analysées ne sont reliées à aucune autre souche (distinguables par MIRU-VNTR, MIRU complémentaire, génotype de résistance, absence de lien épidémiologique).

Conclusions concernant le typage WGS des souches MDR

L'année 2020 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 des autres approches de séquençage), **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.

3.8.3. Tendances évolutives 2006-2020

Le Tableau 27 résume **les grappes de cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement** parmi les **souches de *M. tuberculosis* multirésistantes (MDR)** reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2020, identifiées par génotypage systématique.

Tableau 27. Résumé des analyses de grappes des cas de tuberculose MDR – 2006-2020

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
2020	**65**	1 épisode de 4 cas MDR (enquête en cours, France) $	LAM
		1 épisode de 2 cas MDR (lien épidémiologique confirmé, France) $	LAM
		1 épisode de 3 cas MDR (enquête en cours, Mali, Maroc) $	LAM
		1 épisode de 4 cas MDR (enquête en cours, Mauritanie, France) $	LAM
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Ukraine, Algérie) $	Beijing
		1 épisode de 1 cas XDR, transmission hors de France (Géorgie)	Beijing
		1 épisode de 1 cas MDR (communautaire, Corse) $	Haarlem
		1 épisodes de 3 cas MDR (enquête en cours, France (Polynésie Française) $	Haarlem
		1 épisode de 2 cas MDR (enquête en cours, Soudan) $	Haarlem
		1 épisode de 2 cas MDR (famille, enquête en cours pour un 3ème cas de 2015) $	Ghana
		1 épisode de 2 cas MDR (famille)	Cameroon
		1 épisode de 1cas MDR (enquête en cours, Somalie) $	Cameroon
		1 épisode de 1 cas MDR (enquête en cours, Russie) $	S

* 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. **En 2020, le nombre de grappes est de 13.** 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 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 concernant les enquêtes de terrain menées par les autorités sanitaires.

Les lignées dominantes impliquées dans les grappes de cas MDR reliés restent, en 2020, LAM et Haarlem. On note une diminution du nombre de grappes pour la lignée Beijing, ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de l'approche WGS beaucoup plus discriminante que la technique MIRU-VNTR pour cette famille de souches. Les autres lignées (S, Ghana, Cameroon) sont rares en 2020.

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 »**) :

- **14 épisodes de cas groupés de tuberculose à bacilles sensibles** (total 36 cas)
- **13 épisodes de cas groupés** de tuberculose à bacilles MDR (total 39 cas)

Ces épisodes ont fait l'objet **d'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 (génomes 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, 2019 et 2020 car nous avons continué à recevoir les souches environnementales isolées des **générateurs thermiques (GT)** (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 français étaient liés à l'épidémie mondiale et que les souches isolées des 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).

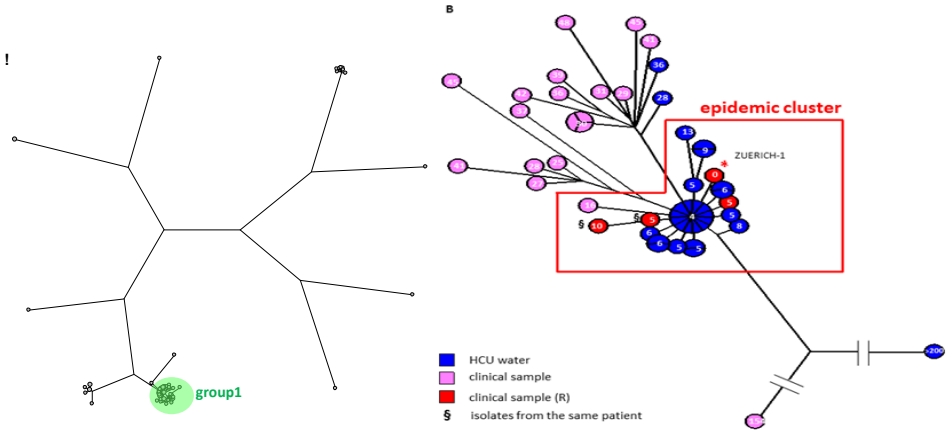
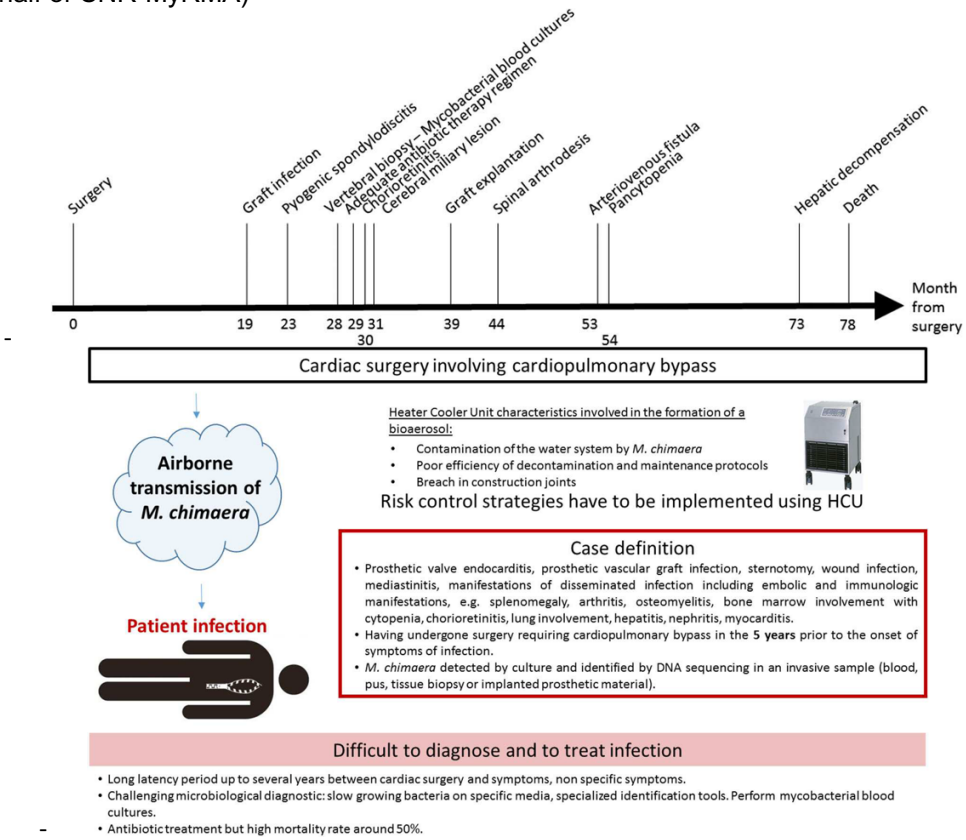


Figure 15. Résultats de l'analyse phylogénique par UMPGA de 74 souches de *Mycobacterium chimaera*: A) présentation de toutes les souches y compris des souches non liées à l'épidémie; B) présentation de toutes les souches du groupe 1 présentant moins de 200 SNPs entre elles; .

Comme les industriels des GT avaient en 2015, après l'annonce de l'épidémie, 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 une partie des résultats avaient 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).

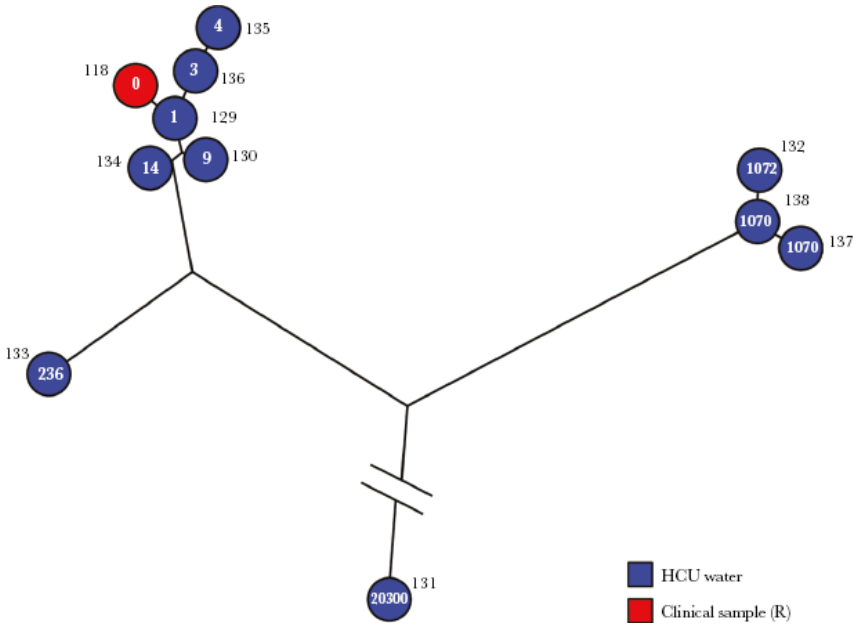
En 2020, nous avons entrepris une étude plus approfondie des 2 cas français :

- **Pour le patient n°1**, comme ce patient avait souffert d'infection pendant de nombreux mois, nous avions 2 souches isolées à un an d'intervalle. L'histoire clinique a été présentée et discutée dans un article publié dans Frontiers in Medicine (Disseminated Mycobacterium chimaera Following Open-Heart Surgery, the Heater–Cooler Unit Worldwide Outbreak: Case Report and Minireview; E Lecorche, G. Pean de Ponfilly, F. Mougari, H. Benmansour, E. Poisnel, F. Janvier, E. Cambau on behalf of CNR-MyRMA)



Les deux souches ont été comparées et ont montré 5 SNP de différences, qui vont être étudiées plus précisément en 2021.

