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

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

Responsable : Pr Vincent JARLIER

Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie- Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal

Responsable : Pr Emmanuelle CAMBAU

Rapport d'activité pour l'année 2011

avril 2012

Table des matières

FICHE D'IDENTITE DU LABORATOIRE COORDONATEUR ET DU LABORATOIRE ASSOCIE DU CNR-MYRMA 3

1. MISSIONS ET CAPACITES DU CNR 4

2. ACTIVITES D'EXPERTISE 12

2.1. CAPACITES TECHNIQUES DU CNR 12
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE ASSUREES PAR LE CNR POUR LES LABORATOIRES FRANÇAIS EN 2011 19

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE 37

3.1. ACTIVITES DE SURVEILLANCE DES CARACTERISTIQUES DE LA TUBERCULOSE ET DE LA RESISTANCE AUX ANTI-TUBERCULEUX 37
3.2. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS, DE LA TUBERCULOSE 49
3.3. ETUDE GENOTYPIQUE DES SOUCHES DE M.TUBERCULOSIS : DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES 49

4. ALERTES 56

4.1. ALERTES ET ENQUETES MENEES AVEC LES AUTORITES SANITAIRES 56
4.2. ALERTES ET ENQUETES 2011 SUR DES CAS DE TUBERCULOSE 56
4.3. ALERTES ET ENQUETES 2011 SUR DES CAS D'INFECTION A MYCOBACTERIE ATYPIQUE, BILAN 2006-2011 . 56

5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 58

5.1. INFORMATION 58
5.2. FORMATION 58
5.3. ACTIVITES DE CONSEIL 59

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN AVEC L'ACTIVITE DU CNR-MYRMA 62

6.1. CHIMIOTHERAPIE EXPERIMENTALE DES INFECTIONS A MYCOBACTERIES 62
6.2. MECANISMES DE RESISTANCE CHEZ LES MYCOBACTERIES 63
6.4. ETUDE PHYLOGENIQUE DES SOUCHES RESISTANTES NON MDR 69

7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2011 70

7.1. PUBLICATIONS NATIONALES 70
7.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES 70
7.3. COMMUNICATIONS NATIONALES 72
7.4. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES 73
7.5. CONFERENCES SUR INVITATIONS NATIONALES 73
7.6. CONFÉRENCES SUR INVITATIONS INTERNATIONALES 74

8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012 - 2013 75

8.1. DEVELOPPER ET EVALUER LES NOUVELLES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE ET DE L'INFECTION TUBERCULEUSE AINSI QUE LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A MYCOBACTERIES ATYPIQUES ET A MYCOBACTERIES DITES RARES 75
8.2. ACTIVITES DE SURVEILLANCE 79
8.3. ACTIVITES D'INFORMATION, FORMATION, CONSEILS 80
8.4. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN AVEC L'ACTIVITE DU CNR 80

ANNEXE 83

Fiche d'identité du laboratoire coordonateur et du laboratoire associé du CNR-MyRMA

1. Laboratoire coordinateur

- Laboratoire de Bactériologie - Hygiène

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière-Charles Foix (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris)
47-83 Boulevard de l'hôpital
75634 PARIS cedex 13
Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70 secrétariat, +33 (0) 1 42 16 20 83 bureau CNR-MyRMA
Fax : +33 (0) 1 42 16 20 72
Email : cnr.myctb@psl.aphp.fr
Site Internet : http://cnrmyctb.free.fr

- Responsable scientifique : Pr Vincent JARLIER

Téléphone : +33 (0) 1 42 16 20 70, +33 (0) 6 80 08 59 68
Email : vincent.jarlier@psl.aphp.fr

- Responsable administratif : Mr Jacques LEGLISE, Directeur du groupe hospitalier, assisté de Mr Michel BUCHERT, gestion financière

2. Laboratoire associé

- Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Groupe Hospitalier Saint Louis - Lariboisière - Fernand Widal (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), site Lariboisière
2, rue Ambroise Paré
75018 Paris cedex 18
Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 51 secrétariat, +33 (0) 1 49 95 65 54 bureau CNR-MyRMA
Fax : +33 (0) 1 49 95 85 37

- Responsable scientifique: Pr Emmanuelle CAMBAU

Téléphone : +33 (0) 1 49 95 65 54, +33 (0) 6 80 42 25 08
Email : emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr

- Responsable administratif : Mr Christian NICOLAS, Directeur adjoint du Groupe Hospitalier, assisté de Mme Marie Noëlle PHILIPPON, gestion financière

1. Missions et capacités du CNR

Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR-MyRMA en termes de santé publique, son organisation, la répartition des missions avec le laboratoire associé et les principaux partenaires

Objectifs majeurs

En raison des difficultés techniques inhérentes aux mycobactéries, de la dispersion des diagnostics des cas de tuberculose et de mycobactériose dans de nombreux laboratoires et de la diminution progressive du nombre de cas de tuberculose, entrainant une diminution du niveau général d'expertise tant clinique que biologique, il est particulièrement important :
- de **maintenir un centre d'expertise** pour (a) le diagnostic, (b) l'identification des souches difficiles, (c) les tests de sensibilité aux antibiotiques, en particulier aux antibiotiques de seconde ligne, (d) l'identification des gènes de résistance, (e) le génotypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques),
- d'évaluer les **nouvelles techniques** et développer **des contrôles de qualité,**
- de participer à la surveillance épidémiologique, en particulier pour les formes rares de la tuberculose et la résistance aux antibiotiques antimycobactériens,
- de participer au dispositif **d'alerte,**
- d'assurer des **activités d'information et de formation.**

Repartition des missions et des taches entre le laboratoire coordinateur et le laboratoire associé

L'association des 2 laboratoires augmente notablement les possibilités logistiques (continuité du service…). Elle permet **une suppléance pour les analyses d'expertise courante** (mise en culture de prélèvements, identification de souches de mycobactérie, détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux), qui peuvent être menées dans chacun des 2 laboratoires **et permet de mettre en commun des approches techniques complémentaires.**

Le laboratoire coordinateur, (laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière à Paris, responsable Pr Vincent Jarlier) a la maîtrise des techniques mycobactériologiques classiques et génotypiques, une longue expérience des antituberculeux (tests de sensibilité, mécanismes de résistance, chimiothérapie expérimentale [modèles animaux], conseil thérapeutique), et assure l'animation et la gestion des deux réseaux de laboratoires (réseau AZAY-mycobactéries et réseau CNR-MyRMA, cf plus loin).

Le laboratoire associé (laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Groupe hospitalier Saint Louis-Lariboisière, site Lariboisière à Paris, responsable Pr Emmanuelle Cambau) bénéficie d'une équipe de mycobactériologistes confirmés ayant des compétences complémentaires de celle de l'équipe du laboratoire coordinateur concernant (a) les mycobactéries atypiques, en particulier pour ce qui est de leurs aspects iatrogènes, de la maîtrise des techniques de recherche dans l'environnement, du génotypage et de l'évaluation de l'activité in vitro de nouveaux antibiotiques ou associations d'antibiotiques, (b) la lèpre et (c) les tests immunologiques.

Tâches et missions spécifiques des 2 laboratoires

(a) tuberculose et mycobactérioses respiratoires communautaires, aspects diagnostics et thérapeutiques : laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière,

(b) mycobactérioses iatrogènes et liées aux soins, mycobactérioses cutanées (infections à *M.marinum*, ulcère de Buruli), lèpre, étude de l'activité des antibiotiques sur les mycobactéries atypiques et mécanismes de résistance des mycobactéries atypiques : laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière.

Cette répartition permet d'optimiser l'expertise et l'efficacité des appuis aux microbiologistes et aux cliniciens et d'améliorer l'efficacité des interventions auprès des partenaires sanitaires lors d'alertes, avec un partenariat, d'une part, avec les CLAT et le département « tuberculose » de l'Institut de Veille Sanitaire, et d'autre part, avec les CCLIN et le département « infections nosocomiales » de l'Institut de Veille Sanitaire.

Le laboratoire coordonateur dispose d'un vaste laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 qui lui permet de prendre en charge l'expertise concernant les cas de tuberculose en particulier pour les analyses nécessitant des subcultures de souches MDR et XDR. Le laboratoire associé est bien équipé pour les analyses de biologie moléculaire, la spectrométrie de masse et l'étude approfondie des mycobactéries atypiques. La mise au point et l'évaluation des nouvelles méthodes de laboratoires (cf. plus loin) suivront aussi cette dichotomie.

Le fait que les 2 laboratoires soient situés à Paris et appartiennent à la même institution (Assistance publique-Hôpitaux de Paris) facilite beaucoup la communication et les transports entre eux.

Principaux partenaires

La surveillance de certaines infections à mycobactéries et de leur résistance aux antibiotiques est réalisée par le CNR-MyRMA à travers deux réseaux de partenaires, le réseau Azay-Mycobactéries et le réseau CNR-MyRMA.

Le réseau Azay-Mycobactéries

La surveillance de la résistance primaire et secondaire aux antibiotiques des bacilles tuberculeux est basée sur la collaboration volontaire de laboratoires hospitalo-universitaires de Bactériologie, particulièrement impliqués en mycobactériologie et organisés en réseau (Groupe " Azay Mycobactéries ", animé jusqu'en 2010 par Jeanne Texier-Maugein – Bordeaux et depuis 2011 par Christian Martin - Limoges). Pour ses activités de surveillance de la résistance, le réseau est conjointement animé par le CNR-MyRMA.
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 (isoniazide, rifampicine, streptomycine, éthambutol). Chaque laboratoire a comme responsabilité de recueillir pour chaque cas de tuberculose bactériologiquement confirmé (culture positive) les données suivantes, conformément aux recommandations l'OMS : âge, pays de naissance, co-infection par le VIH, localisation clinique de la tuberculose et antécédent de traitement antituberculeux.
Les données sont recueillies d'une manière continue depuis 1995 et transmises anonymement au CNR-MyRMA où elles sont validées puis analysées.

Le nombre de CHU participant au réseau Azay-Mycobactéries a doublé depuis 1995 : 15 en 1995, 23 en 2001, 27 en 2002, 33 en 2004 et 32 en 2006 et 35 en 2008. Le réseau couvre maintenant toutes les régions métropolitaines françaises sauf la Corse qui n'a pas de CHU. Le nombre total de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les laboratoires du réseau est de **l'ordre de 1500** par an, soit **près d'un tiers du total des cas** de tuberculose à culture positive identifiés en France.
La qualité du réseau AZAY-Mycobactéries a fait l'objet de travaux approfondis qui ont montré que la sensibilité du réseau est convenable (>95%), que la concordance des données avec celles de la DO et celles des dossiers médicaux des cas est aussi convenable et, que les discordances observées ont un impact très faible sur les taux de résistance stratifiés par facteur de risque (antécédents de traitement, pays de naissance). Après corrections tenant compte de ces discordances, les taux corrigés sont très proches des taux observés par le réseau. Les résultats de ces travaux méthodologiques ont été publiés (Guérin-Tran, Eur J Epidemiol 2006 ; Khuê, Epidemiol Infect 2008).

Le réseau CNR-MyRMA

Depuis 1992, le CNR-MyRMA conduit, avec l'aide d'environ 300 laboratoires correspondants (Réseau CNR-MyRMA), la surveillance annuelle du nombre de malades ayant une tuberculose bactériologiquement confirmée (culture positive) et, parmi ces malades, du nombre de ceux qui sont porteurs d'une souche de bacille tuberculeux résistant à l'isoniazide et à la rifampicine (cas de tuberculose à bacilles multirésistants ou MDR).
Ce réseau est aussi mis à contribution pour surveiller certaines formes particulières de tuberculose (méningites, *M. bovis*...).

Le rôle joué par le CNR-MyRMA dans la vie des deux réseaux ci-dessus est essentiel en matière d'organisation et de service rendu aux microbiologistes en échange de leur participation : conseil, aide à l'identification, aide aux tests de sensibilité…

Autres collaborations

- Equipe de mycobactériologie animale de Laura Boschiroli à l'Agence Française de Sécurité Animale (AFSA)
- Equipe d'immunologie clinique et fondamentale du Pr Brigitte Autran (Pitié-Salpêtrière) avec laquelle notre laboratoire est déjà fortement associé dans le cadre du groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière : Institut Fédératif de Recherche « Infection et Immunité » (IFR 113) et Centre d'Investigations Biomédicales.

Equipes

Laboratoire coordonnateur Pitié-Salpêtrière

- 1 PU-PH chef de service, 1 PU-PH, 3 MCU-PH, 1 AHU et 1 PH du service de Bactériologie-Hygiène du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et Université Paris 6 (temps partiel)
- **1 médecin contractuel (PHC, 1ETP) financé par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA**
- **2 Techniciens financés par les crédits spécifiques du CNR-MyRMA (2 ETP)**
- 2 Techniciens (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)
- 1 Technicien de recherche en chimiothérapie expérimentale (financement fonds associatifs)
- 1 Technicien de recherche en biologie moléculaire (financement Université Paris 6)
- 1 Animalier (financement fonds associatifs)

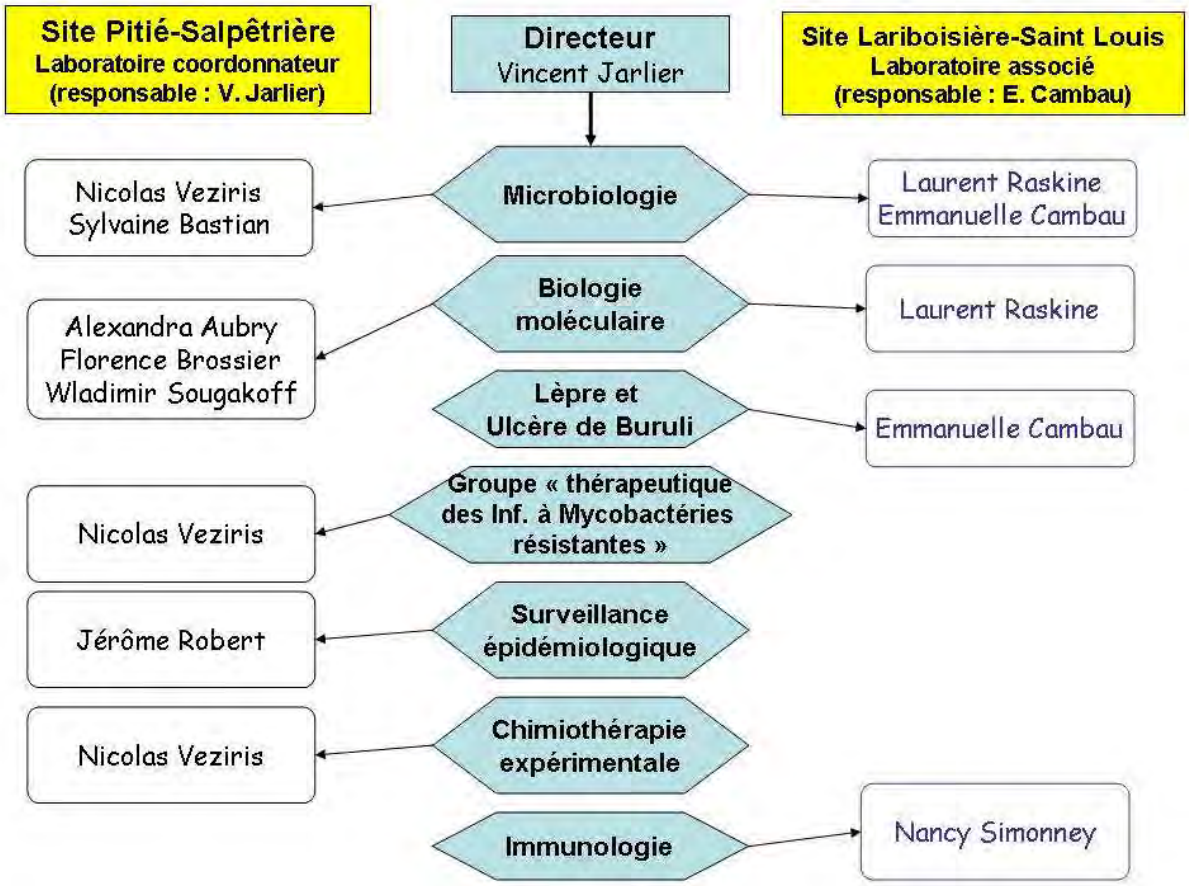
Laboratoire associé Saint Louis-Lariboisière

- 1 PU-PH chef de service, 1 PH et 1 Praticien attaché du service de Bactériologie du Groupe Hospitalier Saint Louis – Lariboiisière (AP-HP) et Université Paris 7 (temps partiel)
- 2 Techniciens (temps partiels, financement AP-HP)
- 1 Secrétaire (temps partiel, financement AP-HP)

Des étudiants en Master 2 et en Thèse encadrés par nos équipes d'accueil (EA 1541 et EA3964) et l'équipe INSERM (EMI 004 ERS5) participent aux travaux de recherche menés en collaboration avec le CNR (au total 4 à 6 étudiants présents simultanément).

La liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordinateur et du laboratoire associés précisant fonction, ETP, qualification, statut et organisme payeur est placée en annexe

Organigramme du CNR-MyRMA en 2011



Locaux

Laboratoire coordinateur

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, 2e étage du bâtiment de la Pharmacie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, superficie totale du laboratoire 1000 m^2.
Les activités se déroulent :
- dans le laboratoire de sécurité P3 (150 m^2) consacré à la mycobactériologie (et aux alertes Biotox).
- dans les pièces adjacentes 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, située sur le même campus.

Laboratoire associé

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal, site Lariboisière, situé au 2éme étage du bâtiment CIVIALE, superficie totale du laboratoire de 964 m2.

Les activités du CNR se déroulent :
- dans un laboratoire de sécurité consacré à la mycobactériologie (26 m2). Ce local va être abandonné au profit d'un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 qui sera implantée en mai 2012 sous la forme d'une construction modulaire à l'extérieur du bâtiment Civiale.
- dans des pièces (39 m2) consacrées aux manipulations des bactéries inactivées (microscopie), de leur contenu génétique (biologie moléculaire : identification, détection de mutation...) après inactivation : laboratoire de biologie moléculaire et laboratoire de microscopie fluorescente.

Principaux équipements

Laboratoire coordonnateur (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière)

Laboratoire de sécurité L3
- équipements pour le traitement des prélèvements médicaux, cultures en milieux solides et liquides,
- équipements pour antibiogrammes en milieu solide et liquide,
- équipements pour l'identification phénotypique classique,
- équipement pour l'extraction d'acides nucléiques (cf. ci-dessous),
- 5 postes de sécurité microbiologiques,
- 6 incubateurs,
- automate de culture en milieu liquide.
- caméra de lecture de plaque sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®
- microscopes à fluorescence lampe vapeur de mercure et lampe LED, microscopes classiques,
- sorbonne pour la coloration de Ziehl-Neelsen
- coagulateur pour la préparation des milieux de Lowenstein-Jensen

Biologie moléculaire
- extracteur d'acide nucléique de sécurité (pression négative) Roche MagNA Pure,
- extracteur d'acide nucléique automatisé QIAcube (QUIAGEN)
- 2 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR (Biorad iCycler, Biorad DNAEngine),
- 2 amplificateurs automatisés pour PCR « en temps réel » (MJResearch PTC-200, ABI7000),
- matériel d'hybridation manuel TwinCubator pour les bandelettes Hain,
- automate d'hybridation GT-Blot 48 pour les bandelettes Hain,
- séquenceurs ADN : un monocapillaire ABI 310 (dans le laboratoire) ; un 16 capillaires ABI (sur plateforme de site dédiée aux analyses de biologie moléculaire),
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé Biorad CEF-DR2,
- logiciel Gel Compar pour l'analyse des profils de génotypage,
- 1 imageur Biorad Chemidoc-XRS pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV et des membranes d'hybridation en chimioluminocence,
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques Pharmacia Gene Quant II,
- matériel d'hybridation/lecture Accuprobe (BioMérieux)

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
- séquenceur d'ADN Applied Biosystem 16 capillaires,
- plateforme de séquençage haut-débit (ILLUMINA HiSeq 2000),
- plateforme de génotypage de SNP à haut débit « ILLUMINA » (puces BeadChips),
- scanner pour lecture des lames microarrays hybridées avec sondes Cy3/Cy5,
- 3 spectromètres microplaques 384,
- spectromètre de masse Maldi-tof,
- spectromètre de masse NanoLC-ESI-MS/MS
- robot de fractionnement Freedom EVO150 (Tecan).

Animalerie (capacité totale : 2000 à 2500 souris) :
- 4 isolateurs rigides et 8 armoires pour maintenance des animaux infectés en pression négative,
- 4 isolateurs souples pour maintenance des animaux immunodéficients.

- 2 postes de sécurité microbiologique pour les dissections et cultures,
- 4 étuves,
- autoclave pour destruction des déchets.
- accès à l'animalerie A3 de la faculté de médecine Pierre-et-Marie Curie

Laboratoire associé (Groupe hospitalier St Louis-Lariboisière)

Laboratoire de sécurité L3 (mobile) (30m2)

- Equipement pour le traitement des échantillons médicaux
- 3 postes de sécurité microbiologique
- 3 incubateurs (30 et 37℃) pour milieux solides e t liquides
- 3 automates de culture en milieu liquide (MGIT960TB®, Becton-Dickinson) et 1 module Hémoculture Mycobactérie (BacTAlert®, Mérieux)
- Équipement complet de mycobactériologie médicale classique (réactifs de décontamination, centrifugeuses, coloration auramine et Ziehl, microscopes à fluorescence…)
- Matériel et équipement pour identification rapide phénotypique
- Equipement et automate pour antibiogramme en milieu liquide MGIT
- 1 module de suivi et d'analyse de la sensibilité des isolats aux antituberculeux de 1ere et seconde ligne (TB eXiST BD)
- 1 Système de lecture de microplaques Sensititre et logiciel de lecture et d'interprétation VIZION®

Biologie Moléculaire

- 2 extracteurs automatiques d'acide nucléique (EZ1 QIAGEN et Arrow NORDIAG)
- 1 spectrophotomètre pour la quantification des acides nucléiques (Heliosγ Thermos)
- 1 spectrophotomètre UV-Visible NanoDrop 1000
- 5 amplificateurs d'ADN classiques pour PCR
- 1 amplificateur automatisé pour PCR « en temps réel » (Cepheid 4 modules)
- 2 amplificateurs pour PCR « en temps réel » (Rotor Gene et Smart Cycler)
- 1 automate d'hybridation GT-Blot 20 pour les bandelettes Hain Biocentric,
- 1 système d'hybridation manuelle TwinCubator
- 2 séquenceurs 16 capillaires Applied Biosystem d'accès facile (commun à plusieurs laboratoires)
- matériel d'électrophorèse, de transfert sur membrane et d'hybridation des membranes pour génotypage par la méthode RFLP,
- 1 équipement d'électrophorèse pour génotypage par champ pulsé (Pharmacia LKB Gene Navigator)
- 1 imageur (GelDoc XR Biorad) pour l'analyse des gels d'électrophorèse sous UV
- 1 automate pour électrophorèse capillaire d'ADN (Agilent) commun à plusieurs laboratoires pour test de génotypage Diversilab®

Autres équipements

- 1 Spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Microflex, Bruker)
- Automate d'immuno-analyse ETIMAX2000, pour le dosage d'interféron gamma par le test Quantiféron® Gold in Tube (Cellestis)
- 1 autoclave de destruction

Démarche qualité

Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)

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

Ce groupe s'est aussi engagé dans la rédaction de **recommandations de Juste Prescription Biologique** des examens de mycobactériologie, sous la responsabilité conjointe de C. Martin et E. Cambau.

Accréditation

Le CNR-MyRMA s'est inscrit dans la démarche d'accréditation des laboratoires (norme NF EN ISO 15189) par l'intermédiaire des groupes hospitaliers auxquels le laboratoire coordonateur et la laboratoire associé appartiennent, respectivement le Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (AP-HP) et le Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière-Fernand Widal (AP-HP). Le CNR-MyRMA participe au travers de ses membres à plusieurs groupes de travail mis en place pour l'accréditation de l'ensemble des laboratoires: (1) gestion non conformité, (2) contractualisation prescripteurs/ laboratoires (3) infrastructures et locaux. Ces groupes de travail incluent des membres du CNR-MyRMA et, plus largement, ceux des laboratoires hébergeant le CNR.

Participation du CNR-MyRMA aux contrôles de qualité externe supranationaux

Le CNR-MyRMA a participé à plusieurs contrôles de qualité externe en 2011 :
- 2 séries de contrôles de différentes étapes du diagnostic de la tuberculose (examen microscopique, culture, tests de sensibilité, amplificaiton génique et détection moléculaire de la résistance) organisés dans le cadre du réseau européen de l'ECDC ERLNET-TB
- 1 série de contrôles de tests de sensibilité de *M. tuberculosis* aux antibiotiques organisée par l'OMS-Europe
- 1 série de contrôle de détection moléculaire de la résistance chez *M. leprae* organisée dans le cadre du réseau de l'OMS sur la surveillance de la résistance aux antilépreux.

Le CNR-MyRMA participe aussi chaque année aux contrôles de qualité européens de génotypage MIRU-VNTR en tant que membre du Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis organisé par D. van Soolingen (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas).
Pour chaque contrôle, trente extraits d'ADN de *M.tuberculosis* envoyés par le RIVM sont analysés en MIRU-VNTR 24. Les résultats du premier contrôle qualité réalisé en 2009-2010 ont été analysés et publiés en 2012 (*First Worldwide Proficiency Study on Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains. de Beer JL, Kremer K, Ködmön C, Supply P, van Soolingen D; the Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669*). Les résultats obtenus par le CNR-MyRMA sont très bons.
Les résultats du deuxième contrôle qualité réalisé en 2010-2011, analysés récemment par le RIVM, montrent que le taux de reproductibilité obtenu par le CNR-MyRMA est très bon.

Traçabilité

La traçabilité concerne principalement les échanges entre les laboratoires demandeurs et les 2 laboratoires du CNR-MyRMA mais peut aussi concerner les échanges entre le laboratoire coordonateur et le laboratoire associé. Il faudra à l'avenir rédiger des procédures spécifiques à cet effet.

Traçabilité des demandes et des résultats
Les feuilles de demande d'expertise et leurs éventuelles pièces jointes (compte rendu d'un dossier patient, feuille des résultats obtenus dans le laboratoire demandeur) qui jusqu'à maintenant sont achivées telles quelles, seront, à l'avenir, saisies et archivées via un scanner spécifique (ScanBac® Ordo) dans le SGL du laboratoire coordonateur. Une copie des demandes transmises au laboratoire associé sera conservée par le laboratoire coordonateur.
La traçabilité des rendus de résultats est établie pour les paramètres suivants : identité des correspondants (biologiste, clinicien, autorité sanitaire), mode de rendu (téléphone, fax, email, courrier), date et heure, résultats intermédiaires rendus en urgence.
Les données sont conservées pendant au moins 5 ans pour les résultats intermédiaires (listes de travail, cahiers de paillasse) et pendant au moins 20 ans pour les résultats définitifs. A l'avenir, une sauvegarde informatique automatisée sera assurée par les services informatiques centraux de l'AP-HP. De plus, des résultats seront exportés au format texte « csv » dans des tables de type Excel conservées dans le système informatique du laboratoire. Les données générées dans l'actuel système

de gestion du labotratoire (Molis®, Sysmex) seront archivées, exportées dans un autre système informatique du laboratoire lorsque le nouveau système (GLIMS®, MIPS) sera installé (cf section G ci-après). Les données générées à partir de 2012 seront accessibles en ligne.

Traçabilité des matériels reçus et conservés

Les tubes de conservation des souches, prélèvements ou autres (extrait ADN par exemple) sont numérotées (numérotation spécifique) et classées.

Traçabilité des réunions de travail

Les réunions du « Groupe thérapeutique » et les réunions mensuelles des membres du CNR-MyRMA sont tracées par une feuille de présence et un compte rendu écrit. Si le projet de visio-conférences du « Groupe thérapeutique » aboutit, celles-ci seront enregistrées (cf projet).

2. Activités d'expertise

2.1. Capacités techniques du CNR

Techniques disponibles

Techniques phénotypiques

Techniques de diagnostic
- Microscopie
- Cultures en milieux solides et liquides
- Amplification génique

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

Techniques phénotypiques d'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux
Techniques de routine
- Antibiogrammes par la méthode de référence (méthode des proportions) en milieu de L-Jensen industriels pour *M.tuberculosis*. Les milieux pour tester la sensibilité aux antibiotiques de 2ème ligne (kanamycine, amikacine, capréomycine, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine, PAS, linézolide et thiacétazone) n'étant plus commercialisés, ils sont préparés et contrôlés par le CNR-MyRMA
- Antibiogrammes par la méthode de référence (méthode des proportions) sur milieu liquide (MGIT960 TB)
- Antibiogrammes par la méthode des proportions pour *M.kansasii*, sur milieux de L.Jensen industriels (isoniazide, éthambutol) ou fabriqués et contrôlés au laboratoire (rifampicine) car les milieux industriels contiennent non pas de la rifampicine vraie mais de la rifamycine SV, dérivé auquel *M.kansasii* est naturellement résistant.
- Détermination des CMI en milieu de L. Jensen (clarithromycine, fluoroquinolones, éthambutol, rifabutine, amikacine) pour les mycobactéries à croissance lente. Ces milieux, non disponibles dans le commerce, sont préparés et contrôlés au laboratoire.
- Détermination des CMI en milieu liquide sur microplaque (Trek®) pour les mycobactéries à croissance lente et rapide (imipénème, cefoxitine, amikacine, streptomycine, tobramycine, clarithromycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, linézolide, minocycline, docycycline, tigecycline, trimethoprime-sulfamethoxazole, rifampicine, rifabutine, isoniazide, éthionamide, éthambutol)
- Détermination des CMI en milieux liquides ou solides pour les mycobactéries à croissance lente : aminosides, rifamycine, fluoroquinolones ou autres selon les besoins.
- Détermination des CMI par bandelettes E-test pour les 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 pour l'évaluation de l'activité de nouveaux antibiotiques
- Méthodes in vitro : CMI, étude de la bactériostase (MGIT avec module d'analyse TB eXiST BD), bactéricidie, inhibition des fonctions enzymatiques de l'ADN gyrase (IC_{50})pour les fluoroquinolones
- Méthodes in vivo : modèles de chimiothérapie expérimentale chez la souris pour *M.tuberculosis, M.leprae, M.ulcerans, M.avium, M.chelonae*.

Techniques génotypiques

Les techniques génotypiques utilisées sont listées dans le **Tableau 1**, séparément pour l'identification, les tests de sensibilité aux antimycobactériens (mutations impliquées dans la résistance acquise) et le génoypage (phylogénie et empreintes digitales génomiques).

Tableau 1 : Techniques génotypiques utilisées au CNR-MyRMA

a. Identification bactérienne

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe *tuberculosis*	Accuprobe® Xpert® MTB/RIF GenoType®MTBDR*plus* GenoType®MTBDRsl Real Accurate Mycobacterium tuberculosis (Patho Finder)®	
Espèces au sein du complexe *tuberculosis*	Genotype MTBC® MIRU-VNTR 12-24 loci	
Mycobactéries atypiques "courantes"	Accuprobe Genotype® CM	
Mycobactéries atypiques "rares"	Genotype® AS	
Toutes les mycobactéries		*rpoB, gyrA, gyrB* ARN 16S et 23S *hsp65*
Complexe *abscessus*		*erm41*
M. ulcerans		IS2404
M. leprae	GenoType®LepraeDR	RLEP

b. Détection de mutations déterminant la résistance acquise aux antimycobactériens

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène	Antibiotiques
Complexe *tuberculosis*	CepheidXpert RIF		rifampicine
	MTBDR*plus*®[a]		rifampicine,isoniazide, éthionamide
	MTBDRsl®[b]		amikacine,kanamycine, capréomycine,éthambutol, fluoroquinolones
		katG	isoniazide
		inhA	Isoniazide, éthionamide
		pncA	pyrazinamide
		ethA	éthionamide
		ethR	éthionamide
		rrs	amikacine,kanamycine, capréomycine
		rpsL	streptomycine
		embB	éthambutol
Toutes **mycobactéries**		*rpoB*	rifampicine
		gyrA	fluoroquinolones
		gyrB	fluoroquinolones
M.abscessus		*Erm41 et rrl*	macrolides
Mycob. aypiques		*rrl*	macrolides
M. leprae	GenoType®LepraeDR		rifampicine,fluoroquinolones, dapsone

c. Génotypage

Mycobactéries concernées	Techniques commercialisées	Techniques "maison"/gène
Complexe *tuberculosis*	MIRU-VNTR 12-24 loci	RFLP IS6110
Mycobac atypiques	Diversilab®	Electrophorèse en champ pulsé REP-PCR

Mise au point et évaluation de nouvelles techniques

Evolution de la technique SNaPshot minisequencing-based assay : mise au point d'un test basé sur une PCR unique « 16-plex » et une analyse des amplicons par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Le CNR a participé au développement et à l'évaluation de la technique SNaPshot basée sur un mini-séquençage des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et une analyse par électrophorèse capillaire permettant simultanément l'identification et la différentiation des mycobactéries appartenant au complexe *M.tuberculosis*, ainsi que la classification des souches de *M.tuberculosis* selon 7 groupes phylogénétiques. La méthode repose sur l'analyse de deux groupes de 8 fragments du génome portant des sites de polymorphisme ponctuel encore appelés SNP : 8 SNPs localisés au niveau des gènes *hsp65*, *gyrB* et *rrs* pour la différentiation des espèces au sein du complexe M. tuberculosis, et 8 autres SNP permettant le génotypage des souches de *M.tuberculosis* selon 7 groupes phylogénétiques appelés SCG (SNP Cluster Group).
Les résultats de cette évaluation avaient été publiés en 2010 en collaboration avec l'équipe inventrice : Bouakaze C, Keyser C, de Martino SJ, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Ludes B.. J Clin Microbiol May;48(5):1758-66).

En 2010-2011, le CNR a participé à une étude visant à faire évoluer la technique SNaPshot vers un nouveau format appelé « iPLEX Gold » (Sequenom) permettant l'amplification en Single Base Extension (SBE) simultanée des deux groupes de PCR 8-plex dans un tube unique (PCR 16-plex) et la différentiation des fragments spécifiques de chaque type d'allèle par spectrométrie de masse.
Dans la réaction de mini-séquençage SBE, des amorces de discrimination allélique spécifiquement marquées par des nucléotides terminateurs caractérisés par des masses spécifiques de chaque allèle sont utilisés. Les produits obtenus après mini-séquençage SBE sont analysés par spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOF MS) permettant de mettre en évidence les différences de masse correspondant à chaque allèle. Un exemple de spectre de masse MALDI-TOF obtenu par la technique iPLEX Gold 16-plex MassARRAY » (Sequenom) à partir d'une souche H37rv de *M.tuberculosis* est montré sur la **figure 1**.

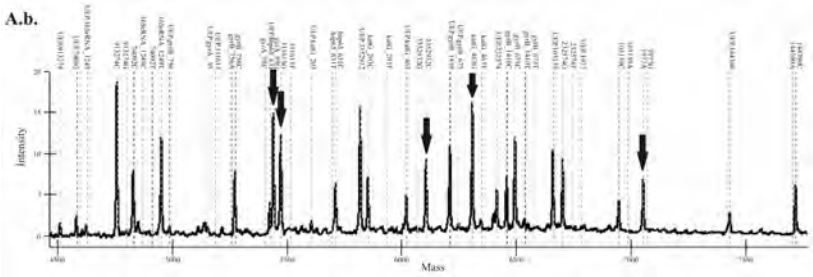


Figure 1 : Exemple de spectre de masse MALDI-TOF obtenu par la technique iPLEX Gold 16-plex MassARRAY » (Sequenom) à partir d'une souche H37rv de *M.tuberculosis*.

La nouvelle technique «iPLEX Gold 16-plex MassARRAY» a été évaluée en comparant les résultats à ceux du test Snapshot publiés en 2010 (cf ci-dessus), sur la même collection de 55 souches appartenant au complexe *M.tuberculosis*. La réaction de mini-séquençage SBE a été réalisée à l'aide de la trousse « iPLEX Gold SNP genotyping" (Sequenom) et les produits obtenus par SBE ont été analysés sur une plateforme MassARRAY® (Sequenom). L'ensemble des SNP analysés par « iPLEX Gold SNP genotyping" ont été identifiés sans ambiguïté pour les 55 souches de MTBC incluses dans l'étude, ainsi que les groupes phylogénétiques SCG auxquels ces souches se rattachent (**Tableau 2**).

Tableau 2 : SNP analysées par « Iplex Gold SNP genotyping » dans 55 souches de *M.tuberculosis* et groupes phylogénétiques SCG auxquels ces souches se rattachent

MTBC sample (n=55)	PGG	SCG	hsp65[631]	katG[463]	gyrA[95]	katG[203]	16S rRNA[1249]	gyrB(675)	gyrB(756)	gyrB(1410)	1977	3352929	74092	105139	2460626	144390	232574	311613	913274
clinical *M. canettii* (n=1)	1b	1	T	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	-	C	G	G	T	G
clinical *M. tuberculosis* (n=2) and *M. africanum* (n=1)	1b	1	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. tuberculosis* (n=3)	1b	2	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	A	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=2)	1b	3a	C	A	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=9)	2	3b	C	C	C	G	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=13)	2	5	C	C	C	G	T	C	G	C	G	C	C	C	C	G	G	T	C
clinical *M. tuberculosis* (n=5)	3	6a	C	C	G	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	C	G	T	C
M. tuberculosis H37Rv (n=1)	3	6b	C	C	G	G	T	C	G	C	A	C	C	C	C	G	G	G	C
clinical and reference *M. bovis* (n=7) and *M. bovis* BCG (n=5)	1a	7	C	A	C	A	T	C	A	T	G	G	T	C	C	G	G	T	G
clinical *M. caprae* (n=1)	1a	7	C	A	C	A	T	C	A	C	G	G	T	C	C	G	G	T	G
clinical *M. microti* (n=1)	1a	1	C	A	C	A	T	T	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. pinnipedii* (n=1)	1a	1	C	A	C	A	C	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G
clinical *M. africanum* (n=3)	1a	1	C	A	C	A	T	C	G	C	G	G	C	C	C	G	G	T	G

En conclusion, la nouvelle méthode «iPLEX Gold 16-plex MassARRAY» montre une excellente reproductibilité et produit des résultats parfaitement concordants lorsqu'elle est comparée à la méthode SNaPshot classique. Grâce à l'utilisation de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF, elle permet d'obtenir dans un délai très court et pour un coût raisonnable (moins de 4 €) des données d'identification et de typage qui peuvent être aisément interprétées et exploitées par des algorithmes dédiés.

Les résultats de ce nouveau travail collaboratif ont été publiés en 2011 (Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Jaulhac B, Ludes B. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3292-9).

Evaluation de la méthode rep-PCR (Diversilab®), comparée avec les méthodes RFLP-IS*6110*, spoligotypage et MIRU-VNTR 24-loci pour le typage de *Mycobacterium tuberculosis*

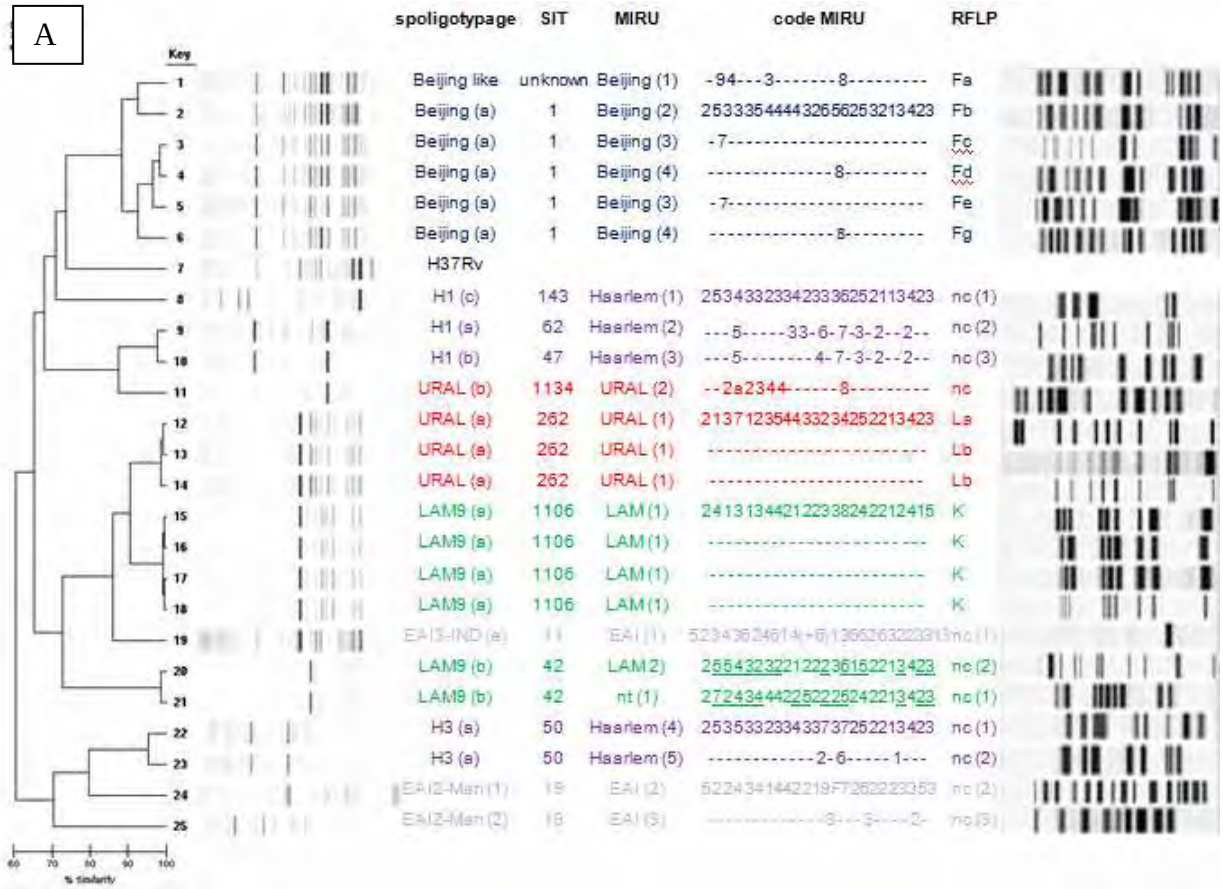
Différentes méthodes basées sur la PCR, comme le spoligotypage et le MIRU-VNTR, permettent de comparer entre eux des isolats de *M. tuberculosis* lors des enquêtes épidémiologiques. Les méthodes de REP-PCR (obtention de profils de bandes spécifiques obtenus par PCR à partir de séquences répétées non codantes) ont également été utilisées pour le typage des souches de différentes espèces mycobactériennes mais sont connues pour leur mauvaise reproductibilité. Le système DiversiLab® propose une approche semi-automatisée permettant l'analyse par REP-PCR des principales espèces bactériennes, y compris *M. tuberculosis*, avec un haut niveau de standardisation. L'objectif de cette étude était de comparer la REP-PCR Diversilab® avec les principales méthodes utilisées en typage moléculaire : d'une part la RFLP-IS*6110*, « gold standard » pour le génotypage de *M. tuberculosis*, et d'autre part le spoligotypage et le MIRU-VNTR 24-loci qui supplantent progressivement la RFLP.

Cinquante-deux souches de *M. tuberculosis* collectées au CNR entre 2006 et 2009, ainsi que la souche de référence H37Rv, ont été typées par REP-PCR, spoligotypage, MIRU-VNTR 24-loci et RFLP-IS*6110*.

L'analyse par spoligotypage montre que les 52 souches de *M. tuberculosis* se répartissent en 12 grands groupes correspondant aux clades S (n=6), T1 (n=7), Ural (n=4), LAM9 (n=6), CAM (n=3),

Beijing (n=6), T2 (n=6), T2-T3 (n=6), EAI3-IND (n=1), EAI2-MAN (n=2), H1 (n=3), et H3 (n=2). L'analyse en REP-PCR Diversilab montre pour certains clades (Beijing, T1, T2-T3) un profil d'amplification spécifique qui peut être facilement repérable, et pour d'autres clades (S, H1, LAM9, URAL, T2, CAM et H3) des profils différents selon les souches. Si l'on prend l'exemple des souches analysées du clade S, 4 souches présentent un profil de REP-PCR Diversilab très conservé. Trois de ces 4 souches de clade S sont même indistinguables en REP-PCR Diversilab (la quatrième souche montre, elle, une différence significative au niveau d'une bande), alors qu'elles ont des petites différences dans les codes MIRU et les profils RFLP. Une 5e souche de clade S a un profil Diversilab différent comme c'est aussi le cas pour les autres méthodes de génotypage (RFLP, MIRU et spoligotype).

Globalement, la REP-PCR Diversilab donne des résultats de typage moins discriminant que la RFLP et le MIRU-VNTR mais identifie bien les principales familles phylogénétiques et pourrait servir de test de screening rapide pour le génotypage des souches de *M. tuberculosis*.



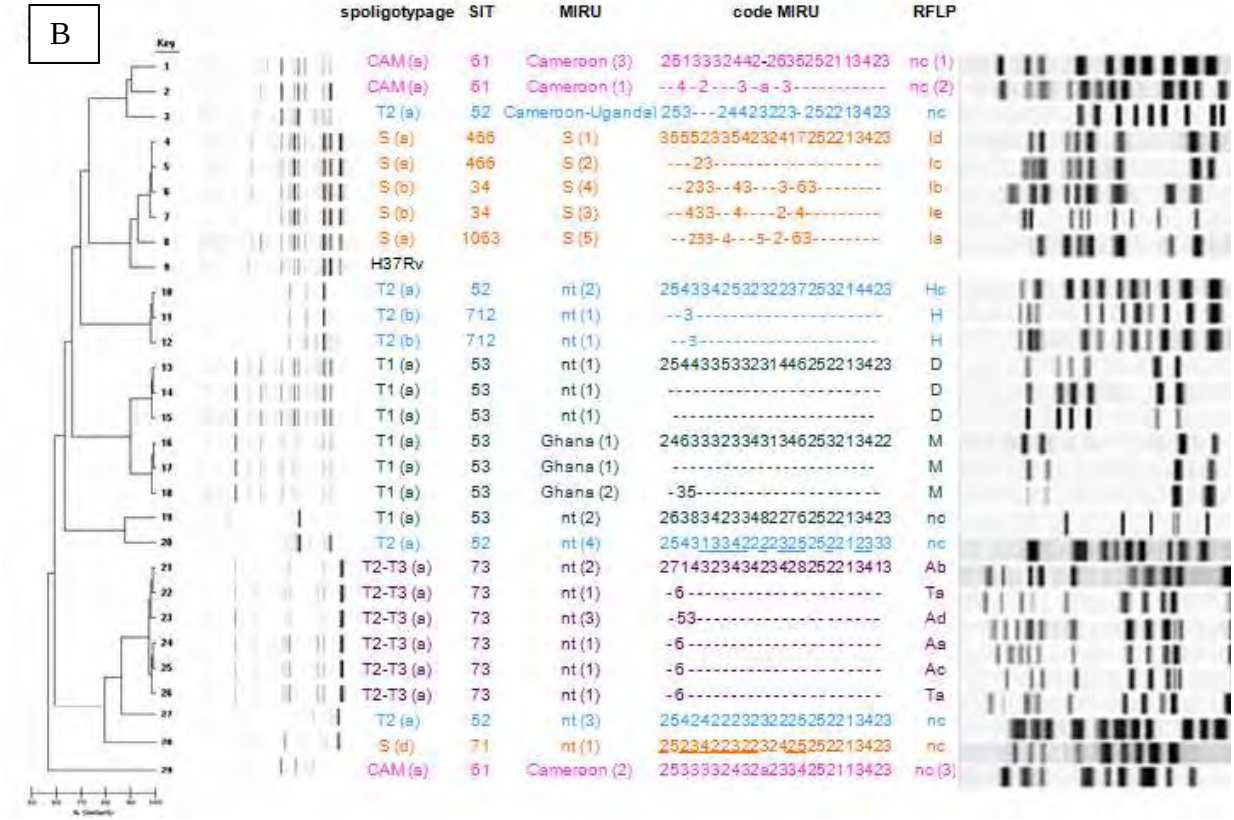


Figure 2. A et B. Dendrogramme de la rep-PCR Diversilab de *Mycobacterium tuberculosis*

Collections de souches de référence

Description des souches

Nous mettons à disposition des laboratoires, des souches de *M.tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première ligne. Dans un 1er temps, pour répondre aux besoins dans ce domaine et dans l'objectif d'aider à rationaliser les tests de sensibilité aux antituberculeux, mais aussi avec le souci d'éviter les échanges de souches multirésistantes qui sont hautement dangereuses, nous avons préparé des souches monorésistantes (à l'isoniazide, haut et bas niveau de résistance, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol). Pour cela, des mutants résistants ont été sélectionnés in vitro lorsque des souches d'origine clinique n'étaient pas disponibles.