- **Pour le patient n°2,** qui était rapidement décédé de son infection, nous avons pu récupérer lors de l'enquête avec SPF de l'eau isolées des GT utilisées dans l'établissement hospitalier. A partir de 14 prélèvements, 9 ont été positifs en culture avec *M. chimaera*. Ces souches ont été comparées à la souche isolée des hémocultures du patient infecté en 2010. La comparaison génomique est montrée ci-dessous. Cinq souches étaient très différentes (>100 SNP de différence) et 5 souches ont été trouvées comme faisant partie du cluster épidémique avec 1–14 SNP de différences par rapport à la souche clinique du patient P2.



Suite **Figure 15: C**) présentation des souches environnementales isolées dans les GTs de l'hôpital où a été opéré un des deux patients

L'ensemble de ces résultats ont été acceptés pour être publiés dans "Open forum infectious diseases "(Mycobacterium chimaera Genomics With Regard to Epidemiological and Clinical Investigations Conducted for an Open Chest Postsurgical Mycobacterium chimaera Infection Outbreak. E. Lecorche, C. Daniau, K. La Kevin, F. Mougari, H. Benmansour, S. Kumanski, J. Robert, S. Fournier, G. Lebreton, A. Carbonne, E. Cambau on behalf of the CNR-MyRMA

4.2.2. Infections à mycobactérie non tuberculeuse reliées à un signalement e.Sin en 2020

En 2019, nous avions répondu à deux épidémies, l'une due à *M. mucogenicum* et l'autre à *M. chelonae*. En 2020, nous avons répondu à l'investigation d'une **épidémie d'infections liées aux soins à *M. chelonae*** *(*esin 34797). Les premières investigations n'ont pas permis de trouver la source des infections, et de plus d'autres cas se sont déclarés en 2021.

Il s'agit de 5 cas diagnostiqués entre juin 2019 et janvier 2020 et suivis dans un même établissement de santé de cancérologie, qui ont eu soit une bactériémie à *M. chelonae* sur cathéter intra-vasculaire à type de chambre implantable (n=3), soit des infections cutanées (n=2). Les souches cliniques ont été comparées par WGS et une enquête a été réalisée par le CPIas. La comparaison des génomes a permis de mettre en évidence 2 paires de souches non différenciables par la technique utilisée, chacune des 2 paires appartenant à 2 groupes phylogénétiques différents. Lorsque ce résultat a été confronté à une première enquête épidémiologique, les groupes ne correspondaient pas à des patients hospitalisés dans les mêmes lieux ou au même moment. Une seconde enquête environnementale a été décidée, ainsi que l'analyse de souches isolées chez des nouveaux cas. Cette analyse complémentaire est en cours en 2021.

4.2.3. Recensement rétrospectif 2012-2020 des cas d'infections à mycobactéries non tuberculeuses associées aux soins

En 2020, 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-in reçus à SPF et les cas rapportés au CNR-MyRMA et ayant fait l'objet d'envoi de souches entre 2012 et 2020. Cette analyse a été finalisée et a été soumises à publication.

Au total 87 cas d'infections à MNT liées aux soins ont été étudiées. Ces infections ont été séparées par rapport au soin estimé responsable : 48 (55%) après un acte chirurgical, 28 (32%) après des procédures invasives non chirurgicales et 11 (13%) après d'autres procédures. Les MNT incriminées étaient principalement des espèces à croissance rapide (75, 86.2%) dont *M. chelonae, M. fortuitum* et *M. abscessus*, et aussi des croissances lentes comme *M. avium* complex (10/87, 11%). Dans 68 (78%) cas, un dispositif médical était impliqué. Les investigations environnementales ont été faites pour 36 (42%) cas, et ont été positives dans 12 cas avec la même espèce de MNT que pour le cas clinique. Dans 10/12 cas, les souches cliniques et environnementales avaient des génomes non différentiables (n=8) ou proches (n=2). Ceci a permis de trouver la source de l'infection et de prévenir de nombreux cas d'infection, à partir de l'eau principalement l'eau du réseau et l'eau d'une piscine de rééducation. La description de cette étude rétrospective sera finalisée dans le rapport 2021 après la publication et les dernières investigations.

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

Le CNR avait 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 avait informé SPF** et avait entrepris plusieurs types d'**investigations menées avec la direction de l'Agence.**

Le CNR (laboratoire associé) avait entrepris l'examen de très nombreux **prélèvements environnementaux** (air, eau surfaces) par culture et par PCR. Des mycobactéries non tuberculeuses avaient été trouvées dans l'eau des points d'usage mais pas l'espèce *M. abscesssus.* Une désinfection du système de climatisation avait été recommandée et effectuée.

Il n'y a pas eu de nouveau cas déclaré mais le cas index reste infecté.

5. Activités de rétro-information, formation et conseil

5.1. Formations, informations et conseils destinés aux professionnels de santé

5.1.1. 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.

5.1.2. Accueil de stagiaires en 2020

Compte tenu de la situation sanitaire due à la pandémie de Covid-19, le nombre de stagiaire a été très réduit en 2020 sur les deux sites.

Laboratoire de la Pitié-Salpêtrière

Trois stagiaires du DIU de la Tuberculose ont été accueillis les 20 et 21 août 2020.

Laboratoire Lariboisière

En plus de la situation sanitaire Covid-19, le laboratoire de l'hôpital Lariboisière a été fermé et le laboratoire s'est installé dans de nouveaux locaux à Bichat. Aucun stagiaire n'a donc été reçu en 2020.

5.1.3. Missions en 2020

A partir de Mars 2020, les missions qui étaient prévues pour 2020 n'ont pas eu lieu à cause de la pandémie Covid-19. Ces missions ont soit été reportées à 2021, soit réduites à des réunions virtuelles qui sont présentées ci-dessous :

- Réunion du réseau des CNR européens de la tuberculose et de l'ECDC (ERLTB-net): réunion physique à Lisbonne en janvier 2020 (E. Cambau et V. Jarlier)
- Réunion EUCAST sur les tests de sensibilité aux antimycobactériens : réunion physique à Malmö en février 2020 (E. Cambau, A. Aubry, N. Veziris)
- Réunions virtuelles avec l'OMS Lèpre: stratégie 2021-2030 (E. Cambau)
- Réunion virtuelle avec l'OMS NTD: surveillance de la résistance aux antibiotiques, octobre 2020 (E. Cambau)

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

Plus de 1000 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 MNT 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, dénommé **« 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. Ces RCP sont accessibles en "présentiel" ou en vidéoconférence.

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**.**

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 ».**

A/ Bilan 2020 RCP tuberculose

Au total **167 dossiers ont été discutés** par le Groupe thérapeutique au cours des **19 sessions de 2020 pour 130 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 4 réunions.

Distribution des 130 patients :
- 28 des 66 cas de tuberculose à (TB) bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2020
- 31 des 75 cas de tuberculose à (TB) bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2019
- 7 des 82 cas de tuberculose à (TB) bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2018
- 2 des 82 cas de TB à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2017
- 1 des 83 cas de TB à bacilles multirésistants (MDR-XDR) identifiés en 2013
- 22 sujets contact de cas de TB MDR pour discussion de prophylaxie ou gestion de tuberculose maladie non documentée bactériologiquement (cas pédiatriques)
- 4 cas de TB de patients présents en France mais pour lesquels la souche avait été isolée à l'étranger et n'était pas disponible. Pour ces cas, qui ne sont pas comptabilisés dans les cas identifiés à partir des souches reçues au CNR, le RCP ne disposait que des résultats émanant des laboratoires étrangers et des données cliniques.
- 34 cas de TB compliquée non MDR (9 cas d'aggravations paradoxales, 8 cas monorésistants à l'isoniazide, 1 cas monorésistant à la rifampicine et 17 de problèmes divers : toxicité, ITL autre, etc)

En 2020, 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 spécialiste des dosages antibiotiques de l'hôpital Saint-Joseph (Najoua el Helali)
- 1 spécialiste des réactions paradoxales (Anne Bourgarit)

B/ Bilan 2020 RCP Mycobactérioses

RCP Mycobactérioses : 12 réunions ont eu lieu en 2020 avec 85 cas discutés.
Les cas discutés sont :

- des infections respiratoires chez des patients atteints de mucoviscidose le plus souvent en pré-greffe ou pour lesquels l'évolution est défavorable
- des cas d'infections respiratoires sur autres terrains (emphysème, BPCO, DDB, personne > 60 ans sans atcd)
- des cas d'infections extra- respiratoires en particulier liées aux soins et iatrogènes: ces cas sont étudiés dans le cadre des signalements esin avec la cellule IAS de SPF (voir collaboration)
- des cas d'infection respiratoire en demande d'autorisation de l'amikacine liposomale en ATU

RCP Lèpre : 10 réunions en 2020 avec 21 cas discutés.

La discussion porte sur
- des cas suspects avec clinique atypique (forme neurologique, une ou deux lésions atypiques, érythème noueux)
- des cas de lèpre avérés mais avec prise en charge difficile (mineurs, migrants en difficulté, cas signalés aux CIRE ou aux ARS)
- des cas sous traitement avec des complications à type de réactions ou suspects d'échecs
- des cas suivis après l'arrêt du traitement pour suspicion de rechute et de résistance aux antilépreux

C/ Tendances évolutives 2006-2020 RCP 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. Cette activité de conseil s'est réduite de moitié en 2020 probablement à mettre en rapport avec la diminution du nombre de cas de TB et de TB MDR et de la mobilisation des professionnels sur le front du COVID (Tableau 28).

Tableau **28**. Résumé des activités de conseil assurées par la RCP du CNR-MyrMA de 2006 à 2020

	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	14	298	**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
2020	19	167	**Les 167 dossiers examinés correspondent à 130 patients :** Il s'agissait de : - 28 des 66 cas MDR-XDR de 2020 - 31des 75 cas MDR-XDR de 2019 - 7des 82 cas MDR-XDR de 2018 - 3 cas MDR-XDR de 2013 et 2017 - 4 cas présents en France avec documentation MDR à l'étranger - 22 sujets contact de cas MDR - 34 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 2020 ont fait 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 à mycobactéries.

En 2020, 684 conseils ont été donnés :
- 34% pour traitement de mycobactériose
- 33% pour traitement de tuberculose compliquée
- 14% pour traitement de tuberculose MDR
- 14% pour problème diagnostique
- 5% 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
- E. Cambau, F. Mougari, E. Lecorche, ont participé à des réunions de travail virtuelle (juillet, octobre) avec SPF (A. Carbonne, C. Daniau), sur la surveillance des infections liées aux soins à mycobactéries non tuberculeuses. Les résultats sont présentés dans la section Alertes, et sont en cours de publication.
- J. Robert a assuré le suivi du travail des années précédentes sur eDO.

Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) et Haute Autorité de Santé (HAS)
- E. Cambau a participé début 2020 à deux réunions du groupe de travail sur une saisine concernant la lutte contre la lèpre en France. Les réunions ont été suspendues en mars 2020 à cause de la pandémie Covid-19.

INSERM – AVIESAN (Alliance pour les sciences de la vie et de la santé)
- E. Cambau et N. Veziris ont participé à une réunion du comité de pilotage « Action coordonnée Tuberculose » de L'institut thématique multi-organisme « Immunologie, inflammation, infectiologie et microbiologie » (ITMO I3M) et de l'ANRS-section tuberculose en février 2020. Une réunion était prévue en mai 2020 mais a été annulée pour cause de pandémie Covid-19.

.
CA-SFM
- A. 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
- E. 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 réunion virtuelle pour présenter la nouvelle stratégie 2021-2030. (http://www.searo.who.int/entity/global_leprosy_programme/en).

ECDC
- E. Cambau et V. 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 la 1ème réunion annuelle du réseau ERLN-TB à Lisbonne en janvier 2020.
- E. Cambau fait partie du groupe d'écriture 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 et n'a pas été faite pour cause de la pandémie Covid-19.

EMA – EUCAST

- E. 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). Il n'y a pas eu de réunion en 2020.
- E. Cambau est depuis 2016 responsable du sous-comité pour les mycobactéries (EUCAST subcommittee on antimycobacterial susceptibility testing, AMST). En 2020, il y a eu plusieurs réunions dont une présentielle à Malmö en février 2020, les autres en virtuel, réunissant les membres du sous-comité AMST ou en plénier avec les membres de EUCAST steering committee. Le comité a validé la nouvelle méthode de référence EUCAST pour déterminer les CMI des antituberculeux sur *M. tuberculosis*: méthode de microdilution en milieu liquide de Middlebrook 7H9-10% OADC. Les prochains objectifs sont (1) de mettre en place une méthode standardisée de détermination des CMI pour les mycobactéries non tuberculeuses (2) d'adapter la méthode de référence aux nouveaux antituberculeux (bédaquiline, délamanide, pretomanide…).

ESCMID

- Il n'y a pas eu de réunion du groupe ESGMYC en 2020 car le congrès ECCMID qui devait se tenir à Paris en avril 2020 a été annulé du fait de la pandémie Covid-19.
- En 2020, L. Guglielmetti a été élu Trésorier du groupe ESGMYC pour une durée de trois ans.
- E. 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 enfin publié en 2020 dans Clinical infectious diseases et European Journal of Respiratory diseases. L. Guglielmetti est aussi inclus parmi les experts du "Guideline committee" pour l'ESCMID.

ERS

- L. Guglielmetti est depuis 2018 expert pour la tuberculose et l'épidémiologie des maladies infectieuses pour le "ERS Fellowship and Awards Working Group" et membre du "ERS College of Experts". Il est aussi le co-Président de la Collaboration pour la Recherche Clinique entre TBnet et ERS.

ISTC

- Emmanuelle Cambau est experte 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. Il n'y a pas eu de projet à étudier en 2020.

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++. Il y a eu une réunion virtuelle en 2020.
- E. 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). Il y a eu deux réunions virtuelles en 2020 de l'ensemble du consortium et une réunion mensuelle est organisée pour le *Work Package* de biologie moléculaire.
- L. Guglielmetti fait partie depuis 2014 du Comité de Pilotage de TBnet, un réseau de recherche et formation européen sur la tuberculose. En 2020, il a été élu responsable de l'activité de Recherche Clinique du réseau.
- L. Guglielmetti est Investigateur Principal de deux essais cliniques sur la tuberculose MDR (endTB & endTB-Q) dont le promoteur est Médecins Sans Frontières, financés par UNITAID. Les inclusions des participants ont continué en 2020 dans huit pays et quatre continents.

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

6.1. Travaux de recherche

Régime antituberculeux hebdomadaire complet : une étude de preuve de concept

Contexte : l'organisation mondiale de la santé recommande de superviser le traitement de la tuberculose. Des régimes thérapeutiques intermittents pourraient simplifier la supervision et ainsi améliorer l'observance thérapeutique. Notre objectif était d'analyser l'activité stérilisante de schémas hebdomadaires à base d'antibiotiques à longue demi-vie, la bédaquiline et la rifapentine, dans un modèle murin de tuberculose.

Méthodes : 300 souris Swiss ont été infectées par voie intraveineuse avec 10^6 UFC *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Les souris ont été traitées une fois par semaine avec des régimes contenant : 1) de la bédaquiline, de la rifapentine et du pyrazinamide (BPZ) ; 2) BPZ plus de la moxifloxacine (BPZM) ; 3) BPZM plus de la clofazimine (BPZMC) ; 4) le régime quotidien standard de la tuberculose. Tous les régimes ont été administrés pendant 4 ou 6 mois. L'activité bactéricide a été évaluée en fin de traitement et l'activité stérilisante 3 mois après la fin du traitement.
Résultats : Après 2 mois de traitement, la charge bacillaire moyenne dans les poumons était de 0,76±0,60 log10 CFU chez les souris traitées avec le traitement standard quotidien et nulle chez toutes les souris traitées avec un régime hebdomadaire ($p<0,05$ par rapport au contrôle quotidien). Toutes les souris ont eu des cultures pulmonaires négatives à la fin de 4 ou 6 mois de traitement, alors que 3 mois après 4 et 6 mois de traitement, respectivement, le taux de rechute était de 64% et 13% dans le régime quotidien standard, 5% et 0% dans le BPZ, 0% et 0% dans le BPMZ et 0% et 5% dans le BPMZC ($p<0,05$ pour tous les régimes hebdomadaires par rapport au contrôle quotidien de 4 mois ; $p>0,05$ pour tous les régimes hebdomadaires par rapport au contrôle quotidien de 6 mois).

Conclusions : Les schémas hebdomadaires à base de BPZ ont une activité stérilisante plus élevée que le schéma quotidien standard et pourraient simplifier considérablement l'administration du traitement et éventuellement réduire la durée du traitement de la tuberculose.

Ce travail a été publié en 2020 et a fait l'objet d'un éditorial : Fully weekly antituberculosis regimen: a proof-of-concept study. Kort F, Fournier Le Ray L, Chauffour A, Jarlier V, Lounis N, Andries K, Aubry A, Guglielmetti L, Veziris N. **Eur Respir J**. 2020 Sep 3;56(3):1902502.

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 MNT 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 en 2020 : 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).

Découverte d'un nouveau variant génomique de Mycobacterium leprae spécifique des cas de lèpre à Madagascar

Nous avons participé à l'étude génomique des souches de *M. leprae* isolées chez des patients originaires des Comores et de Madagascar, soit diagnostiqués en France soit diagnostiqués dans le cadre de notre activité supranationale OMS. Afin de caractériser la diversité des souches, 33 génomes ont été comparés entre eux et à 242 génomes de la base de données constituée par l'équipe du Pr S. Cole (EPF de Lausanne et I. Pasteur Paris). Toutes les souches ont révélé être du même génotype 1D sauf 2 souches de génotype 1A. Ces souches 1D sont différentes des souches 1D trouvées dans d'autres pays et ont été individualisées sur l'arbre phylogénétique sous le nom de 1D-Malagasy. L'approche par datation moléculaire a estimé au 9eme siècle la séparation avec l'ancêtre commun aux autres souches 1D. Ceci écarterait l'introduction de la lèpre à Madagascar et aux Comores par les premiers colons austronésiens et suggère une origine par l'Afrique de l'Est, le Moyen-Orient ou l'Asie du Sud.
Ces travaux ont été publiés en 2020 dans **Front Microbiol**. 2020 May 11;11:711. doi: 10.3389/fmicb.2020.00711. eCollection 2020. PMID: 32477280 (Population Genomics of Mycobacterium leprae Reveals a New Genotype in Madagascar and the Comoros. par Avanzi C, Lécorché E, Rakotomalala FA, Benjak A, Rapelanoro Rabenja F, Ramarozatovo LS, Cauchoix B, Rakoto-Andrianarivelo M, Tió-Coma M, Leal-Calvo T, Busso P, Boy-Röttger S, Chauffour A, Rasamoelina T, Andrianarison A, Sendrasoa F, Spencer JS, Singh P, Dashatwar DR, Narang R, Berland JL, Jarlier V, Salgado CG, Moraes MO, Geluk A, Randrianantoandro A, Cambau E, Cole ST.)

Evaluation de l'activité bactéricide et stérilisante de trithérapies bihebdomadaires de 4 semaines par l'ajout de clofazimine aux associations de rifapentine avec clarithromycine ou bédaquiline ou Q203, dans le traitement expérimental de l'ulcère de Buruli (infection à M. ulcerans)

L'objectif était d'évaluer si l'addition de clofazimine aux bithérapies qui sont connues pour être efficaces en 8 semaines (rifapentine 20 mg/kg associée à la clarithromycine ou bédaquiline ou Q203) permettrait d'obtenir un traitement stérilisant bihebdomadaire de 4 semaine (8 prises).
Alors que les bithérapies de 8 semaines ont négativé les cultures et empêché les rechutes bactériologiques 24 semaines après la fin du traitement, les trithérapies de 4 semaines (addition de clofazimine) n'ont pas négativé les cultures ni empêché les rechutes bactériologiques. Ces résultats sont décevants mais il faut noter qu'une lecture détaillée des publications qui suggèrent un effet synergique de la clofazimine dans l'ulcère de Buruli montre que le modèle murin utilisé était moins stringent (inoculum plus faible) que le nôtre et que la synergie apportée par la clofazimine n'a été constatée que pour une partie des indicateurs utilisés.