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

Tableau 2. Souches monorésistantes aux antituberculeux de première ligne disponibles au CNR pour contrôle de qualité avec leurs noms et caractéristiques génétiques et phénotypiques

Souche de *M.tuberculosis*	Génotype	Phénotype de résistance en milieu de Löwenstein Jensen
Isoniazide bas niveau	*inhA* -15CT	100% résistance isoniazide 0,2 mg/l, sensible
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

Par ailleurs le laboratoire conserve des souches de référence achetées à la Collection de l'Institut Pasteur ou à l'American Type Culture Collection qu'il utilise pour des études de recherche appliquée ou fondamentale.

Enfin le laboratoire conserve l'ensemble des souches adressées pour expertise pour une durée de 10 ans.

Condition de stockage

Le stockage de l'ensemble de ces souches est faite par le biais d'un 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℃.
Les lépromes reçus au CNR-MyRMA pour recherche de *M.leprae* sont conservés à -80℃.
Parallèlement à la conservation des souches, le CNR s'est équipé en 2010 d'un congélateur -40℃ spécifiquement dédié à 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 seront disponibles que pour les laboratoires de mycobactériologie du territoire français réalisant des tests de sensibilité de deuxième ligne.

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

- Microscopie à fluorescence et optique après coloration de Ziehl-Neelsen
- Cultures en milieu solides et liquides
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* par amplification génique (ex. hybridation sur bandelettes genre Genotype ®…) directement à partir des prélèvements lorsque l'examen microscopique est positif
- Identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis* dans les cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (ex. Genotype ®…) ou techniques immunochromatographiques (exkit SD BioLINE TB Ag MPT64, Eurobio).
- Identification des mycobactéries atypiques courantes (*M.gordonae*, *M.avium-intracellulare* complex, *M.kansasii*) dans les cultures par hybridation directe avec sonde Accuprobe® ou amplification-hybridation sur bandelettes (Genotype ®…)
- 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 le diagnostic de la résistance à la rifampicine en cas de suspicion de multirésistance (antécédents de traitement, séropositivité VIH, malade originaire d'un pays à forte prévalence de résistance…)

Contrôles de qualité externe organisé par le CNR-MyRMA

Nous organisons depuis 2003, tous les 2 ans environ, un contrôle de qualité externe (CQE) des tests de sensibilité aux antituberculeux dans le cadre de l'enquête sur la résistance primaire et secondaire effectuée chaque année par les laboratoires du réseau Azay-mycobactéries (cf plus loin « Surveillance de la résistance primaire et secondaire »).

Le dernier contrôle (2009) a concerné 31 laboratoires de CHU du réseau «Azay» ainsi que deux laboratoires privés qui ont la plus forte activité de mycobactériologie (laboratoires CERBA et BIOMNIS). Le prochain CQE sera organisé fin 2012.

2.2. Activités d'expertise assurées par le CNR pour les laboratoires français en 2011

Nombre de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA

Au cours de l'année 2011 le CNR-MyRMA a reçu **1006 souches et 169 prélèvements (total 1175)** pour identification et/ou typage moléculaire et/ou étude de la sensibilité aux antibiotiques (**Tableau 3**). Les souches et prélèvements proviennent de tous les types de laboratoire de France métropolitaines et DOM-TOM (laboratoires hospitaliers, LABM...).

Tendances évolutives 2006-2011
Après une augmentation brutale de 50% entre 2005 (dernière année de la coexistence de 2 CNR des mycobactéries, l'un à l'Institut Pasteur de Paris et l'autre à la Pitié-Salpêtrière) et 2006, le nombre de souches et prélèvements reçus au CNR- MyRMA s'est stabilisé autour de 1000 par an.

Identification des souches reçues

Parmi les **1006 souches** reçues :
- 18 souches reçues en double, contaminées ou identifiées comme des espèces non mycobactériennes n'ont pas été étudiées
- **988 souches ont été soumises à identification** de l'espèce mycobactérienne et, pour la plupart ont été aussi soumises à antibiogramme phénotypique et/ou à des tests génotypiques de détection de résistance et/ou à un génotypage pour enquête épidémiologique. Ces 988 souches se répartissent en **385 souches du complexe *M. tuberculosis* (39%)** et **603 souches de mycobactéries atypiques (61%).**

Tableau 3 : Activité du CNR- MyRMA de 2006 à 2011 : nombre de souches et prélèvements reçus, détail des études mises en œuvre

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Total souches et prélèvements[a]	**959**	**1072**	**1100**	**1030**	**990**	**1206**
Total souches identifiées[b]	**784**	**911**	**967**	**901**	**825**	**988**
M. tuberculosis	328	370	452	369	366	385
Mycob. atypiques	400	455	492	504	428	603
dont total tests de sensibilité	**457**	**432**	**442**	**470**	**468**	**551**
M. tuberculosis[c]	207 (94)	170 (73)	185 (90)	170 (135)	160 (126)	170 (139)
Mycob. atypiques	250	262	227	300	308	381
Dont total génotypage	**220**	**215**	**183**	**192**	**153**	**119**
M. tuberculosis	280	203	172	175	153	119
Mycob. atypiques	-	12	11	17	-	-
Total prélèvements (hors M.leprae)	**165**	**151**	**115**	**112**	**140**	**169**
Biopsies *M.leprae*[d]	**10 (5)**	**10 (2)**	**18 (7)**	**17 (7)**	**25 (7)**	**51 (22)**

a : en 2005, dernière année de coexistence de 2 CNR des mycobactéries (Pitié-Salpêtrière et Institut Pasteur de Paris), le nombre total de souches et prélèvements reçus au CNR-MyRMA était de **635**
b : une petite partie des souches reçues sont déjà connues ou sont contaminées ou ne sont en fait pas des mycobactéries et n'apparaissent ni dans « *M.tuberculosis* » ni dans « Mycob. atypiques »
c : nombre de souches pour lesquelles il y a eu 2 antibiogrammes : un de 1re ligne et un de 2e ligne
d : dont (N) biopsies correspondant à des cas de lèpre bactériologiquement confirmé

Souches de M. tuberculosis complex

Parmi les 385 *souches de M.tuberculosis complex,* 242 (63%) ont été identifiées jusqu'au niveau de l'espèce, soit lorsque leurs caractères phénotypiques s'écartaient de ceux typiques de l'espèce *M.tuberculosis* (ex. souches lisses, dysgoniques…), soit en tirant profit du génotypage qui, pratiqué par la méthode des MIRU, permet aussi de préciser l'espèce (cf. plus loin). Parmi ces 243 souches, **212** étaient de l'espèce ***M. tuberculosis***, qui reste l'espèce principale responsable de tuberculose humaine, **9 étaient de** l'espèce ***M. bovis var BCG*** (nombre stable depuis 2007, après un pic en 2006 probablement lié au changement de souche et de technique vaccinale), **12 souches étaient** de l'espèce ***M.bovis*** (même ordre de grandeur que les années précédentes suggérant qu'il n'y a pas d'émergence de tuberculose à bacille bovin) et **7 souches étaient** de l'espèce ***M.africanum*** (stable par rapport à 2009) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Identification des souches de mycobactéries du complexe *M.tuberculosis* reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011

Espèces	2006	2007	2008	2009	2010	2011
M. tuberculosis complex	**94**	**229**	**363**	**308**	**209**	**143**
Identification au sein du complexe tuberculosis* :	**234**	**141**	**89**	**61**	**157**	**242**
M. tuberculosis	189	114	63	42	140	212
M. bovis	7	9	11	7	6	12
M. africanum	11	10	11	5	6	7
M. bovis var BCG	27	8	4	3	5	9
M. caprae				2		
M. canettii						1
M. microti				2		1
Total	**328**	**370**	**452**	**369**	**366**	**385**

* L'identification est menée par des méthodes génotypiques au sein du complexe *M.tuberculosis* lorsque le laboratoire envoyeur le demande, ou lorsque les aspects culturaux (milieu solide) évoquent une espèce autre que *M. tuberculosis* (ex. *M. bovis, M. bovis* BCG, *M. africanum...)*

Souches de mycobactéries atypiques

Parmi les 603 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2011, la répartition était la suivante (**Tableau 5**) :

- **219 souches (36% du total) du complexe *M.avium-intracellulare*** dont 116 *M.avium* et 103 *M.intracellulare*. La proportion des souches considérées comme responsables d'infections (n=172 soit 79%) est élevée, ce qui est en cohérence avec la volonté du CNR-MyRMA de concentrer ses efforts sur les souches importantes sur le plan médical.
- **54 souches de *M.xenopi*** (9% du total). Toutes étaient d'origine respiratoire. Parmi ces souches, 31 (57%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **26 souches de *M.kansasii*** (4% du total), agent classique d'infections pulmonaires mimant la tuberculose. Parmi ces souches, 22 (85%) ont été considérées comme responsables d'infections.
- **11 souches de *M.simiae***. 9/11 (81%) ont été considérées comme responsables d'infection.
- **3 souches de *M.marinum***, agent classique d'infections cutanées après inoculation à partir d'aquariums ou d'animaux aquatiques. Il n'y a pas eu en 2011 de cas groupés faisant craindre une exposition commune.
- **23 souches de *M.gordonae*** qui correspondaient toutes à des contaminations.
- **210 souches d'espèces à croissance rapide** (35% du total) réparties dans les espèces *M.chelonae, M.abscessus*, *M.bolletii, M.massiliense, M.fortuitum, M.peregrinum, M.mucogenicum, M.porcinum, M.phocaicum, M. conceptionense, M. mageritense, M. llatzerense, M. mucogenicum, M. neoaurum, M. salmoniphilum, M. septicum, M. gadium.* Parmi celles-ci *M. llatzerense* et *M. salmoniphilum* ont été isolées de prélèvements d'environnement. Au total, 107 des 192 souches isolées chez des patients (56%) ont été considérées comme responsables d'infections, le plus souvent d'infections respiratoires dans le cadre de la mucoviscidose (*M.abscessus* complex) et d'infections cutanées (*M.chelonae, M.*

mageritense, M. bolletii) mais aussi des infections disséminées chez des immunodéprimés *(M. fortuitum, M. peregrinum, M. mageritense, M. conceptionense),* arthrite *(M. massiliense)*, abcès mammaires (*M. fortuitum, M. massiliense)*, une infection de prothèse oculaire à *M. abscessus*.
Il faut noter également deux cas d'infections osseuses sur matériel à *M. mageritense* (cf. chapitre Alerte).

Il faut noter que 108 des 601 souches (18% environ) de mycobactéries atypiques reçues en 2011 appartenaient à des espèces rares ou nouvellement décrites :
- 9 souches appartenaient au complexe *terrae* (dont 5 fois *M.arupense* espèce proche de *M. terrae* et décrite en 2006), dont 5 cas correspondaient à des infections ostéo-articulairs ou des tissus mous.
- 4 souches de *M.gadium* (mycobactérie à croissance rapide décrite en 1974) isolées de liquides ou de biopsies chez 4 patients d'un même hôpital et considérées comme des contaminations de laboratoire.
- 2 souches de *M.genavense* isolées chez un même patient et responsable d'infection généralisée dans le cadre d'une infection par le VIH.
- 4 souches de *M.heckeshornense* (mycobactérie proche de *M. xenopi,* décrite en 2000) dont l'une a été considérée comme responsable d'une infection (spondylodiscite)
- 6 souches de *M.lentiflavum* (mycobactérie proche de *M.simiae* et *M.genavense,* décrite en 1996), dont 3 ont a été considérées responsables d'infection : deux cas d'adénite cervicale chez des enfants de moins de 5 ans et un cas d'infection respiratoire.
- 6 souches de *M.malmoense* considérées comme responsable d'infection dans 4 cas: trois cas d'infection respiratoire et une infection des tissus mous de la main.
- 18 souches de *M.massiliense* (espèce proche de *M.abscessus,* décrite en 2004) dont 16 correspondent à des infections soit respiratoire dans 13 cas, soit articulaire dans 2 cas et un cas d'abcès mammaire.
. 10 souches de *M.bolletii* (espèce proche de *M.abscessus,* décrite en 2006) considérées comme responsables d'infection dans 9 cas : 8 infections respiratoires et une infection cutanée.
- 11 souches de *M.mucogenicum* (espèce proche de *M.chelonae,* décrite en 1995) isolées dans 7 prélèvements d'environnement et chez 4 patients pour lesquels le diagnostic d'infection n'a pas été retenu.
- 2 souches de *M.neoaurum* considérées comme contaminants.
- 1 souche de *M.porcinum* (espèce à croissance rapide proche de *M.fortuitum*) et considérée comme contaminant.
- 2 souches de *M. conceptionense* (espèce à croissance rapide proche de *M.fortuitum* décrite en 2006) isolées d'hémoculture d'une patiente immunodéprimée.
- 1 souche de *M.bohemicum* (espèce à croissance lente proche de *M.fortuitum* décrite en 1998) considérée comme contaminant.
- 1 souche de *M. celatum* (mycobactérie proche du complexe aviaire décrite en 1993) considérée comme contaminant.
- 12 souches de *M. llatzerense* (espèce à croissance rapide décrite en 2008) issues de prélèvements d'environnement.
- 3 souches de *M. mageritense* (espèce à croissance rapide décrite en 1997) considérées comme reponsables d'infection, avec 2 cas d'infection ostéo-articulaire sur matériel et 1 cas d'infection des tissus mous suite à un traumatisme communautaire.
- 1 souche de *M. moriokaense* (espèce à croissance rapide) considérée comme un contaminant.
- 2 souches de *M. nebraskense* (espèce à croissance lente décrite en 2004) considérées comme des contaminants.
- 1 souche de *M. phocaicum* (espèce à croissance rapide décrite en 2006) considérée comme un contaminant.
- 6 souches de *M. salmoniphilum* (espèce à croissance rapide décrite en 2007) isolées de prélèvements de l'environnement.
- 1 souche de *M. triplex* (espèce à croissance lente décrite en 1996) considérée comme un contaminant.
- 1 souche de *M. vulneris* (espèce proche de *M. avium* décrite en 2009) considérée comme un contaminant.

Au total, 381 (62%) des 601 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2011 ont été considérées comme responsables d'infections.

Tendances évolutives 2006-2011

Le nombre de souches de mycobactéries atypiques reçues et considérées comme responsables d'infection (et donc soumises à des tests de sensibilité aux antibiotiques, cf plus loin) a augmenté de 52% entre 2006 (n=250) et 2011 (n=381). La distribution entre les principales espèces de mycobactéries atypiques (*M.avium-intracellulare, M.xenopi, M.kansasii,* espèces à croissance rapide) est restée stable entre 2006 et 2011 (**Tableau 5**).