6.2. Publications et communications

6.2.1. Publications Internationales

1. Rational choice of antibiotics and media for Mycobacterium avium complex susceptibility testing. J. Jaffré, A. Aubry, T. Maitre, F. Morel, F. Brossier, J Robert, W. Sougakoff, N Veziris and the CNR-MyRMA Front Microbiol 2020 https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00081
2. Rifampicin and clarithromycin (extended Release) versus rifampicin and streptomycin for limited Buruli ulcer lesions: a randomized, open-label, non-inferiority phase 3 trial. R. O. Phillips, J. Robert, K M. Abass, W. Thompson, FS. Sarfo, T. Wilson, G. Sarpong, T. Gateau, A. Chauty, R. Omollo, M. Ochieng Otieno, TW. Egondi, E O Ampadu, D. Agossadou, E. Marion, L. Ganlonon, M. Wansbrough-Jones, J. Grosset, J. M Macdonald, T. Treadwell, P. Saunderson, A. Paintsil, L. Lehman, M. Frimpong, F. Nanaa Sarpong, R. Saizonou, A. Tiendrebeogo, SA Ohene, Y. Stienstra, K. B Asiedu, T. van der Werf. 2020; Lancet 2020 ;395 :1259-1267. doi : 10.1016/S0140-6736(20)30047-7
3. Telacebec (Q203)-containing intermittent oral regimens sterilized miced infected with Mycobacterium ulcerans after only 16 doses. Chauffour, J. Robert, N. Veziris, A. Aubry, K. Pethe, V. Jarlier. PLOS NTD 2020. https://doi.org/10.1371/journal.pnt…
4. Abdominal Tuberculosis: Experience from Two Tertiary-Care Hospitals in the Paris Region. Calin R, Belkacem A, Caraux-Paz P, Wagner M, Guillot H, Veziris N, Jaureguiberry S, Caumes E, Patey O, Pourcher V. Am J Trop Med Hyg. 2021;104(1):223-228. doi : 10.4269/ajtmh.20-0023

5. Bedaquiline and delamanid for drug-resistant tuberculosis: a clinician's perspective. Guglielmetti L, Chiesi S, Eimer J, Dominguez J, Masini T, Varaine F, Veziris N, Ader F, Robert J. Future Microbiol. 2020 Jun ;15:779-799. doi : 10.2217/fmb-2019-0309. Epub 2020 Jul 23
6. Linezolid-Associated Neurologic Adverse Events in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis, France. Jaspard M, Butel N, El Helali N, Marigot-Outtandy D, Guillot H, Peytavin G, Veziris N, Bodaghi B, Flandre P, Petitjean G, Caumes E, Pourcher V. Emerg Infect Dis. 2020 Aug ;26(8):1792-1800. doi : 10.3201/eid2608.191499
7. Fully weekly antituberculosis regimen: a proof-of-concept study. Kort F, Fournier Le Ray L, Chauffour A, Jarlier V, Lounis N, Andries K, Aubry A, Guglielmetti L, Veziris N. Eur Respir J. 2020 Sep 3 ;56(3):1902502. doi : 10.1183/13993003.02502-2019
8. Management of Tuberculosis: Are the Practices Homogeneous in High-Income Countries? Méchaï F, Cordel H, Guglielmetti L, Aubry A, Jankovic M, Viveiros M, Santin M, Goletti D, Cambau E. Front Public Health. 2020 Sep 4 ;8:443. doi : 10.3389/fpubh.2020.00443
9. Multicentre testing of the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination on Mycobacterium tuberculosis. Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, Mouton J, Matuschek E, Kahlmeter G, Giske C, Santin M, Cirillo DM, Viveiros M, Cambau E. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.019
10. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, Cambau E, Wallace RJ, Andrejak C, Böttger EC, Brozek J, Griffith DE, Guglielmetti L, Huitt GA, Knight SL, Leitman P, Marras TK, Olivier KN, Santin M, Stout JE, Tortoli E, van Ingen J, Wagner D, Winthrop KL. Clin Infect Dis 2020 Aug 14;71(4):e1-e36. doi: 10.1093/cid/ciaa241.
11. What is the role of the EUCAST reference method for MIC testing of the Mycobacterium tuberculosis complex ? Schön T, Köser CU, Werngren J, Viveiros M, Georghiou S, Kahlmeter G, Giske C, Maurer F, Lina G, Turnidge J, van Ingen J, Jankovic M, Goletti D, Cirillo DM, Santin M, Cambau E ; ESGMYC. Clin Microbiol Infect. 2020 Nov ;26(11):1453-1455. doi : 10.1016/j.cmi.2020.07.037.
12. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, Mouton J, Matuschek E, Kahlmeter G, Giske C, Santin M, Cirillo DM, Viveiros M, Cambau E. Clin Microbiol Infect. 2020 Nov ;26(11):1488-1492. doi : 10.1016/j.cmi.2020.07.036.
13. Disseminated Mycobacterium chimaera Following Open-Heart Surgery, the Heater-Cooler Unit Worldwide Outbreak: Case Report and Minireview. Lecorche E, Pean de Ponfilly G, Mougari F, Benmansour H, Poisnel E, Janvier F, Cambau E. Front Med (Lausanne). 2020 Jun 16 ;7:243. doi : 10.3389/fmed.2020.00243.
14. Epidemic and pandemic viral infections: impact on tuberculosis and the lung: A consensus by the World Association for Infectious Diseases and Immunological Disorders (WAidid), Global Tuberculosis Network (GTN), and members of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group for Mycobacterial Infections (ESGMYC). Ong CWM, Migliori GB, Raviglione M, MacGregor-Skinner G, Sotgiu G, Alffenaar JW, Tiberi S, Adlhoch C, Alonzi T, Archuleta S, Brusin S, Cambau E, Capobianchi MR, Castilletti C, Centis R, Cirillo DM, D'Ambrosio L, Delogu G, Esposito SMR, Figueroa J, Friedland JS, Ho BCH, Ippolito G, Jankovic M, Kim HY, Rosales Klintz S, Ködmön C, Lalle E, Leo YS, Leung CC, Märtson AG, Melazzini MG, Najafi Fard S, Penttinen P, Petrone L, Petruccioli E, Pontali E, Saderi L, Santin M, Spanevello A, van Crevel R, van der Werf MJ, Visca D, Viveiros M, Zellweger JP, Zumla A, Goletti D. Eur Respir J. 2020 Oct 1 ;56(4):2001727. doi : 10.1183/13993003.01727-2020.
15. Population Genomics of Mycobacterium leprae Reveals a New Genotype in Madagascar and the Comoros. Avanzi C, Lécorché E, Rakotomalala FA, Benjak A, Rapelanoro Rabenja F, Ramarozatovo LS, Cauchoix B, Rakoto-Andrianarivelo M, Tió-Coma M, Leal-Calvo T, Busso P, Boy-Röttger S, Chauffour A, Rasamoelina T, Andrianarison A, Sendrasoa F, Spencer JS, Singh P, Dashatwar DR, Narang R, Berland JL, Jarlier V, Salgado CG, Moraes MO, Geluk A, Randrianantoandro A, Cambau E, Cole ST. Front Microbiol. 2020 May 11 ;11:711. doi : 10.3389/fmicb.2020.00711.
16. Sniffing animals as a diagnostic tool in infectious diseases. Cambau E, Poljak M. Clin Microbiol Infect 2020; 26:431-435.
17. Prospective study comparing the conventional and same-day strategies to diagnose pulmonary tuberculosis. Lopes A, Mougari F, Chopin D, Pogliaghi M, Munier AL, Delcey V, Simoneau G, Raskine L, Evans J, Mouly S, Cambau E, Bergmann JF, Sellier P. Med Mal Infect 2020; 50:36-42.
18. Use of a whole genome sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study. Tagliani E, Anthony R, Kohl TA, de Neeling A,

Nikolayevskyy V, Ködmön C, Maurer FP, Niemann S, van Soolingen D, van der Werf MJ, Cirillo DM; ECDC molecular surveillance project participants. Eur Respir J. 2021 Jan 5;57(1):2002272.
19. Targeted next-generation sequencing: a Swiss army knife for mycobacterial diagnostics? Mohamed S, Köser CU, Salfinger M, Sougakoff W, Heysell SK. Eur Respir J. 2021 Mar 18;57(3):2004077.
20. Clinical perspectives on treatment of rifampicin-resistant/multidrug-resistant TB. Cox V, McKenna L, Acquah R, Reuter A, Wasserman S, Vambe D, Ustero P, Udwadia Z, Trivino-Duran L, Tommasi M, Skrahina A, Seddon JA, Rodolfo R, Rich M, Padanilam X, Oyewusi L, Ohler L, Lungu P, Loveday M, Khan U, Khan P, Hughes J, Hewison C, Guglielmetti L, Furin J. Int J Tuberc Lung Dis 2020; 24(11):1134-1144. doi: 10.5588/ijtld.20.0330.
21. Drug-associated adverse events in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. Lan Z, Ahmad N, Baghaei P, Barkane L, Benedetti A, Brode SK, Brust JCM, Campbell JR, Chang VWL, Falzon D, Guglielmetti L, Isaakidis P, Kempker RR, Kipiani M, Kuksa L, Lange C, Laniado-Laborín R, Nahid P, Rodrigues D, Singla R, Udwadia ZF, Menzies M, and The Collaborative Group for the Meta-Analysis of Individual Patient Data in MDR-TB treatment 2017 Lancet Resp Med 2020; 8(4):383-394.
22. Challenges in TB regimen development: preserving evidentiary standards for regulatory decisions and policymaking. Guglielmetti L, Low M, McKenna L. Exp Rev Antimicrobiol Ther 2020; DOI: 10.1080/14787210.2020.1756776.
23. WHO 2019 guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment: based on evidence or expert opinion? Guglielmetti L, Huerga H, Khan U, Varaine F. Eur Respir J 2020; 55: 1901935.

6.2.2. Publications nationales

1. [Molecular diagnosis of tuberculosis]. Morel F, Jaffré J, Sougakoff W, Aubry A, Véziris N. Rev Mal Respir. 2020 May ;37(5):412-416. doi : 10.1016/j.rmr.2019.09.004
2. Association of borderline tuberculoid leprosy and tuberculosis: A case report and review of the literature. Rousset L, Sokal A, Vignon-Pennamen MD, Pagis V, Rybojad M, Lecorche E, Mougari F, Bagot M, Bouaziz JD, Jachiet M. Ann Dermatol Venereol. 2020 Dec;147(12):886-891. doi: 10.1016/j.annder.2020.09.571. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33127165 French

6.2.3. Communications internationales (sans invitation)

1. A. Godmer, N. Veziris, C. Eckert, S. Gallah, A. Aubry, L. Benzerara. Detection of antimicrobial resistance in Mycobacterium abscessus complex by MALDI-TOF MS. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
2. F. Morel, G. Millot, J. Jaffre, A. Aubry, N. Veziris, J. Robert, V. Jarlier, E. Tagliani, W. Sougakoff Genomic analysis of multi-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in France: evolution from 2006 to 2018. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
3. N. De Castro, F. Méchaï, D. Bachelet, A. Canestri, V. Joly, M. Vandenhende, D. Boutoille, M. Kerjouan, N. Veziris, J. Molina, N. Grall, P. Tattevin, C. Laouenan, Y. Yazdanpanah. Detection of rifampin and isoniazid resistance using molecular testing to initiate an ethambutol-free 3-drug regimen in pulmonary tuberculosis: a French noninferiority multi-centre randomised clinical trial. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
4. S. Chiesi, L. Guglielmetti, M. Bachir, A. Aubry, N. Veziris, N. Lemaitre, J. Robert. Are large cities at higher risk for tuberculosis drug resistance? A French appraisal. 30th European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Paris 2020
5. R. Chiron, N. Veziris, C. Andrejak, W. Hoefsloot, Z. Aoun, C. Audoly, D. Basille, A. Benattia, A. Bergeron, J. F. Bervard, J. F. Boitiaux, A. Bourdin, D. Bouvry, J. Cadranel, G. Chatté, L. Colombain, J. L. J. Couderc, B. Crestani, J. Crouzet, G. Desléee, B. Douvry, M. Drevait, M. Dupuy Grasset, S. Jouneau, M. Kerjouan, S. Leroy, T. Maitre, J. P. Mallet, M. Massongo, M. Murris Espin, A. Payet, P. Predère, A. Prevotat, C. Rogé, F. Schlemmer, L. Slim, C. Toper, F. Tritar, M. C. Parizi, V. Bouix, F. X. Blanc, E. Catherinot. An expert statement on clinical considerations before treating NTM lung infection. European Respirarory Congress. 2020
6. T. Maitre, S. Lociuro, M. Pieren, A. Chauffour, L. Fournier Le Ray, A. Aubry, N. Willand, A. Baulard, M. Gitzinger, N. Veziris. Drug combinations against multi-resistant bacteria. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. E-oral poster session. **2020** (congress has been given online due to the Covid-19 outbreak)
7. I. Bonnet, S. Goumghar, G. Millot, J. Jaffré, A. Aubry, J. Robert, W. Sougakoff. One-year evaluation of Genelead VIII combined to Deeplex-MycTB to detect rapidly the genotype and the resistance profile of Mycobacterium tuberculosis complex directly from clinical samples. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **2020** (congress has been given online due to the Covid-19 outbreak)
8. A. Bleibtreu, I. Bonnet, S. Jaureguiberry, B. Fautrel, E. Caumes, J. Robert, E. Fourniols, A. Aubry. Clinical features of infection caused by non-tuberculous mycobacteria: 9 years' experience. 30th European

Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **2020** (congress has been given online due to the Covid-&9 outbreak)

9. A. Chauffour, E. Lecorche, F. Mougari, A. Aubry, R. Andriamirandriana, M. Kodio, A. Fomba, S. Sow, G. Moussa, M. Sidibe, B Cauchoix, R.C. Johnson, V. Jarlier, E. Cambau. The rates of antimicrobial resistance in leprosy are higher among cases diagnosed in France than in those diagnosed in African countries (WHO sentinel surveillance network). 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **2020** (congress has been given online due to the Covid-&9 outbreak)
10. F. Méchaï, H.Cordel, A. Aubry, M. Jankovic, M. Viveiros, M. Santin, D. Goletti, L. Guglielmetti, E. Cambau, on behalf of the ESGMYC group. Management of tuberculosis in Europe. 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **2020** (congress has been given online due to the Covid-&9 outbreak)

6.2.4. Communications nationales (sans invitation)

1. Caractéristiques et pronostic des malades avec prélèvements respiratoires positifs pour mycobactéries non tuberculeuses (MNT)-étude de cohorte rétrospective de 171 cas consécutifs. L. Deneuville, C. Verdet, P. Lévy, A. Parrot, J.M. Naccache, G. Pialoux, N. Veziris, J.Cadranel. 24ème Congrès de Pneumologie de Langue Française, Paris, 2020.
2. Burden of non-tuberculous mycobacterial lung disease (NTMLD) in France: a claim database analysis. Veziris N, Andrejak C, Chiron R, Obradovic M, Charillat J, Emery C, Bouee S. 40ème Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris. 2020
3. Détection rapide de la résistance chez M. tuberculosis par Deeplex. Bonnet I, Jaffré J, Enouf V, Ok V, Morel F, Aubry A, Robert J, Sougakoff W. RICAI, Paris 2020
4. Using whole genome sequencing to assess M. leprae transmission in French overseas Territories E. Lecorche, V. Baron, D. Mohand-Oussaid, C. Avanzi, A. Chauffour, E. Klement, F. Mougari, H. Benmansou, V. Jarlier, E. Cambau 15e JMLF, 10-11 septembre 2020, Faculté de Médecine de Montpellier
5. Epidémie de bactériémies à Mycobacterium mucogenicum dans un Institut de Cancérologie liée à une contamination du réseau d'eau. Titre session : COM-04 - Environnement hospitalier ou "inhospitalier" Ory J, Lecorche E, Enault C, Aumeran C, Cambau E, Barrigah-Benissan K, Traore O, Lavigne J, Pantel A. RICAI 2020.
6. Tuberculose MDR : quelle approche utiliser pour détecter les souches portant des mutations en dehors de la région RRDR ? E. Manteaux, I. Bonnet, H. Watry, F. Morel, E. Jeanmaire, W. Sougakoff, A. Lozniewski, A. Aubry, C. Alauzet*. Journées de Mycobactériologie de Langue Française. Montpellier. 2020.

6.2.5. Communications internationales sur invitation

1. N. Veziris. ARIKAYCE® liposomal in practice – a clinician's perspective. 4th World Bronchiectasis & NTM Conference. Online, 2020
2. E. Cambau. Reference method for susceptibility testing in tuberculosis; reseau européen ERLTB net et ECDC, Janvier 2020 Lisbonne
3. E. Cambau. EUCAST antimycobacterial susceptibility testing: meeting with companies about the new reference method; EUCAST meeting in Malmö février 2020
4. E. Cambau. Updates on diagnosis of leprosy – early detection and antimicrobial resistance, congrès annuel de l'American society of tropical medicine and hygiene, octobre 2020
5. E. Cambau. Antimicrobial resistance monitoring in Leprosy treatment; WHO neglected tropical diseases: Webinar on NTDs and prevention of antimicrobial resistance, novembre 2020
6. W. Sougakoff. DEEPLEX: a novel approach for fast detection of multidrug resistant TB from clinical specimens. MOOC "Tuberculosis" organisé par l'Institut Pasteur de Paris. Novembre 2020
7. Establishing new treatments: the role of randomized controlled trials. Congress of the European Respiratory Society (08/09/2020)
8. COVID-19 and TB – current evidence and clinical lessons learned. Webinar organized by the Latvian WHO Collaborative Center, Riga (22/05/2020)

6.2.6. Communications nationales sur invitation

1. L. Guglielmetti, N. Veziris. Tuberculoses difficiles à traiter. Colloque Experts Praticiens Infectiologie, Paris, 2020
2. N. Veziris. Nouveaux antituberculeux. 21èmes journées nationales d'infectiologie. Poitiers, 2020.
3. A. Aubry. La tuberculose : une pandémie toujours d'actualité. Congrès de la Société Francaise de Mircobiologie. 2020.

6.2.7. Organisation de colloques / congrès

1. E. Cambau – EUCAST AMST workshop on the 4th of February 2020, Malmö, Sweden on the EUCAST reference method for the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

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

7.1. 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 2020.
Il n'y a pas eu de réunions spécifiques avec la MSA en 2020

7.2. 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.

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 ».
Il est régulièrement appliqué au CNR

- **en cas de cas groupés d'infections pour lesquels la source peut être l'eau de l'établissement de soins ou du domicile, plus rarement de solutés. (voir § alertes et génomiques**)
- Il a été parfois utilisé aussi pour rechercher la cause d'une infection grave à MNT.

Ce protocole a été présenté à l'AFNOR en 2018, mais il n'y a pas eu encore de conclusions données en 2020 car toutes les réunions ont été annulées et reportées à 2021 du fait de la situation sanitaire.

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 2020 (cf section 4 « Alertes » pour les détails) nous avons participé à plusieurs investigations concernant des cas groupés d'infections à mycobactéries non tuberculeuses dont nous avons dû analyser des prélèvements environnementaux.