Fait important dans le cadre du suivi des infections à mycobactéries depuis l'arrêt de l'obligation vaccinale par le BCG en 2007, 25 souches de mycobactéries atypiques reçues en 2011 (14 *M.avium*, 3 *M. intracellulare*, 2 *M. malmoense*, 2 *M. fortuitum*, 2 *M. lentiflavum*, 1 *M.kansasii*, 1 *M. florentinum*), **ont été isolées d'adénites chez 19 enfants de moins de 5 ans**. Le nombre de ces cas, qui avait déjà été multiplié par un facteur 4 environ de 2006 à 2010, a quasiment doublé entre 2010 et 2011 (**Tableau 6**). Bien que le nombre de ces cas reste faible et que le prélèvement des adénites cervicales est loin d'être systématique, **cette tendance doit conduire à la vigilance**.

Tableau 5 : Identification des souches de mycobactéries atypiques reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 (classement par ordre dégressif, basé sur l'année 2009)

Espèce	2006	2007	2008	2009	2010	2011
M. avium	98 (25%)	85 (19%)	71 (14%)	105 (21%)	96 (22%)	116 (19%)
M. intracellulare	66 (17%)	57 (13%)	77 (16%)	100 (20%)	82 (19%)	103 (17%)
M. xenopi	47 (12%)	69 (15%)	66 (13%)	48 (10%)	52 (12%)	54 (9%)
M. gordonae	20 (5%)	35 (8%)	21 (4%)	33 (7%)	20 (5%)	23 (4%)
M. chelonae	11 (3%)	37 (8%)	41 (8%)	31 (6%)	31 (7%)	44 (7%)
M. kansasii	27 (7%)	28 (6%)	21 (4%)	31 (6%)	24 (6%)	26 (4%)
M. abscessus	41 (10%)	37 (8%)	44 (9%)	24 (5%)	35 (8%)	54 (9%)
M. simiae	12 (3%)	6 (1%)	9 (2%)	19 (4%)	7 (2%)	11 (2%)
M. fortuitum	22 (5%)	15 (3%)	18 (4%)	18 (4%)	11 (3%)	25 (4%)
M. peregrinum	10 (3%)	20 (4%)	32 (7%)	16 (3%)	6 (1%)	12 (2%)
M. massiliense		6 (1%)	13 (3%)	15 (3%)	9 (2%)	18 (3%)
M. interjectum		4	1	6 (1%)	0	2
M. mucogenicum	4 (1%)	2	6 (1%)	6 (1%)	8 (2%)	11 (2%)
M. scrofulaceum	1	3	5 (1%)	5 (1%)	4 (1%)	2
M. szulgaï	3	3	3	3	3	8 (1%)
M. marinum	8 (2%)	6 (1%)	10 (2%)	2	2	3
M. arupense	1	4	6 (1%)	2	2	5 (1%)
M. bolletii	1	3	5 (1%)	2	10 (2%)	10 (2%)
M. genavense			1	2	3	2
M. haemophilum	1			1	0	0
M. malmoense	3	3	8 (2%)	1	2	6 (1%)
M. ulcerans			1		1	0
Autres espèces	24 (6%)	32 (8%)	34 (7%)	34 (7%)	20 (5%)	56 (9%)
Total	**400**	**455**	**492**	**504**	**428**	**601**
Responsables d'infections (**N** et %)**	**250** 62%	**262** 58%	**227** 46%	**300** 59%	**308** 72%	**381** 62%

**** sur la base de critères historiques, cliniques et bactériologiques (ex. recommandations de l'American Thoracic Society…).**

Tableau 6 : Evolution de 2006 à 2011 du nombre de souches de mycobactéries atypiques 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

Identification à partir des prélèvements cliniques reçus

Parmi les 169 prélèvements reçus au CNR-MyRMA :
- 149 prélèvements ont été mis en culture : 76 cultures étaient négatives, 6 contaminées et 67 positives à : *M.tuberculosis complex* (n=55), *M.xenopi* (3), *M.ulcerans* (n=1), *M.avium* complex (n=5), *M.florentinum* (n=1), *M. gastri* (n=1), *M. marinum* (n=1).
- 101 prélèvements ont fait l'objet d'un test d'amplification génique directe : soit par PCR Amplicor® spécifique de l'ADN de *M.tuberculosis* complex, soit par amplification par Taqman Real Accurate suivie de séquençage du gène *rpoB* ou d'un test Genotype CM®. Les résultats des TAG étaient positifs :
  . pour 33 des 37 prélèvements à examen microscopique positif (89%) ce qui a permis de mettre en évidence des mycobactéries des espèces *M.tuberculosis* complex (n=32) et *M.avium* (n=1).
  . à *M.tuberculosis* complex pour 10 des 45 prélèvements à examen microscopique négatif.
  . pour 8 des 19 prélèvements (42%) pour lesquels l'examen microscopique n'avait pas pu être fait en raison d'un trop faible volume ce qui a permis d'identifier l'ADN de *M.tuberculosis* complex.

De plus :
- 54 prélèvements ont fait l'objet d'une recherche directe de mutation responsable de la résistance à la rifampicine par étude du gène *rpoB* (séquençage ou test MTBDRplus®) (cf. plus loin).

Tests phénotypiques de sensibilité aux antibiotiques

Souches reçues pour tests de sensibilité

551 souches de mycobactéries ont été testées pour leur sensibilité aux antibiotiques : 170 souches de *M.tuberculosis* complex (y compris les 27 souches isolées des prélèvements listés plus haut) **et 381 souches de mycobactéries atypiques.**

Tendances évolutives 2006-2011
Entre 2006 et 2011, le nombre de souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA pour tests de sensibilité aux antibiotiques a diminué de 12% pour les antibiogrammes de 1ère ligne (377 en 2006-07, 330 en 2010-11 mais a **augmenté de 59% pour les antibiogrammes de 2ème ligne** (167 en 2006-07, 265 en 2010-11) qui demandent beaucoup plus de travail (une douzaine de milieux non commercialisés à préparer localement pour chaque souche). Le nombre de **souches de mycobactéries atypiques reçues pour tests de sensibilité aux antibiotiques a aussi augmenté de 35%**.

Tests phénotypiques de sensibilité pour M.tuberculosis complex

Les tests de sensibilité sur les **170 souches de *M.tuberculosis* complex** ont été :
- un antibiogramme « **standard** » (antituberculeux **de 1ère ligne**) pour **31 souches**, pour vérification des résultats trouvés dans les laboratoires d'origine.
- un antibiogramme « **complet** », (antituberculeux **de 1ère ligne et de 2ème ligne**) pour **139 souches**, dont 64 souches envoyées pour multirésistance, 75 souches envoyées pour résistance à au moins l'isoniazide ou la rifampicine ou pour suspicion de multirésistance ou parce que les patients présentaient des intolérances médicamenteuses.

Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne des 170 souches testées en 2011 (Tableau 7)

- 30% (n=51) étaient sensibles à isoniazide, rifampicine, éthambutol et streptomycine (multisensibles)
- 70% étaient résistantes à au moins un de ces 4 antibiotiques dont 28% (n=64) étaient multirésistantes (MDR) c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et la rifampicine. Ce nombre est différent du nombre total de souches MDR reçues en 2011 (N=69) car pour 3 souches de la fin de l'année 2011, l'antibiogramme a dû être refait et n'est pas encore disponible au moment de la rédaction de ce rapport, pour 1 souche

connue en 2011 l'antibiogramme n'a pas été refait car le patient était décédé et enfin pour une souche reçue fin 2011 l'antibiogramme a été fait à partir d'une seconde souche reçue début 2012.

Remarque : Si l'on tient compte des résultats de résistance obtenus pour les 104 souches qui avaient été isolées chez des patients sans antécédent de traitement, le taux de résistance « primaire » aux antituberculeux de 1ère ligne était de 58%. Ce chiffre est beaucoup plus élevé que celui mesuré par l'enquête annuelle menée à travers le réseau Azay-Mycobactéries (<10%, cf. plus loin). Ceci s'explique par le fait que les laboratoires adressent au CNR-MyRMA des souches pour tests de sensibilité en cas de résistance avérée ou fortement suspectée. D'ailleurs, entre 2006 et 2010, le nombre de souches multisensibles reçues a diminué de 120 à 51, 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 en dehors de demandes particulières (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 résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en France.

Tableau 7 : Phénotype de résistance aux antituberculeux de première ligne des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011

		2006	2007	2008	2009	2010	2011
Sensible*		120 (58%)	88 (52%)	86 (47%)	54 (32%)	59 (37%)	51 (30%)
Résistant	H	8 (4%)	7 (4%)	12 (6%)	21 (12%)	13 (8%)	21 (12%)
à au moins	S	8	6	9	6	7	6
1 antibiotique	R	2	1	6	5	4	5
mais non	E	-	-	-	1	0	0
multirésistant	H+S	15 (7%)	27 (16%)	17 (9%)	24 (14%)	23 (14%)	22 (13%)
	H+E	-	-	-	2	1	0
	H+S+E	1	3	3	5	7	1
	R+S+E	-	-	-	1	-	
Sous-total		**34 (16%)**	**44 (26%)**	**47 (25%)**	**65 (38%)**	**56 (35%)**	**55 (33%)**
Multirésistant	H+R	7	12	10	8	5	7
	H+R+S	15 (14%)	8 (5%)	20 (22%)	21 (12%)	12	16
	H+R+E	6	E	‘	3	2	6
	H+R+S+E	25 (12%)	16 (9%)	18 (10%)	19 (11%)	26 (16%)	35
Sous-total		**53 (26%)**	**38 (22%)**	**52 (28%)**	**51 (30%)**	**45 (28%)**	**64 (37%)**
Total général		**207**	**170**	**185**	**170**	**160**	**170**

*sensible à isoniazide (H), rifampicine (R), éthambutol (E) et streptomycine

Résistance aux <u>antituberculeux de seconde ligne</u> des 139 souches testées en 2011 (Tableaux 8 et 9)

*- Résultats pour les **64 souches multirésistantes (MDR)** :*
Les proportions de souches MDR résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient les suivantes (**Tableau 8**) : streptomycine 4/5, éthambutol 2/3, éthionamide 3/4, cyclosérine 2/10, PAS 2/10, au moins un aminoside de réserve (kanamycine, amikacine ou capréomycine) 1/4, fluoroquinolones 1/4. La proportion, au sein des souches MDR, de celles résistantes **<u>aussi</u>** aux fluoroquinolones **<u>et</u>** à au moins un aminoside de réserve (définition de l'ultrarésistance ou **XDR**) était de **10%** soit **6 cas de tuberculose XDR identifiées en 2011**.

Tableau 8 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011

	Années (n souches testées)	2006 (53)	2007 (38)	2008 (51)	2009 (51)	2010 (45)	2011 (64)
a	Ethambutol	58	45	37	47	66	70
	Streptomycine	75	76	76	78	75	80
b	Amikacine	6	5	10	8	13	9
	Kanamycine	15	5	16	16	20	23
	Capréomycine	9	8	10	10	12	11
c	Fluoroquinolones	13	8	14	18	23	22
d	Ethionamide	34	45	57	43	75	82
e	PAS	15	5	6	12	9	17
	Cyclosérine	10	11	37	20	9	18
	Thiacétazone	42	30	26	39	52	39
	Linezolide	0	0	0	0	0	0

a : antibiotiques de première ligne autres que isoniazide et rifampicine
b : aminosides autres que streptomycine (entrent dans la définition de XDR)
c : entre dans la définition de XDR
d : ou prothionamide
e : antibiotiques bactériostatiques (de « dernière ligne »)

*- Résultats pour les **75 souches reçues pour antibiogramme complet dans un contexte autre que la multirésistance***

Les proportions de souches résistantes aux antituberculeux autres que l'isoniazide et la rifampicine étaient beaucoup plus basses parmi les souches reçues dans un contexte autre que la multirésistance (ex. effets secondaires nécessitant l'arrêt de la rifampicine, monorésistance à la rifampicine) (**tableau 9**) que parmi les souches reçues pour multirésistance, ce qui n'est pas surprenant : moins de 5% à l'amikacine ou aux fluoroquinolones, environ 10% à l'éthambutol. L'observation d'une faible proportion de résistance aux fluoroquinolones parmi les souches non MDR à ce jour est un résultat rassurant car l'utilisation large de cette famille d'antibiotique dans la communauté pour de nombreuses indications (infections urinaires, respiratoires etc…) ferait craindre l'émergence de la résistance parmi les souches de *M.tuberculosis* complex sensibles aux antituberculeux de première ligne et donc à terme l'impossibilité d'utiliser cette classe pour les traitements antituberculeux de seconde ligne. Ces données devraient toutefois être confirmées sur un échantillon plus important (cf projet 2012-2016). L'augmentation de la résistance à l'éthionamide depuis 2009 est probablement due à un problème de qualité de la poudre d'éthionamide disponible sur le marché et que nous utilisons pour préparer nos milieux pour antibiogramme. Les solutions engagées en 2011 n'ont pas permis de résoudre le problème. De nouvelles modifications seront engagées en 2012.

Tableau 9 : Résistance (%) aux antibiotiques de 1re et 2e ligne des souches reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 pour antibiogramme de 2e ligne, hors multirésistance (suspicions initiale de multirésistance, intolérances aux antituberculeux de 1re ligne…)

Années (n souches)	2006 (41)	2007 (35)	2008 (38)	2009 (83)	2010 (81)	2011 (75)
Ethambutol	nd	6	8	10	13	13
Streptomycine	nd	54	42	39	43	43
Amikacine	0	3	0	0	3	3
Fluoroquinolones	0	0	5	1	0	0
Ethionamide	14	21	29	52	59	59
PAS	6	11	10	10	11	11
Thiacétazone	9	12	10	14	11	11

Tendances évolutives 2006-2011

Le nombre moyen de souches **MDR** reçues au CNR-MyRMA, qui était resté stable entre 2006 et 2010 **autour d'une médiane de 51 par an (Tableau 10)** soit environ une souche par semaine, a augmenté en 2011 d'environ 40% pour atteindre 69 souches. Cette augmentation qui est maintenue en ce début d'année 2012 (20 souches reçues en 3 mois) a fait l'objet d'une alerte à l'InVS (cf. chapitre Alerte).
La proportion de souches « pré-XDR » (c'est-à-dire MDR résistantes aux fluoroquinolones ou à un des trois aminosides de réserve) n'a pas évolué de façon significative durant les 5 ans : 11 en 2006 (21% des MDR), 3 en 2007(8%), 12 en 2008 (24%), 9 en 2009 (18%), 7 en 2010 (16%) et **17 (27%) en 2011**. En revanche, compte-tenu de l'augmentation du nombre de MDR cette proportion stable se traduit par une **augmentation du nombre absolu des cas de souches pré-XDR** (doublé par rapport à la moyenne de la période).

Le nombre de souches **XDR** qui était de 1 ou 2 par an de 2006 à 2008 (idem depuis 2002) a **augmenté à 4 souches en 2009, 6 en 2010 et est resté stable à 6 en 2011**. Compte tenu de l'augmentation du nombre de souches MDR, ce chiffre stable se traduit par une discrète diminution de la proportion de XDR à 9% (contre 13% en 2010). Ces cas étaient en 2011 d'origines diverses (**Tableau 10**).