7.3. 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 courriel soit à travers le site internet http://cnrmyctb.free.fr.
Chaque année, nous répondons à plus de 1000 appels ou courriels.

8.1.1. Expertise pour les laboratoires français

Nous continuerons à concentrer nos efforts sur l'aide apportée aux 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 autres laboratoires de mycobactériologie d', 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. Néanmoins, de nombreux patients sont en échec thérapeutique à cause d'une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et **à cause d'une résistance acquise à cause des traitements antibiotiques itératifs de certaines pathologies chroniques** (ex. mucoviscidose, VIH, greffes...) puisque ces infections sont traitées par des antibiotiques utilisés pour les infections à bactéries autres que les mycobactéries (bêta-lactamines, aminosides, macrolides, etc…). Nous apportons donc une expertise microbiologique que ne peuvent pas faire d'autres laboratoires en recherchant des innovations techniques et en participant à l'élaboration des recommandations internationales (guidelines thérapeutiques ESCMID-ERS-IDSA-ATS et EUCAST).
Nous étudions aussi **les cas d'infections associées aux soins liées à des MNT,** 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 ».

Pour *M. leprae* : sur les cas suspects et avérés de lèpre diagnostiqués en métropole ou dans les territoires français Outre-mer. Nous avons mis en place d'une part un conseil diagnostic et thérapeutique sous la forme de RCP, et d'autre part nous sommes en lien avec les collègues des hôpitaux des territoires Outre-mer (Cayenne, Mamoudzou, St Pierre de la Réunion, Nouméa, Pointe-à-Pitre, Fort-de-France, Tahiti) d'où sont originaires la majorité des cas étudiés. Nous développons notre expertise en mettant à disposition des techniques moléculaires appropriées au diagnostic des cas de lèpre et à l'étude de la résistance aux anti-lépreux. Enfin, nous sommes l'interlocuteur du Ministère de la Santé et de l'OMS pour la déclaration annuelle des cas.

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 ré-isolement en subculture. Lorsque les résultats sont insuffisants, les méthodes de biologie moléculaire sont appliquées, en commençant par **l'amplification d'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
Nous continuerons à utiliser les méthodes phénotypiques d'antibiogramme pour évaluer la résistance aux antibiotiques.

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. Nous pilotons maintenant ce travail au sein du nouveau comité spécifique EUCAST pour les mycobactéries (ECUAST-AMST) et mettons en place d'abord des tests standardisés.
Nous utiliserons aussi les recommandations qui seront issues des « guidelines » dans le cadre d'un partenariat ESCMID-IDSA-ATS-ERS : certaines ont été publiées en 2020 et seront complétées dans les années à venir au fur et à mesure de l'acquisition des connaissances sur ces MNT.

Tests génotypiques de résistance aux antimycobactériens

- **La détection moléculaire de la résistance aux antibiotiques chez *M. tuberculosis*** mettra en œuvre les nouvelles techniques introduites au CNR depuis 2019 :
- Pour les **antituberculeux « piliers » du traitement standard de la tuberculose** (**rifampicine, isoniazide)**, nous utiliserons en priorité le **nouveau kit MDR/MTB ELITe MGB®** (ELITech) porté par la plateforme ELITe InGenius qui est un nouveau test PCR en temps réel qui permet l'extraction automatisée et la détection simultanée de l'ADN du complexe *M. tuberculosis* (MTB) et des mutations des gènes *rpoB* et *katG* et de la région promotrice *inhA* (pro-inhA) associées à la résistance à la rifampicine (RIF) et à l'isoniazide (INH), les deux marqueurs de la tuberculose multirésistante (MDR).
- Pour les **autres antituberculeux**, nous utiliserons la **nouvelle approche GeneLEADVIII (**plateforme entièrement automatisée pour l'extraction d'ADN et la détection par PCR du complexe *M. tuberculosis* directement à partir d'échantillons cliniques) **couplée au kit DEEPLEX (**kit diagnostic basé sur le séquençage NGS à grande profondeur d'un mélange d'amplicons 24-plexés permettant simultanément la détection de la résistance à 13 antituberculeux et la détermination du spoligotype de MTBC), ainsi que **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®, un test moléculaire de détection de la résistance que nous avons développé en partenariat avec l'industriel allemand Hain Lifesciences (aujourd'hui Bruker diagnostics) et qui permet une bonne détection de la résistance à la clarithromycine, principal antibiotique pour les MNT. Ce test est utilisable pour les principales espèces isolées (*M. avium* complex, *M. abscessus, M. chelonae)* 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).* La mise en place de séquençage génomique sera nécessaire pour l'étude plus large des gènes de résistance aux antibiotiques chez les MNT.

- **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 quantitative 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 l'industriel allemand Hain Lifesciences, (aujourd'hui Bruker diagnostics)et qui est progressivement adoptée par le réseau de surveillance de la résistance aux antilépreux de l'OMS, enfin (d) un séquençage génomique afin de préciser certaines résistances cliniques et aussi utilisé pour des études épidémiologiques.

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

A/ M. tuberculosis (Laboratoire PSL)

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 « GeneLEADVIII-Deeplex » (cf. section 2 § nouvelles techniques)**

Cette approche combine une nouvelle technique de PCR d'identification du complexe *M. tuberculosis* et du clade (spoligotype, **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 termes de détection du complexe *M. tuberculosis* permettant de **travailler directement à partir du prélèvement**, **ce qui n'est pas encore possible 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 13 antituberculeux de 1ère et 2ème ligne**. Un séquençage avec une très grande profondeur de couverture des cibles amplifiées (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 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 **MDR/MTB ELITe MGB®** (ELITech) porté par la plateforme ELITe InGenius

- 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 rare (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 matériel bactérien (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, exclura 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). Le logiciel BioNumerics permet une comparaison des génomes sur la base des SNP identifiés sur l'ensemble des génomes par rapport à la référence H37Rv, ce qui assure un pouvoir discriminant très élevé.
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 directe avec les données antérieures accumulées depuis 2006 par l'approche MIRU qui était la méthode internationale de référence (et qui est encore très utilisée dans de nombreux pays).

B/ 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 permet 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) l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques
Nous **mettons aussi en place l'approche WGS pour l'étude de *M. leprae***, directement à partir des biopsies puisque cette espèce n'est pas cultivable, en particulier pour l'étude des cas survenant encore dans les territoires Outre-mer comme en Nouvelle Calédonie et à Mayotte.

8.2. Travaux de recherche appliquée

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

Nous continuerons à développer des algorithmes informatiques pour optimiser l'utilisation de la spectrométrie de masse MALI-TOF pour le diagnostic d'espèces mycobactériennes et de la résistance aux antimycobactériens.

8.2.2. Chimiothérapie expérimentale

Mise au point de modèles murins d'infections à mycobactéries non tuberculeuses (MNT) pour l'évaluation de nouveaux traitements anti-mycobactériens

Tandis que les infections à mycobactéries non tuberculeuses les plus fréquentes sont des pathologies pulmonaires, affectant à la fois les sujets immunocompétents et les sujets immunodéprimés, les modèles murins existants d'infections à MNT reposent sur des modèles d'infection disséminée chez des souris immunodéprimées. Le recours aux souris immunodéprimées est lié au fait qu'il existe une élimination

naturelle des MNT après l'infection compliquant l'évaluation de traitements anti-mycobactériens dans ces modèles.
Aussi, nous proposons, pour les deux principales espèces responsables de mycobactérioses respiratoires, *M. avium* et *M. abscessus*, de développer des modèles d'infection pulmonaire chronique. Pour ce faire, nous développerons un modèle d'infection par billes d'alginate (qui est un composé des biofilms présents chez l'homme) à l'instar de ce qui a déjà été fait pour *P. aeruginosa*.

8.2.3. Surveillance de la sensibilité des souches de *M. tuberculosis* aux nouveaux antituberculeux

Nous allons mettre en place une surveillance de la sensibilité des souches de *M. tuberculosis* MDR reçues au CNR aux nouveaux antituberculeux en mesurant systématiquement leurs CMI (prétomanide, délamanide, bédaquiline, linézolide)

8.2.4. Evaluation de l'impact de nouvelles techniques génomiques sur la rationalisation des actes de biologie et la prise en charge des patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants (TB-MDR)

Nous avons obtenu un financement (CRC) pour évaluer l'impact de nouvelles techniques génomiques sur la rationalisation des actes de biologie et la prise en charge des patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants (TB-MDR). Comme évoqué ci-dessus, les approches génomiques sont des approches d'avenir pour le dépistage rapide de la résistance aux antibiotiques, facteur clé pour garantir la mise en place précoce d'un traitement personnalisé adapté pour les patients atteints de TB-MDR.
Ainsi, nous avons déjà développé un algorithme innovant d'interprétation des données des résultats du séquençage complet des génomes des souches de *M. tuberculosis* (WGS) permettant d'identifier l'ensemble des mutations des gènes impliqués dans la résistance aux antituberculeux (appelé « résistome ») via une collaboration avec la plateforme de séquençage de l'APHP (Sequoia). Nous avons également déjà évalué la faisabilité de l'approche innovante Deeplex-MycTB au laboratoire, qui n'a à ce jour été évaluée que dans une étude publiée. Ces approches innovantes devraient permettre (i) d'améliorer la prise en charge des TB-MDR en rendant possible la mise en place d'un traitement personnalisé adapté plus rapidement qu'avec les techniques actuelles, et (ii) de réduire les coûts des actes de biologie. Notre premier objectif sera d'évaluer la qualité diagnostique de la stratégie innovante utilisant le séquençage complet des génomes bactéries (WGS), par rapport à la stratégie classique en vigueur au CNR-MyRMA, pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux.
Les objectifs secondaires seront de :
- évaluer les qualités diagnostiques (délai, sensibilité, spécificité) de chaque approche (stratégies innovantes, WGS et Deeplex-MycTB, vs. classiques en cours au CNR-MyRMA) par rapport à la méthode de référence pour le diagnostic de la résistance aux antituberculeux,
- évaluer les traitements personnalisés qui seraient proposés d'après les résultats de chaque stratégie,
- évaluer les qualités diagnostiques (sensibilité, spécificité) des résultats du WGS obtenus selon différents pipelines d'interprétation,
- déterminer le nombre d'actes de laboratoire réalisés pour chaque stratégie,
- déterminer les coûts globaux (actes de laboratoire et temps personnel médical et non médical) de chaque stratégie.

8.2.5. Etudes génomiques de *Mycobacterium leprae* pour améliorer l'étude des transmissions dans les territoires Outre-mer

Nous allons poursuivre notre étude génomique des souches de *M. leprae* isolées dans les territoires d'Outre-mer où il y a encore des cas autochtones : la nouvelle Calédonie, Mayotte et la Guyane. Jusqu'à présent nous ne pouvions étudier que les souches contenues dans des prélèvements cutanées très positifs (> 10 baar/champ), ce qui a limité notre étude à certaines souches et cas de lèpre. Dans l'avenir nous allons pouvoir appliquer sur les biopsies une étude génomique par amplicons ce qui va augmenter le nombre de cas analysables. Cette étude NGS par amplicon se fera par collaboration avec la société Genoscreen et l'Institut de médecine tropicale d'Anvers, dans le cadre d'un projet EDCTP au cours duquel un kit DEEPLEX MycLEP est en cours de construction et de validation.

8.2.6. Analyse phénotypique et génomique ciblée sur la résistance aux antibiotiques de *M. abscessus*

Nous recevons de plus en plus de demandes d'expertise sur la résistance et la sensibilité des souches de *M. abscessus*. Ayant déjà étudié particulièrement la résistance aux macrolides (clarithromycine et azithromycine) nous allons dans les prochaines années explorer les mécanismes de résistance à l'ensemble des antibiotiques, y compris les nouveaux antibiotiques qui peuvent avoir une activité anti-bactérienne (cyclines, bédaquiline, oxazolidinones, beta-lactamines, clofazimine) et leur association. Pour cela, nous allons d'une part déterminer les CMI de nombreuses molécules selon le protocole de référence de EUCAST (en cours de validation) et d'autre part étudier les gènes connus pour influencer la sensibilité ou la résistance à ces molécules. Une approche génomique de résistome sera favorisée afin de pouvoir appréhender l'ensemble des données de la souche infectante : identification, clusterisation, mécanismes de résistance.

8.2.7. Optimisation des délais de rendu des résultats obtenus par la technique de Whole Genome Sequencing (WGS) à partir de prélèvements cliniques

Le WGS est une technique puissante qui permet d'obtenir un typage moléculaire à ultra-haute résolution de *M. tuberculosis,* avec une analyse possible de **tous les gènes de résistance aux antituberculeux**, et une **analyse épidémiologique moléculaire ultra-résolutive** puisque l'ensemble du génome est utilisé comme marqueur moléculaire. Techniquement, l'inconvénient de cette approche est la nécessité d'obtenir au préalable une culture de la souche pour réaliser l'extraction d'ADN nécessaire pour la réalisation du WGS, ce qui augmente significativement les délais d'obtention des résultats.
Afin de raccourcir les délais d'obtention du WGS à partir du prélèvement, nous allons essayer d'optimiser l'extraction d'ADN, soit directement à partir du prélèvement, soit à partir de cultures précoces en milieu liquide (MGIT).
- A partir du prélèvement : les prélèvements ciblés seront des prélèvements respiratoires riches en bacilles à l'examen microscopique (baar++/+++). Ces prélèvements seront extraits à l'aide du protocole Molzym qui a la particularité de dégrader l'ADN de l'hôte grâce à une étape de traitement par une DNAse. Cette méthode permet de s'affranchir des contaminations par l'ADN humain et de concentrer l'ADN bactérien afin obtenir un meilleur rendement d'extraction.
- A partir de cultures précoces en milieu liquide MGIT : nous allons tester l'extracteur d'ADN GeneLEAD qui présente d'excellents rendements d'extraction. Le protocole GeneLEAD est utilisé depuis 2 ans au sein de notre laboratoire pour l'extraction d'ADN de mycobactéries. Cette technique a démontré sa capacité à réaliser une extraction de bonne qualité et en quantité satisfaisante pour l'analyse WGS. Au cours de nos séquençages WGS de routine à partir de souches, nous nous sommes rendu compte que les ADN extraits sur GeneLEADVIII pouvaient être dilués à des concentrations bien plus faibles que celles demandées par les plateformes de séquençage, sans altérer la qualité des résultats du WGS (nombre de reads > 1000000, profondeur > 50x, Q30 > 80%). Des milieux liquides MGIT seront ensemencés par des prélèvements pour être prélevés et extraits à différents temps à l'aide de l'extracteur GeneLEADVIII. Les ADN obtenus lors de ces "cinétiques" seront séquencés en WGS et les résultats analysés afin de déterminer le temps minimum permettant l'obtention de génomes de bonne qualité.

8.3. Appui thérapeutique

L'appui thérapeutique reposera sur :
- des **conseils téléphoniques** ou par courriels **directs** pour les cas les plus simples

- **les Réunions de Concertation Pluridisciplinaire (RCP). Celles-ci se sont considérablement développées avec :**

- **2 réunions mensuelles de « TB-MNT *consilium* France »,** organisées par le CNR-MyRMA à la Pitié-Salpêtrière (TB) et discutant prioritairement des cas de tuberculose multi-résistantes et des cas pour lesquels le traitement ne peut pas être le traitement standard OMS
- **1 réunion mensuelle de RCP MNT à Bichat (ex Lariboisière)** faisant intervenir des pneumologues, infectiologues et membres du CNR pour des avis diagnostiques et thérapeutiques

des infections pulmonaires et extra-pulmonaires (MNT) dont les activités sont centrées sur les cas difficiles soumis par des collègues cliniciens.

- **1 réunion mensuelle de RCP Lèpre à Bichat (ex Lariboisière) f**aisant intervenir des dermatologues, infectiologues, chirurgiens, ayant eu ou ayant une activité de léprologue et en contact avec les avec les collègues des territoires Outre-mer, car de nombreux cas sont originaires de ces territoires et sont diagnostiqués lors de leur venue en métropole.

8.4. Registre des cas de tuberculose MDR

Les prochaines étapes pour l'année 2021 ont été fixées :

- Mise en place progressive et en routine du registre dans les centres pilotes ;
- Inclusion prospective dans le registre de tous les patients qui sont discutés en RCP, avec saisie des recommandations de la RCP directement dans le registre ;
- Point d'étape avec les informaticiens prestataires pour discussion des prochaines mises à point.

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 : un import automatisé des données n'étant pas possible pour les informaticiens prestataires, la saisie sera effectuée progressivement au cours de l'année 2021.

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) des cas groupés hospitaliers d'infections liées aux soins comme les infections post-opératoires ou bactériémies sur cathéter...
- 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 sont de plus en plus souvent l'étude génomique pour lesquels nous sommes en train d'acquérir des compétences de production et d'analyse.

Mycobactéries lépreuses
A la demande de plusieurs territoires Outre-mer (Nouvelle Calédonie, Mayotte, Guyane), nous allons réaliser des études comparatives génomiques comprenant d'une part des souches sensibles de nouveaux cas pour étudier la transmission et des souches ayant des caractères de résistance pour expliquer les échecs de traitement.

8.6. Contribution aux réseaux de surveillance européens

8.6.1. 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 la surveillance des cas MDR seront intégrées à celle de eDO, ce qui permettra de les envoyer, après validation, aux systèmes européens de surveillance.
- Les **données de génotypage WGS des souches MDR seront adressées à l'ECDC (réseau ERLN-TB des CNR européens**) si le programme ECDC ERLN-TB se poursuit.
- Pour garantir la qualité des données transmises, le CNR-MyRMA **participera régulièrement aux contrôles de qualité européens** génotypiques et phénotypique organisés par l'ECDC.

8.6.2. Lèpre

Nos **résultats de surveillance de la résistance aux anti-lèpreux seront rapportés au réseau de surveillance OMS** (nouvelle stratégie OMS 2016-2020). De plus **nous sommes laboratoire supranational pour les pays francophones ciblés par l'OMS car encore endémiques pour la lèpre comme Madagascar, le Benin, le Tchad, le Mali, le Burkina Faso**. Nous étudions environ 50 à 100 cas dans ce cadre chaque année.

Nous faisons aussi le suivi des cas des territoires Outre-mer et nous pourrions confronter, avec l'aide de Santé Publique France et les ARS territoriales, 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.

Nous faisons depuis 2017 la déclaration annuelle des cas de lèpre de la France métropolitaine auprès de l'OMS par intermédiaire avec le Ministère de la Santé. Ainsi la France apparait désormais dans les tableaux publiés par l'OMS chaque année. Grâce à la RCP, nous pouvons faire apparaitre depuis 2020 des cas de lèpre paucibacillaire négatifs en microbiologie mais pour lesquels il y a un déficit neurologique conséquent (handicap de grade 2), puisque les données ne sont plus seulement celles qui sont produites uniquement à partir du laboratoire.

8.6.3. Mycobactérioses

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

Annexe 1 : Missions et 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, Hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris, au sein du GHU APHP.Sorbonne Université, responsable Pr Jérôme Robert.