Enfin, il faut remarquer que la proportion des souches MDR identifiées par l'enquête systématique auprès des laboratoires du réseau CNR-MyRMA et qui ont effectivement été reçues au CNR-MyRMA pour études *in vitro* a augmenté entre les périodes 2001-02 (~ 60 %) et 2008-09 (90-100 %) **(Tableau 11)**. **Le CNR-MyRMA reçoit donc maintenant la quasi-totalité des souches MDR de France.**

Si on considère la **distribution des souches MDR reçues au CNR-MyRMA entre 2006 et 2011 selon le pays de naissance des patients,** précisé pour 91% d'entre eux **(Tableaux 12 et 13),** on constate que la majorité des souches sont isolées chez des patients nés en Afrique subsaharienne ou à Madagascar (n=91, soit 33%), en Europe Centrale et de l'Est (n=79, soit 28%), en France (n=40, soit 14%), en Asie (n=37, soit 13%), au Maghreb (n=16, soit 6%) et en Europe de l'ouest hors France (Portugal n=7, Norvège n=1, total 3%). Quelques souches (n=8, 3%) proviennent de patients nés en Amérique du sud ou Caraïbes. Globalement, on note une augmentation des patients nés en Asie et en Europe de l'Est. Nous verrons plus loin (cf « Activités de surveillance ») une analyse des tendances évolutives du pays de naissance des patients MDR sur une période beaucoup plus longue (1992-2009).

Tableau 11 : Evolution de 2001 à 2011 du nombre de souches MDR et XDR reçues au CNR-MyRMA, comparativement au nombre de cas MDR recensés par le réseau du CNR-MyRMA. Exhaustivité de l'envoi des souches MDR au CNR-MyRMA

	Cas MDR recensés par le réseau CNR-MyRMA	Souches MDR reçues au CNR-MyRMA même année	Exhaustivité envoi souches (%) pendant même année	Souches XDR reçues CNR-MyRMA	% XDR parmi MDR reçues CNR-MyRMA
2001	48	29	60	0	0
2002	79	47	59	1	2
2003	77	60	78	2	3
2004	68	51	75	1	2
2005	65	60	92	1	2
2006	60	53	88	2	4
2007	44	38	86	2	5
2008	57	51	89	2	4
2009	51	51	100	4	8
2010	48	45	94	6**	13
2011	nd	64	nd	6	9%

*chiffre à confirmer (le CNR-MyRMA est en attente des réponses de quelques laboratoires)
** dont 1 souche d'un patient déjà connu les années précédentes (rechute)
nd : enquête en cours, donnée disponible fin 2012

Tableau 12: Répartition par pays de naissance (détail) des patients pour lesquels des souches ultrarésistantes (XDR) ont été reçues au CNR-MyrMA de 2004 à 2011

Année	Europe occidentale	Afrique du Nord	Afrique subsaharienne	Europe de l'Est et exURSS	Total
2004		1 (Algérie)			**1**
2005			1 (Mali)		**1**
2006	1 (France)			1 (Tchétchénie)	**2**
2007	1 (France)		1 (Congo)		**2**
2008				2 (Russie, Roumanie)	**2**
2009		1 (Algérie)		3 (2 Géorgie, Arménie)	**4**
2010	1 (Portugal)			5* (3 Tchétchénie, Géorgie*, Azerbaïdjan)	**6***
2011	1 (Portugal)	2 (Algérie)	1 (Côte d'Ivoire)	2 (Russie)	**6**

* 1 cas déjà identifié en 2009, rechute

Tableau 13 : Distribution des pays de naissance des patients pour 280 des 309 souches MDR reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 (le pays de naissance n'a pu être précisé dans 29 cas, soit 9%)

Pays d'origine	2006	2007	2008	2009	2010	2011	TOTAL
France	11	5	6	6	4	8	**40**
Portugal	0	2	2	0	2	1	**7**
Norvège	0	0	0	1	0	0	**1**
Total Europe Ouest	**11**	**7**	**8**	**7**	**6**	**9**	**48**
Roumanie	2	1	5	1	0	6	**15**
Moldavie	1	1	1	0	1	1	**5**
Ukraine	0	2	0	0	0	0	**2**
Arménie	1	1	2	3	0	4	**11**
Azerbaïdjan	0	0	0	0	1	0	**1**
Géorgie	2	1	1	4	1	5	**14**
Tchétchénie	1	1	5	3	4	4	**18**
Russie	2	0	1	2	1	7	**13**
Total Europe Est et ex. URSS	**9**	**7**	**15**	**13**	**8**	**27**	**79**
Algérie	1	3	2	1	1	3	**11**
Tunisie	0	0	0	0	0	1	**1**
Maroc	0	1	0	2	0	1	**4**
Total Maghreb	**1**	**4**	**2**	**3**	**1**	**5**	**16**
Cap-Vert	0	0	0	0	1	0	**1**
Mauritanie	0	0	0	1	0	1	**2**
Mali	0	0	0	1	0	0	**1**
Niger	0	0	1	0	0	0	**1**
Tchad	0	0	0	0	1	0	**1**
Sénégal	1	0	2	1	1	0	**5**
Guinée	3	1	2	0	2	1	**9**
Côte Ivoire	5	1	2	3	2	2	**15**
Ghana	0	0	0	1	0	0	**1**
Togo	1	0	0	0	0	0	**1**
Cameroun	0	2	2	0	2	0	**6**
Rep. Centrafricaine	1	1	0	0	0	1	**3**
Congo	3	1	4	4	1	0	**13**
RD Congo	4	5	1	0	2	5	**17**
Angola	1	1	1	1	2	1	**7**
Djibouti	1	0	0	0	0	0	**1**
Ethiopie	1	0	0	1	0	0	**2**
Soudan	0	0	0	1	0	0	**1**
Madagascar-Comores	0	1	0	1	0	0	**2**
Rwanda	0	0	0	0	0	1	**1**
Tchad	0	0	0	0	0	1	**1**
Total Afrique hors Maghreb	**21**	**13**	**15**	**15**	**14**	**13**	**91**
Syrie	0	0	0	1	0	0	**1**
Inde	2	0	0	2	0	1	**5**
Pakistan	0	0	1	1	1	2	**5**
Sri Lanka	0	1	0	0	0	0	**1**
Népal	1	0	0	0	0	0	**1**
Chine	1	1	1	2	1	1	**7**
Tibet	0	1	0	0	3	0	**4**
Mongolie	0	0	0	0	2	1	**3**
Corée	0	0	0	2	0	0	**2**
Cambodge	0	0	1	0	0	0	**1**
Thaïlande	0	0	0	0	0	1	**1**
Vietnam	0	0	1	2	2	1	**6**
Total Asie	**4**	**3**	**4**	**10**	**9**	**7**	**37**
Pérou	1	1	0	0	1	0	**3**
Chili	0	0	0	1	0	0	**1**
Haïti	0	0	0	0	1	1	**2**
Total Amériques	**1**	**1**	**0**	**1**	**2**	**3**	**8**
GRAND TOTAL	**48**	**35**	**44**	**49**	**40**	**64**	**280**

Tests phénotypiques de sensibilité des mycobactéries atypiques, tendances évolutives 2006-2011

***M.avium-intracellulare* complex** : parmi les 219 souches reçues en 2011, 172 (95 *M.avium* et 77 *M.intracellulare*) ont fait l'objet d'un antibiogramme dont 14 (8%) étaient résistantes à la clarithromycine (CMI > 16 mg/l en milieu 7H9). Sur la période 2006 à 2011, la proportion de souches résistantes à la clarithromycine était de 7%, soit 56 souches sur les 796 testées. Les souches résistantes concernaient des patients ayant des antécédents de traitement pour 39 cas parmi les 169 patients ayant des antécédents connus de traitement soit **23% de résistance secondaire**.

M.xenopi : parmi les 54 souches reçues en 2011, 31 ont fait l'objet d'un antibiogramme. Aucune n'était résistante à la clarithromycine. Seuls 9 patients avaient des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2011, seules 2 souches de *M.xenopi* ont été trouvées résistantes à la clarithromycine parmi 217 souches testées (1%). Ces souches ont été isolées chez 2 des 31 patients ayant des antécédents de traitement (**6% de résistance secondaire**).

***M.kansasii* :** Parmi les 26 souches reçues en 2011, 22 ont fait l'objet d'un antibiogramme et aucune n'était résistante à la rifampicine y compris pour le patient ayant des antécédents de traitement. Entre 2006 et 2010, aucune des 129 souches reçues n'étaient résistantes à la rifampicine y compris pour les 13 patients ayant des antécédents de traitement.

Espèces à croissance rapide : Les 16 souches de *M.chelonae* testées en 2011 étaient sensibles à la clarithromycine. En revanche, cette proportion n'était que de 12/41 pour *M.abscessus* sensu stricto, 9/9 pour *M.bolletii,* 14/16 pour *M.massiliense*, en cohérence avec la présence naturelle d'un gène *erm* conférant une résistance inductible aux macrolides chez ces espèces (cf. § recherche sur les mécanismes de résistance). Les modifications des critères de classification de ces espèces durant la période 2006-2011 rend difficile la synthèse des résultats des tests de sensibilité.

Détection de mutations impliquées dans la résistance

Souches reçues pour détection de mutations

- En 2011, plus de 232 souches et 54 prélèvements ont été soumis à la détection moléculaire rapide de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide et/ou l'éthionamide et/ou les fluoroquinolones et/ou le pyrazinamide et/ou les aminosides et/ou l'éthambutol (a) parce que provenant de malades déjà traités pour tuberculose et/ou immunodéprimés et/ou provenant d'un pays de forte endémie de résistance ou (b) pour contrôle des résultats phénotypiques.
- 46 souches de mycobactéries atypiques ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance à des antibiotiques antimycobactériens

Tendances évolutives 2006-2011

Le nombre **de recherches de mutations impliquées dans la résistance de *M.tuberculosis* a augmenté de 50% entre 2006 et 2008 puis s'est maintenu depuis autour de 1000 par an (Tableau 14).** Ces dernières années ont de plus été celles d'une diversification du diagnostic moléculaire de la résistance aux antituberculeux. Le CNR-MyRMA est passé de l'analyse de 3 gènes (*rpoB, gyrA* et *pncA*) permettant d'étudier la sensibilité à 3 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones et pyrazinamide) à celles de 10 gènes (*rpoB, gyrA, gyrB, pncA, katG, inhA, rrs, embB, ethA, ethR)* permettant d'étudier la sensibilité à 9 antituberculeux (rifampicine, fluoroquinolones, pyrazinamide, isoniazide, éthionamide, éthambutol, amikacine, kanamycine, capréomycine).

Tableau 14 : Nombre de recherches de mutations dans les gènes codant pour la résistance aux antituberculeux (rifampicine, isoniazide, pyrazinamide, fluoroquinolones, éthionamide) effectuées au CNR-MyRMA sur les souches reçues de 2006 à 2011

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
rpoB (rifampicine)	184	197	276	254	201	232
katG-inha (isoniazide)	182	179	276	249	198	227
pncA (pyrazinamide)	142	138	172	164	137	183
gyrA/*gyrB* (Flquinolones)	117/12	105/105	150/150	129/129	128/128	183/183
ethA/ethR (éthionamide)	-	-	-	-	50/50	79/79
rrs (aminosides)	-	-	-	-	56	99
emB (éthambutol)	-	-	-	-	62	105
Total	**637**	**724**	**1024**	**925**	**1010**	**1108**

Mutations impliquées dans la résistance de M.tuberculosis, tendances évolutives 2006-2010

Rifampicine (RIF)

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*plus*® complété par l'amplification et le séquençage du gène *rpoB* ont permis d'identifier des **mutations dans *rpoB* pour 94 des 232 (40,5%) souches** testées en 2011 (**Tableau 15**) :
- 58 mutations S531L (62%) identifiées directement par GenoType MTBR*plus*®
- 12 mutations H526Y ou H526D (13%) identifiées directement par GenoType MTBR*plus*®
- 1 mutation D516V (1%) identifiée directement par GenoType MTBR*plus*®
- Pour 23 souches, la bandelette GenoType MTBR*plus*® a permis d'établir qu'il y avait une mutation dans *rpoB* mais pas d'identifier précisément les mutations. Pour ces souches, le séquençage du gène *rpoB* a permis de préciser les mutations présentes qui montrent une grande diversité (**Tableau 15**).

La **part dominante de la mutation S531L du gène *rpoB* dans la résistance à la rifampicine reste de l'ordre de 50 à 75% depuis 2006**, en accord avec les données publiées à l'étranger. Les souches résistantes à la rifampicine pour lesquelles aucune mutation n'est détectée dans la région étudiée du gène *rpoB* sont exceptionnelles (moins de 1%), ce qui fait de la recherche de mutations dans ce gène une excellente approche rapide de la résistance à la rifampicine et même de la multirésistance en raison de la rareté des souches monorésistantes à la rifampicine (cf. § surveillance de la résistance).

Détection directe de mutations conférant la résistance à la rifampicine sur prélèvements
La détection directe de la résistance à la rifampicine a été menée sur 54 prélèvements par étude du gène *rpoB* (séquençage ou test MTBDRplus). Un résultat a été obtenu dans 38 cas : 18 fois en faveur de la résistance et 20 fois en faveur de la sensibilité. Tous ces résultats ont été confirmés ultérieurement par l'antibiogramme phénotypique.

Tableau 15: Distribution des mutations du gène *rpoB* identifiées dans les souches de *M.tuberculosis* complex étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 pour détection moléculaire de la résistance à la rifampicine (techniques : GenoType®MTB-DRplus, séquençage du gène *rpoB*)

Mutation dans RpoB	2006	2007	2008	2009	2010	2011
S531L	26	29	34	41	37	58
H526Y	2	2	5	7	4	6
H526D	3	3	2	5	4	6
H526N ou T ou L ou S ou R	5	2		2	2	4
D516V	9	1	3	8	1	1
D516Y	4			2		3
Délétion N519				1		2
L511P				1	3**	
Q513P						1
S531W	1			3		2
S531F						1
L533P	3			2	3	2
S509T + S522W						1
L511P + D516G						1
S509T + D516Y						1
Q510H + H526R						1
L511R + D516Y						3
Délétion sur les positions 515-516						1
Insertion entre les positions 531 et 532				6		
Mutation entre les positions 510 et 533*		1	14	2		
Total avec mutation	**53**	**38**	**58**	**80**	**54**	**94**
Pas de mutation	131	159	218	174	147	138
Total général	**184**	**197**	**276**	**254**	**201**	**232**

* position de la mutation non précisée
** dont 1 avec en plus mutation S509I

Isoniazide (INH)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*plus*, complété par le séquençage des gènes *katG*, *inhA* et du promoteur d'*inhA*, a permis d'identifier des **mutations dans *katG* et *inhA* pour 124 des 227 (54%) souches testées en 2011** (**Tableau 16**) :
- 86 fois, une mutation en 315 dans *kat*G (69%), toujours corrélée avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH, dont 76 mutations isolées et 10 associées à une mutation dans le promoteur du gène *inhA* (en position -8, n=3; en position -15, n=7).
- 3 fois, une mutation S315N (2%), corrélée avec une résistance phénotypique à haut niveau à INH
- 20 fois, une mutation de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* (16%), corrélée, lorsqu'elle est isolée, avec une résistance phénotypique à bas niveau à INH.
- 1 fois en position -17 une mutation de type « -17 g->t » associée à un très bas niveau de résistance à INH
- 2 fois une mutation du gène *inhA*, au niveau du codon 94 (S94A, n=1, bas niveau de résistance) et au niveau du codon 21 (I21T, n=1, haut niveau de résistance)
- 12 fois, une mutation dans le gène *katG* à une position autre que celle du codon 315 (10%). Pour ces souches, qui présentent des niveaux de résistance phénotypique variables à INH, le test MTBDR*plus* ne peut pas mettre en évidence la mutation ce qui impose le séquençage complet des gènes *katG* et *inhA*.

La part dominante de la mutation S315T dans le gène *katG* reste de l'ordre de 50 à 75% depuis 2006, en accord avec les données publiées à l'étranger. **Les mutations isolées de type « -15 c->t » dans la région régulatrice du gène *inhA* représentent environ un quart des cas. Les souches pour lesquelles on n'a pas détecté de mutation ni dans *katG* ni dans *inhA* et sa région régulatrice représentent 10 à 15 % de l'ensemble des souches résistantes à l'isoniazide** testées selon les années mais moins de 5 % des souches MDR.

Tableau 16 : Distribution des mutations des gènes *katG* et *inhA* dans les souches étudiées au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 pour détection moléculaire de la résistance à l'isoniazide (techniques : GenoType®MTB-DRplus et séquençage des gènes *katG*, *inhA* et promoteur du gène *inhA*)

Mutation	2006	2007	2008	2009	2010	2011
KatG S315T	73*	58*	54	73	49	76
KatG 315 autre que S>T	1*	2*	1	2	-	3
KatG autre que S315	7	6	9	14	7	12
Promoteur inhA	12	27	17	28	24	21
dont -15	*1*	*27*	*16*	*28*	*24*	*20*
InhA	2	1		2	1**	2
KatG S315T **et** promoteur inhA	nd*	nd*	12	9	8	10
dont -15			*5*	*4*	*5*	
Autre combinaison KatG **et** InhA				1		
Total mutations	**95**	**94**	**93**	**129**	**89**	**124**
Pas de mutation	87	85	183	120	109	103
Total général	**182**	**179**	**276**	**249**	**198**	**227**

* en 2006 et 2007, les mutations dans InhA n'ont pas été recherchées dans les souches mutantes dans KatG, en conséquence, il n'a pas été précisé si ces souches sont des simples mutants KatG ou des doubles mutants KatG + InhA
** en plus mutation inhA -15 c->t

Pyrazinamide (PZA)

Le séquençage du gène *pncA* qui code pour la pyrazinamidase, enzyme qui transforme le PZA, prodrogue inactive, en acide pyrazinoïque, antibiotique actif, a été effectué **pour 183 souches en 2011** (souches MDR et autres souches adressées pour dépistage de la résistance aux antituberculeux).
En raison de l'arrêt de fabrication par la société Biorad des milieux contenant du pyrazinamide et une base de Lowenstein à pH acide, nous avons dû arrêter momentanément le test phénotypique et la détection de la résistance a été faite, comme les années précédentes, grâce aux données de la littérature sur l'impact des mutations sur la résistance et la modélisation tridimensionnelle de la pyrazinamidase (cf travaux de recherche).
Parmi 183 souches, 54 (29%) avaient une mutation du gène *pncA* (**Tableau 17**) dont 10 *M.bovis* (résistance naturelle par « mutation » H57D). 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 plusieurs années car un tel tableau serait trop long.

Tableau 17 : Distribution des mutations du gène *pncA* dans les 183 souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2011 pour détection moléculaire de la résistance au pyrazinamide (technique : séquençage du gène *pncA*)

Mutation	N
M1I	1
I5S	1
V9A	1
D12A	3
C14G	1
Y34STOP	1
T47A	1
H57D*	10
S67STOP	1
W68R	1
T76P	2
H82R	1
T87M	3
G97R	1
T100P	4
W119STOP	1
W119R	1
V125G	2
V130M	1
V139G	2
V139M	1
Q141P	1
T142M	2
A146T	1
S164P	1
A79V + Y103STOP	1
délétion dans PncA	4
insertion dans PncA	4
Total mutations	**54**
Pas de mutation	129
Total général	**183**

*mutation observée chez toutes les souches de *M. bovis*

Fluoroquinolones (FQ)

Le système d'amplification-hybridation GenoType®MTBR*sl*, complété par le séquençage des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour l'ADN gyrase, cible des fluoroquinolones, a été effectué **pour 183 souches reçues en 2011** (souches MDR, souches suspectes d'être MDR, par exemple, après rechute).

Des **mutations** (**Tableau 18**) ont été détectées chez **28 des 183 souches** (15%) dans **GyrA** (22 cas) ou **GyrB** (6 cas). Aucune souche ne présentait de double mutation GyrA et GyrB.
La plupart des mutations détectées sont connues pour entraîner la résistance aux fluoroquinolones (n=23), exceptées T80A dans GyrA (n=3) et G559A dans GyrB (n=2) qui sont des mutations décrites comme n'étant pas associées à la résistance aux fluoroquinolones.
Nous n'avons pas trouvé de mutation pour les 155 souches dont la sensibilité aux fluoroquinolones a été confirmée par l'antibiogramme phénotypique. **La spécificité de la détection moléculaire de la résistance aux fluoroquinolones a donc été de 100 % en 2010**.

On voit dans le **tableau 18** que les **mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones sont très variées mais que celles des codons 94 et 90 de GyrA dominent** et représentent 57% du total de souches présentant une mutation en 2011.

Tableau 18 : Distribution des mutations des gènes *gyrA* et *gyrB* dans les souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA de 2006 à 2011 pour détection moléculaire de la résistance au fluoroquinolones (technique : séquençage)

Gène	Mutation*	2006	2007	2008	2009	2010	2011
gyrA	T80A**		2	2	3	5	3
	G88C		1				
	D89N					1	
	A90V	2	1	2	2	3	3
	S91P				2	1	3
	D94A			3		3	3
	D94H			1	1		2
	D94G	4***		3	1	2	1
	D94N	1			2		1
	D94Y				1	1	3
	Q101E				1		
	T80A** + A90G	3					
	T80A** + A90E		1				
	A90V + D94Y				1		
	A90V + D94V						3
gyrB	S470I					1	
	P478A			1			
	R485H		1				
	S486Y				1		1
	D500A			1			
	D500N					1	
	A506G				1		
	N538D				1		
	E540V				1		3
	E540A					1	
	A543V				1	1	
	A547V				1		
	G551R				1		
	G559A**		2				2
Total mutations		**10**	**8**	**13**	**21**	**20**	**28**
Pas de mutation		107	97	137	108	108	155
Total général		**117**	**105**	**150**	**129**	**128**	**183**

* numérotation *M.tuberculosis*** polymorphisme sans lien avec la résistance aux quinolones*** dont 2 avec aussi la double mutation T80A + A90E

Autres antituberculeux : ethionamide (ETH), aminosides (KAN, AMK, CAP), ethambutol (EMB)

Ethionamide

Le séquençage des gènes *ethA* et *ethR*, codant pour la monooxygénase EthA et son régulateur EthR, a été effectué **pour 79 souches en 2011** (2ème année d'utilisation de ce test). Des mutations (**Tableau 19**) ont été détectées chez 31 souches (39%). On note une grande diversité des mutations, parmi lesquelles 8 délétions et une insertion au sein du gène *ethA*, 2 codons STOP entrainant une interruption prématurée de la protéine EthA, et 4 mutants EthA cumulant une seconde mutation dans EthR. Enfin, une souche présentait une mutation uniquement dans EthR.

Tableau 19 : Distribution des mutations des gènes *ethA* et *ethR* dans les 105 souches de *M.tuberculosis complex* étudiées au CNR-MyMRA en 2011 pour détection moléculaire de la résistance à l'ethionamide (technique : séquençage)

Gène	EthA	EthR	N
ethA	S15F		1
	H22P		1
	G124D		1
	T134I		1
	C137R		**2**
	W167G		1
	N226D		1
	V238G		**2**
	W256STOP		1
	S266R		1
	Q269STOP		1
	L272P		1
	T317I		1
	N319D		2
	Insertion		1
	délétions		8
ethR		P220L	1
ethA et ethR	Y141C + duplication	M167I + Q168K	1
	H22P	**F135L**	**3**
Total mutations			**31**
Pas de mutation			48
Total général			**79**

*Numérotation de *E.coli*

Kanamycine, amikacine et capreomycine

Le système d'amplification-hybridation GenoType MTBR*sl*® a été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *rrs* aux positions 1401, 1402 et 1484, ces 3 positions étant impliquées dans la résistance aux aminosides de seconde ligne (kanamycine et amikacine) et à la capréomycine. Au total, **99 souches ont été étudiées en 2011** (2ère année d'utilisation de ce test). Les résultats montrent la présence d'une **mutation** a1401g pour 7 d'entre elles (7%) et d'une mutation g1484t pour une d'entre elles (1%). Deux mutations non décrites à ce jour (t1404c et g1473a) ont été détectées par séquençage du gène *rrs* à partir d'une souche présentant un profil d'hybridation anormal sur la bandelette MTBR*sl*. Cette souche était par ailleurs sensible à amikacine, kanamycine et capreomycine, ce qui indique que les deux mutations détectées ne jouent pas de rôle dans la résistance aux aminosides de seconde ligne.

Ethambutol *:*

Le système d'amplification-hybridation GenoType® MTBR*sl* a également été utilisé pour la recherche de mutations dans le gène *embB* à la position 306 qui a été associée à la résistance à l'ethambutol. Au total, **105 souches ont été étudiées en 2011** (2ère année d'utilisation de ce test), montrant la présence d'une **mutation** du codon EmbB-306 pour **36 d'entre elles** (34%): M306V (n=21) et M306I (n=15).

Mutations impliquées dans la résistance des mycobactéries atypiques

En 2011, 46 souches ont été soumises à la détection moléculaire rapide de la résistance à la clarithromycine par recherche de mutations de la région autour des nucloétides 2058 et 2059 du gène *rrl* codant l'ARN 23S. Sept de ces souches (15%) portaient une mutation : 2058 A>C (*M.avium*, n=2), 2058 A>G (*M.intracellulare*, n=1), 2059 A>C (*M.avium*, n=2), 2059 A>G (*M.avium*, n=1), et 2054 A>G (*M.avium*, n=1). Toutes ces souches étaient résistantes à la clarithromycine, excepté celle présentant la mutation 2054 A>G qui n'est pas associée à la résistance à la clarithromycine.

Prélèvements pour diagnostic de la lèpre et détection de mutations impliquées dans la résistance aux antilépreux

En 2011, nous avons reçu 51 prélèvements pour diagnostic de lèpre, ce qui est beaucoup plus que les années précédentes. Pour 22 prélèvements (43%), l'examen microscopique était positif. Ces prélèvements positifs correspondaient à 9 nouveaux cas et 13 suspicions de rechutes. Il s'agissait de 9 patients de Nouvelle Calédonie (3 rechutes et 6 nouveaux cas), de 3 patients de Tahiti (3 rechutes) et 10 cas vus en consultation ou hospitalisés en France métropolitaine : 1 cas à Orléans, 1 cas à Rennes, 1 cas à Paris-Tenon, 5 cas à Paris-Saint Louis, 1 cas à Grenoble et 1 cas à Créteil-Mondor. Ces cas étaient importés, les patients étant natifs de territoires où la lèpre est encore présente (respectivement, dans l'ordre : Mayotte (2), Guinée Conakry, République du Congo (2), Guinée Bissau, Côte d'Ivoire).
Les tests moléculaires de résistance (amplification-séquençage des gènes *rpoB*, *folP* et *gyrA*) effectués sur les biopsies cutanées ont été positifs pour 19 cas. Pour 3 cas, les amplifications étaient négatives du fait du faible nombre de bacilles ou chez des patients sous traitement ou ne rechutant pas.
Les résultats de détection de résistance ont été les suivants :
- pour les 9 nouveaux cas (recherche de résistance « primaire ») : 8 souches ont été considérées comme sensibles (pas de mutation) à la rifampicine, aux sulfones et aux quinolones, et 1 souche était résistante aux sulfones (mutation P55L dans *fol*P). Cette souche était isolée d'un malade de Nouvelle Calédonie.
- pour les 10 cas de rechute, la souche était sensible aux antilépreux (pas de résistance « secondaire »), sauf pour un cas de Tahiti pour lequel la souche était résistante à la rifampicine. Cette résistance a été acquise à la suite d'un traitement pris de façon désordonnée dans un contexte d'intolérance à plusieurs antibiotiques, avec un patient peu suivi du fait de son habitat dans une île isolée peu médicalisée.

En 2011, nous n'avons pas eu de résultat positif in vivo (multiplication chez la souris) pour les prélèvements reçus en 2010. En effet, pour le seul cas de lèpre pour qui nous avions fait une inoculation chez la souris (prélèvement reçu dans les 4 jours avec conservation à 4°C), la culture était négative à 12 mois. Ceci est dû au fait que la patiente était sous traitement depuis 3 semaines au moment du prélèvement.

Tendance évolutive 2006-2011
Le nombre de prélèvements pour suspicion de lèpre chez des patients vus en France (métropole ou DOM-TOM) reçus au CNR-MyRMA a beaucoup augmenté durant les 6 dernières années : 10 par an en 2006-07, 20 en moyenne en 2008-10 et 51 en 2011. Le nombre de cas confirmés a augmenté d'une moyenne de 3 à 7 entre 2006 et 2010 et a été de 22 en 2011. Au total, 5 des 49 cas positifs testés durant les 6 années étaient résistants aux sulfamides (dapsone) (10% de résistance), 1 aux quinolones et 1 à la rifampicine (Tableau 20).

Tableau 20 : récapitulatif 2006-2011 des prélèvements reçus au CNR-MyRMA pour diagnostic de lèpre

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
N total reçus	**10**	**10**	**18**	**17**	**25**	**51**	**131**
N cas positifs pour *M.leprae*	**5**	**2**	**7**	**6**	**7**	**22**	**49 (37%)**
Nouveau cas	4	0	5	5	6	9	29
Rechutes	1	2	2	1	1	13	20
Lieu du diagnostic							
France Métropolitaine	0	0	2	2	4	10	18
DOM-TOM	5	2	5	4	3	12	31
Pays d'origine des patients							
DOM-TOM	5	2	5	2	5	14	33
Afrique			1	2	1	8	12
Asie			1		1		2
Europe				2			**2**
Resistance aux antilépreux							
Dapsone	1/4	0/2	1/4	1/6	1/7	1/19	5/42 (12%)
Rifampicine	0/5	0/2	0/4	0/6	0/7	1/19	1/43 (2.3%)
Ofloxacine	0/3	0/2	0/3	1/6	0/7	0/19	1/40 (2,5%)

3. Activités de surveillance

3.1. Activités de surveillance des caractéristiques de la tuberculose et de la résistance aux anti-tuberculeux

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

Les données recueillies en 2011 concernent les malades diagnostiqués pendant l'année 2010 par les 38 laboratoires du réseau Azay-Mycobactéries. Ces 38 laboratoires ont colligé en 2010 les données concernant **1487 cas de tuberculose à culture positive** diagnostiqués en 2010**.** Un test de sensibilité à au moins rifampicine et isoniazide a été réalisé pour 1473 des 1487 (99%) cas colligés**. La distribution des cas par région est donnée dans le** Tableau 21**.**

Tableau 21 : Surveillance de la résistance primaire et secondaire de *M.tuberculosis* complex menée par le réseau Azay-Mycobactérie de 2006 à 2010 : distribution régionale des cas à culture positive. Pour 2010, les données sont exprimées en nombre de cas et en % du total des cas de l'année.

Régions	2006	2007	2008	2009	2010	
Alsace	41	35	40	50	39	2,6
Aquitaine	144	116	106	126	132	8,9
Auvergne	0	29	23	29	18	1,2
Bourgogne	15	23	29	24	17	1,1
Bretagne	16	14	22	17	12	0,8
Centre	21	18	24	15	12	0,8
Champagne Ardennes	19	6	16	15	13	0,9
Corse	0	0	0	0	0	0
Franche-Comté	16	16	17	12	11	0,7
Ile de France	702	712	712	780	747	50,2
Languedoc-Roussillon	67	57	53	31	42	2,8
Limousin	16	13	23	14	14	0,9
Lorraine	25	28	36	28	23	1,5
Midi-Pyrénées	49	91	57	55	0	0
Nord-Pas de Calais	47	35	35	44	42	2,8
Normandie Basse	34	25	34	34	31	2,1
Normandie Haute	49	41	40	36	39	2,6
Provence ACA	0	37	39	38	61	4,1
Pays de Loire	69	74	79	63	71	4,8
Picardie	28	24	26	22	20	1,3
Poitou-Charentes	16	16	18	23	17	1,1
Rhône-Alpes	135	139	141	117	126	8,5
TOTAL	**1509**	**1549**	**1570**	**1574**	**1487**	**100%**

Pour les 1473 cas pour lesquels la sensibilité à rifampicine et isoniazide a été éprouvée, les renseignements sur les antécédents de traitement ont permis de stratifier les données selon les recommandations de l'OMS (**Tableau 22**).