Un laboratoire associé : depuis le 2 juin 2020, le laboratoire associé a été transféré dans le service de

mycobactériologie spécialisée et de référence sur le site Bichat du GHU Nord –APHP, Le responsable est resté le 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 Bichat : aspects diagnostiques, thérapeutiques, mécanismes de résistance aux antibiotiques et génotypage pour les mycobactéries non tuberculeuses 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 2020 d'équipes médicales et techniques comme suit (cf tableau ci-dessous pour détail) :

Laboratoire coordonnateur (Hôpital Pitié-Salpêtrière)

- 3 PU-PH, 1 MCU-PH du service de Bactériologie-Hygiène de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et Sorbonne Université (**0,97 ETP**, financement APHP)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1 ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **1 médecin praticien attaché (0,2 ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **1 AHU (0,25 ETP, financement APHP)**
- **2 techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (1,83 ETP)**
- 3 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 Sorbonne Université)
- 1 animalier (financement fonds associatifs)

Laboratoire associé (Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière puis GHU Nord site Bichat)

- 1 PU-PH, 1 PHC devenu PH au 01/09/20 et 1 AHU jusqu'au 31/10/2020 remplacé par un Assistant spécialiste (AS) à partir du 01/11/2020 pour le service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière puis pour le service de mycobactériologie spécialisée et de référence et Université Paris 7 (**0.95 ETP**, financement AP-HP)
- **1 médecin biologiste jusqu'au 30/04/2020 (0,33 ETP), 1 ingénieur jusqu'au 31/03/2020 (0,25 ETP)**
- 2 techniciens (0,5 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 2020 (en ETP), qualification, statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Robert	Jérôme	Directeur	0,2	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuell	Respons. labo. associé	0,2	Médecin biol.	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbio/pneumologue	0,1	Médecin	PU-PH	St Antoine*	AP-HP
Bonnet	**Isabelle**	**Microbiologiste**	**1,0**	**Pharm. biol.**	**PH contr.**	**Pitié**	**SPF**
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,25	Médecin biol.	PU-PH	Pitié	AP-HP
Sougakoff	Wladimir	Microbiologiste	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Jarlier	Vincent	Microbiologiste	0,17	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Morel	**Florence**	Microbiologiste	**0,25**	Médecin biol.	AHU	Pitié	AP-HP
Guglielmetti	**Lorenzo**	**Médecin**	**0,2**	**Médecin**	**Attaché**	**Pitié**	**SPF**
Mougari	Faiza	Microbiologiste	0.2	Médecin Biol.	PHU	Lariboisière	AP-HP
Temin	**Sabrina**	**Microbiologiste**	**0.33**	**Médecin Biol**	**Attaché**	**Lariboisière**	**SPF**
Millot	Gérald	Technicien	0,4	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Boccechiampe	Valérie	Technicienne	0,3	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
Blondel	Natacha	Technicienne	0,3	Technicien	Tech	Pitié	AP-HP
TOURE	**Tassiry**	**Technicienne**	**0,83**	**Technicienne**	**Tech**	**Pitié**	**SPF**
Goumghar	**Sabrina**	**Technicienne**	**1,0**	**Technicienne**	**Tech**	**Pitié**	**SPF-MIGAC**
Henry	**Stéphanie**	**Ingénieur**	**0.25**	**Technicienne**	**Tech**	**Lariboisière**	**SPF-MIGAC**
Vissouarn	Odile	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Tuffier	Cécile	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Lecorche	**Emmanuel**	**Microbiologiste**	**0.33**	**Pharm. Biol.**	**AHU**	**Lariboisière**	AP-HP
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 ~1.800 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 » intégrée à l'UMRS CR7-INSERM 1135 « Centre d'immunologie et des maladies infectieuses (CIMI) », Sorbonne Université,

site Pitié.

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

Locaux du CNR

Laboratoire coordonnateur (Hôpital Pitié-Salpêtrière)
Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2ème étage du bâtiment de la Pharmacie, Hôpital 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 Sorbonne Université, site Pitié, située sur le même campus.

Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière puis GHU Nord site Bichat)
-Jusqu'au 2 juin 2020 : 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 …).
-Depuis le 2 juin 2020 : Laboratoire de mycobactériologie spécialisée et de référence, Hôpital Bichat, GHU Nord, situé au rez de chaussée du bâtiment principal à proximité des locaux de l'IMEA et du CNR du Paludisme, superficie totale de 455 m2
Les activités du CNR se déroulent :
- Dans un laboratoire de sécurité L3 existant depuis 2001 (Inserm) et remis en conformité en novembre 2020 comprenant une surface nette de NSB3 de 51m2 et 78 m² avec les locaux annexes (SASs, préparation...)
- Un local NSB2 de 80 m2 comprenant une salle de microscopie, un labo L2 équipé pour la culture de mycobactéries non tuberculeuses et la biologie moléculaire
- Des locaux de biologie moléculaire partagés avec le CNR du Paludisme
- La plate-forme de séquençage de l'hôpital Bichat et de l'équipe IAME

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 Löwenstein-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,
- Plateforme ELITe InGenius
- Plateforme Genelead, Diagenode et kit Deeplex, Genoscreen
- Plateforme genXpert, Cepheid
- 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 puis site Bichat)

Laboratoire de sécurité L3
- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux,
- 4 postes de sécurité microbiologique,
- 4 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
- 1 extracteurs automatiques d'acide nucléique (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),
- 1 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (RQS3 thermofisher),
- 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 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV,
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent)
- 1 séquenceur Miseq (Illumina) partagé avec le service de Génétique, accès à 1 séquenceur Miniseq partagé avec l'équipe IAME
- 1 licence de logiciel Bionumerics

Autres équipements
- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker), et base V5 CEIVD en cours de remplacement
- Automates d'immuno-analyse LIAISON XL et Dynex, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold Plus in Tube (Qiagen),
- 1 autoclave double entrée pour la destruction et la stérilisation.

Collections de souches

Voir l'annexe 2, « capacités techniques du CNR-MyRMA »

Démarche qualité

Accréditation

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche générale d'accréditation (norme NF EN ISO 15189) des laboratoires des GH APHP.Sorbonne Université et APHP.Paris Nord. En effet, l'ensemble des laboratoires d'un GH auquels ils appartiennent (« DMU biologie médicale »), sont considérés par le COFRAC comme un laboratoire unique.

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** : accrédité pour toutes les portées de la microbiologie.

ACCRÉDITATION N° 8-3253
https://tools.cofrac.fr/annexes/sect8/8-3253.pdf

Par ailleurs, le laboratoire est **habilité « MOT », par l'ANSM** pour la détention et la mise en œuvre 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).

ACCRÉDITATION N° 8-3305
https://tools.cofrac.fr/annexes/sect8/8-3305.pdf

Suite au déménagement sur un autre site hospitalier, le laboratoire va remettre ses procédures à jour dans le nouveau Laboratoire de biologie médicale Bichat-Beaujon-Louis Mourier.

Techniques standardisées

Les deux laboratoires du CNR-MyRMA ont participé dans le passé, dans le cadre du groupe de mycobactériologistes des CHU (« AZAY mycobactéries »), à la rédaction des techniques communes disponibles sur le site « azaymycobacteries.free.fr » et sur www.microbes-edu.fr, et accessibles via le site du CNR-MyRMA.

Les deux laboratoires du CNR-MyRMA et celui de l'hôpital Saint-Antoine (même département de Bactériologie que la Pitié, au sein de APHP.Sorbonne Université) collaborent actuellement à la rédaction ou mise à jour de procédures concernant les nouvelles techniques de mycobactériologie.

Contrôles de qualité externe

a. Chacun des 2 laboratoires du CNR-MyRMA a participé en 2020 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
- 5 souches de MNT pour des tests de sensibilité phénotypiques et génotypiques soit 60 tests

Au total, ce CQE représentait 206 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 continué à participer en 2020 aux enquêtes européennes pour les tests IGRA –tuberculose organisées 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).
- **10ème CQE** en **2020** : **score 98% pour WGS**

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Techniques de référence disponibles au CNR-MyRMA

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 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, tigécycline, triméthoprime-sulfaméthoxazole, 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.

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 MDR/MTB ELITe MGB kit (sur ELITe InGenius) R-DiaMTBCComplex kit (sur GeneLEADVIII) 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	DEEPLEX (identifie une centaine d'espèces)	*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

b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

Mycobactéries	Techniques commercialisées	Séquençage	Antibiotiques
***M. tuberculosis* complex**	CepheidXpert RIF Gén. MTB-DR*plus** Génotype MTB-DRsl*VER 2.0 MDR/MTB ELITe MGB kit (sur ELITe InGenius) DEEPLEX		Rifampicine Rifampicine, isoniazide, éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, fluoroquinolones Rifampicine, isoniazide, éthionamide rifampicine, isoniazide, éthionamide, ethambutol, pyrazinamide, fluoroquinolones, amikacine, kanamycine, capreomycine, streptomycine, linezolide, bedaquiline, clofazimine
***M. tuberculosis* complex**		*rpoB* *katG* *inhA* *pncA* *ethA* *ethR* *rrs, eis, tlyA* *rpsL* *embB, embC-A* *rrl, rplC* *atpE, Rv0678*	rifampicine isoniazide isoniazide, éthionamide pyrazinamide éthionamide éthionamide amikacine, kanamycine, capréomycine, streptomycine streptomycine éthambutol linezolide bédaquiline
***M. abscessus* complex**		*erm(41), rrln* *rrs*	Macrolides Amikacine
Mycobactéries atypiques ***M. leprae***	Génotype NTM-DR* Leprae-DR*	*rrl* *rpoB, gyrA* *folP1*	macrolides rifampicine, fluoroquinolones, dapsone
Toutes espèces		*rpoB* *gyrA* *gyrB* *rrs*	rifampicine fluoroquinolones luoroquinolones 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 Spoligotypage DEEPLEX	

d. Séquençage génome entier (WGS)

Mycobactéries	Techniques
Toutes espèces	ILLUMINA MiSeq (cf WGS)

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 hypervariables 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*
- ✓ Deeplex
- ✓ Séquençage génome entier (WGS)

Collections de souches du CNR-MyRMA

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, 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.

Les sérums pour test IGRA-TB sont conservés à -20°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.

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.