Caractéristiques générales des cas de tuberculose recensés

La proportion des cas de tuberculose à culture positive étudiés par le réseau Azay-mycobactéries en 2010 en fonction des **antécédents de traitement (6,2% déjà traités), du pays de naissance (53% nés à l'étranger) et du statut VIH (8,2%)** est présentée dans la **Figure 3**.

L'analyse de l'évolution depuis 1995 montre :

- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de la **proportion des cas diagnostiqués chez des patients ayant des antécédents de traitement** ce qui est en faveur d'une prise en charge convenable de la tuberculose en France (indicateur de qualité),
- une **augmentation régulière puis stabilisation ces dernières années de la proportion des cas diagnostiqués chez des patients nés à l'étranger**, de 35% environ au milieu des années 1990 à plus de 50% depuis 2002 et 53% en 2010. La plupart des pays d'Europe de l'Ouest (cf rapports OMS) constatent une évolution de ce type,
- une **stabilité**, voire une légère tendance à la baisse, de **la proportion des cas diagnostiqués chez les patients VIH+** autour de 8-10 %, ce qui montre que la co-infection tuberculose-VIH est peu fréquente en France et que l'impact de l'épidémie du **VIH sur l'épidémiologie de la tuberculose est modeste.**

Tableau 22 : Résistance aux antituberculeux de 1ère ligne en 2010 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 (%)
Souches testées	1187 (100%)	345 (100%)	644 (100%)	91 (100%)	31 (100%)	48 (100%)
Sensible	1072 (90,3%)	319 (92,5%)	567 (88,0%)	72 (79,1%)	27 (87,1%)	36 (75,0%)
Résistant	115 (9,7%)	26 (7,5%)	77 (12,0%)	19 (20,9%)	4 (12,9%)	12 (25,0%)
- dont résistant au moins à :						
SM	71 (6,0%)	16 (4,6%)	46 (7,1%)	12 (13,2%)	2 (6,5%)	7 (14,6%)
INH	64 (5,4%)	14 (4,1%)	46 (7,1%)	16 (17,6%)	3 (9,7%)	11 (22,9%)
RMP	15 (1,3%)	1 (0,3%)	13 (2,0%)	8 (8,8%)	0 (0,0%)	7 (14,6%)
EMB	10 (0,8%)	2 (0,6%)	8 (1,2%)	7 (7,7%)	1 (3,2%)	5 (10,4%)
- dont monorésistant à :						
SM	47 (4,0%)	12 (3,5%)	27 (4,2%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
INH	35 (2,9%)	9 (2,6%)	24 (3,7%)	5 (5,5%)	2 (6,5%)	3 (6,3%)
RMP	1 (0,1%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
EMB	1 (0,1%)	0 (0,0%)	1 (0,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
- dont MDR	13 (1,1%)	1 (0,3%)	11 (1,7%)	8 (8,8%)	0 (0,0%)	7 (14,6%)

SM : streptomycine ; INH : isoniazide ; RMP : rifampicine ; EMB : éthambutol
Les antécédents de traitement étaient douteux ou inconnus pour 195 cas
Le pays de naissance était inconnu pour 272 cas
La streptomycine n'a pas été éprouvée pour 125 cas

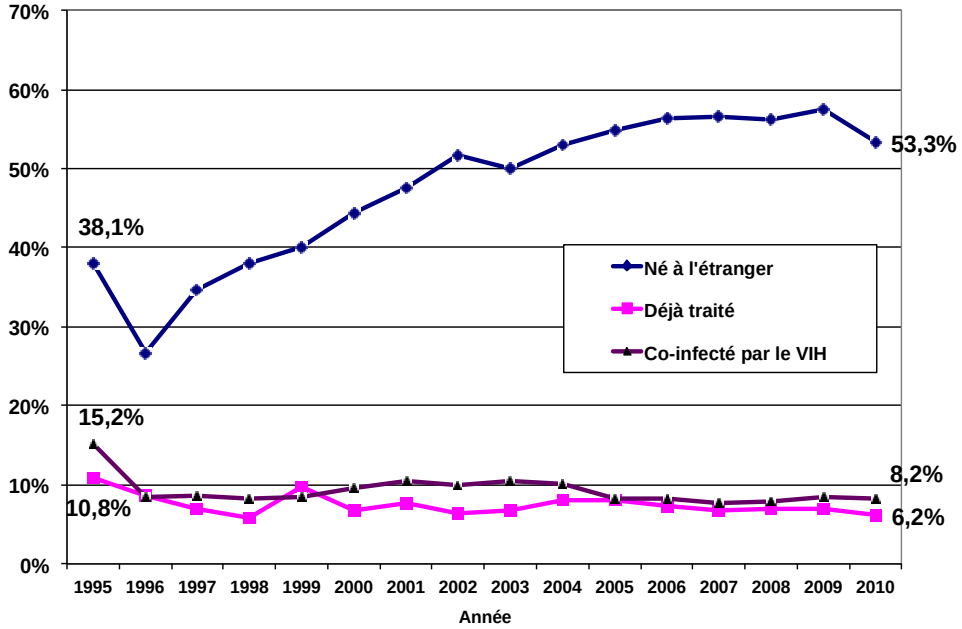


Figure 3 : Caractéristiques des cas de tuberculose à culture positive (en %). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2010

Pourcentage global de résistance « primaire »

Chez l'ensemble des 1187 malades sans antécédent de traitement (nouveaux cas), le pourcentage de résistance ("**résistance primaire**") à **au moins un des 4 antituberculeux de première ligne était en 2010** de **9,7% (Tableau 22, Figure 4)**. **Ce chiffre est globalement stable depuis 1995.**

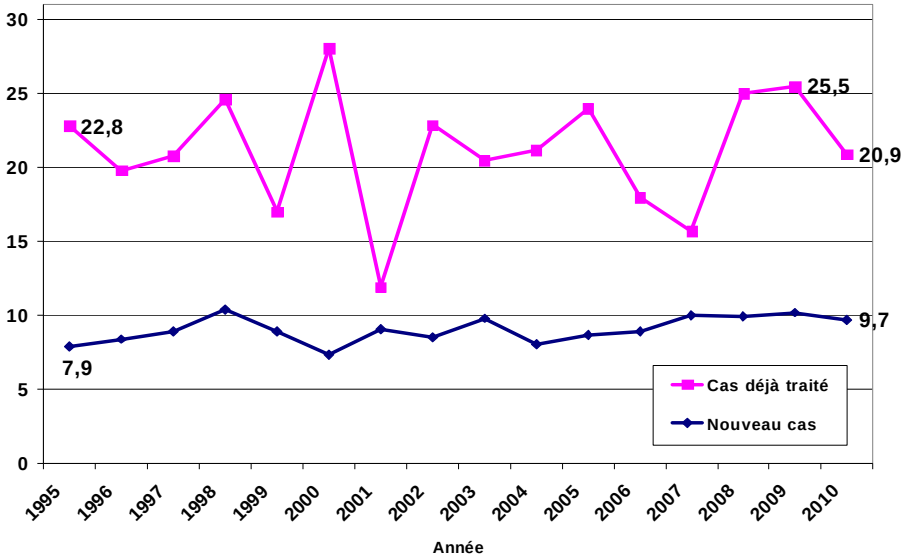


Figure 4 : Résistance (en %) à au moins un antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, éthambutol, streptomycine) chez les nouveaux cas (résistance primaire) et les cas déjà traités (résistance secondaire). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2010

Le pourcentage de résistance primaire à chacun des antituberculeux pris séparément (Figure 5, Tableau 22) était beaucoup plus élevé pour l'isoniazide (INH 5,4%) et la streptomycine (SM 6,0%) que pour la rifampicine (RMP 1,3%) et l'éthambutol (EMB, 0,8%). **Bien que le pourcentage de résistance primaire à l'INH en 2010 soit légèrement plus faible que celui de 2009 (6,1%),** il reste significativement plus élevé qu'au début de la surveillance (3,7% en 1995). **Ceci confirme**

l'importance de maintenir en France les recommandations thérapeutiques de quadrithérapie pour les nouveaux cas.

Comme les années précédentes, la quasi totalité des souches résistantes à la rifampicine rapportées en 2010 chez les patients sans antécédent de traitement (13/15) étaient aussi résistantes à INH (multiresistance). La proportion de cas **multirésistants « primaires »** mesuré en 2010 au travers du réseau Azay-mycobactéries était de **1,1%**, chiffre très proche de celui de 2009 (1,0%).

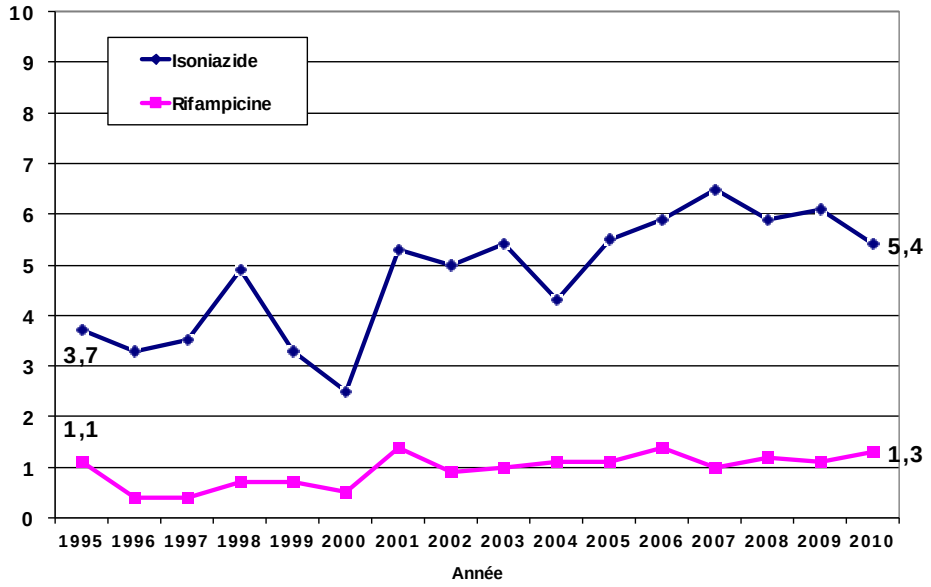


Figure 5 : Résistance (en %) à l'isoniazide et la rifampicine chez les nouveaux cas (résistance « primaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2010

Une analyse plus détaillée de l'augmentation de la résistance primaire à INH a été menée en 2010-2011 sur les cas recueillis de 1995 à 2008.

Cette analyse a montré que l'augmentation était observée à la fois chez les nouveaux cas nés en France mais aussi chez ceux nés à l'étranger. Pour les patients nés en France, l'analyse effectuée en regroupant les patients par cohorte de naissance (cohortes de 10 ans) au moment du diagnostic a montré que la proportion de souches résistantes à INH était plus importante chez les cas les plus jeunes que chez les plus agés. Pour un même age au moment du diagnostic, la proportion de résistance à INH était plus élevée dans les cohortes les plus jeunes. **Le seul facteur de risque indépendant associé à la résistance à INH était d'être né après 1950**, et plus particulièrement après 1980. La co-infection par le VIH n'était pas associée à un plus haut risque de résistance à INH chez les patients nés en France. Ces résultats suggèrent que des souches résistantes à INH circulent en France et contaminent les patients les plus jeunes. Une étude spécifique et plus approfondie des caractéristiques de ces patients et des souches pourrait permettre de mieux expliquer ce phénomène.

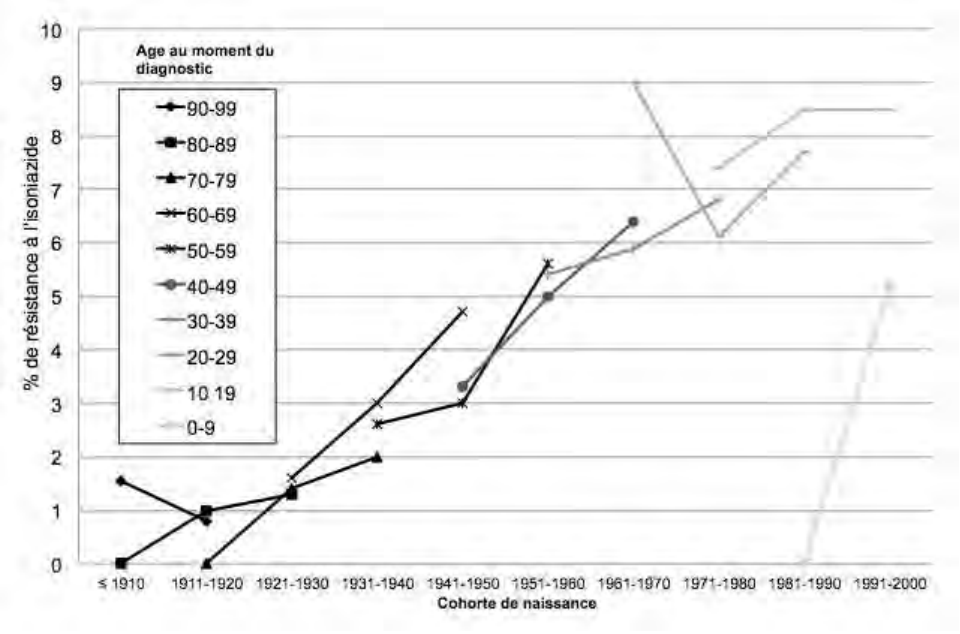


Figure 6 : Résistance (en %) à l'isoniazide chez les nouveaux cas (résistance primaire) selon la cohorte de naissance et l'age au moment du diagnostic. Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2008

Résistance primaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance primaire à au moins un antituberculeux chez les 345 malades nés en France (**Tableau 22**) était de 7,5% alors qu'il était de 12,0% chez les 644 nés à l'étranger (p<0,01). **Les pourcentages de résistance primaire étaient plus élevés chez les 644 nés à l'étranger que chez ceux nés en France** pour INH (7,1% vs 4,1% ; p=0,07) et RMP (1,2% vs 0,6% ; p=0,001). Comme les autres années, **la majorité** (11 sur 12 pour lesquels le pays de naissance était connu) **des cas multirésistants « primaires » concernaient des malades nés à l'étranger**.

Pourcentage global de résistance « secondaire»

Chez les 91 malades ayant déjà reçu un traitement antituberculeux (cas déjà traités), le pourcentage de résistance (résistance "secondaire" ou "acquise") à au moins un des 4 antituberculeux était de 20,9%, soit 2 fois celui vu plus haut pour les nouveaux cas (**Figure 4, Tableau 22**). Ce pourcentage est le plus élevé observé depuis le début de la surveillance en 1995 mais les fluctuations enregistrées en limitent l'interprétation. Le pourcentage de résistance "secondaire" à INH observé en 2010 (17,6%) est comparable à celui de 2009 (16,9%) (**Figure 7**). Le pourcentage de résistance secondaire à RMP (8,8%) reste bien plus élevé que le pourcentage de résistance primaire à cet antibiotique (1,3%).
Toutes les souches résistantes à la rifampicine chez les patients avec antécédent de traitement (n=8) étaient aussi résistantes à INH (multiresistance).

Résistance secondaire et pays de naissance

Le pourcentage de résistance "secondaire" à au moins un antituberculeux était de 12,9% chez les 31 malades nés en France (**Tableau 22)** et de 25,0% chez les 48 malades nés à l'étranger mais la différence n'était pas significative (p=0,26) en raison du faible nombre de cas dans chaque catégorie. Le pourcentage de **résistance 2aire était plus élevé chez les malades nés à l'étranger pour chaque antituberculeux** mais la différence n'était statistiquement significative que pour la rifampicine (14,0% vs 0%, p=0,04), **Sept des 8 cas de multirésistance secondaire concernaient des malades nés à l'étranger** et pour le dernier cas, le pays de naissance n'était pas connu.

Monorésistance à la rifampicine

En 2010, une seule souche était monorésistante à RMP (résistance « primaire ») et une souche était résistante à RMP et à SM mais pas à INH (résistance « primaire »). Il y avait en 2010 aucun cas de mono-résistance « secondaire » à RMP.

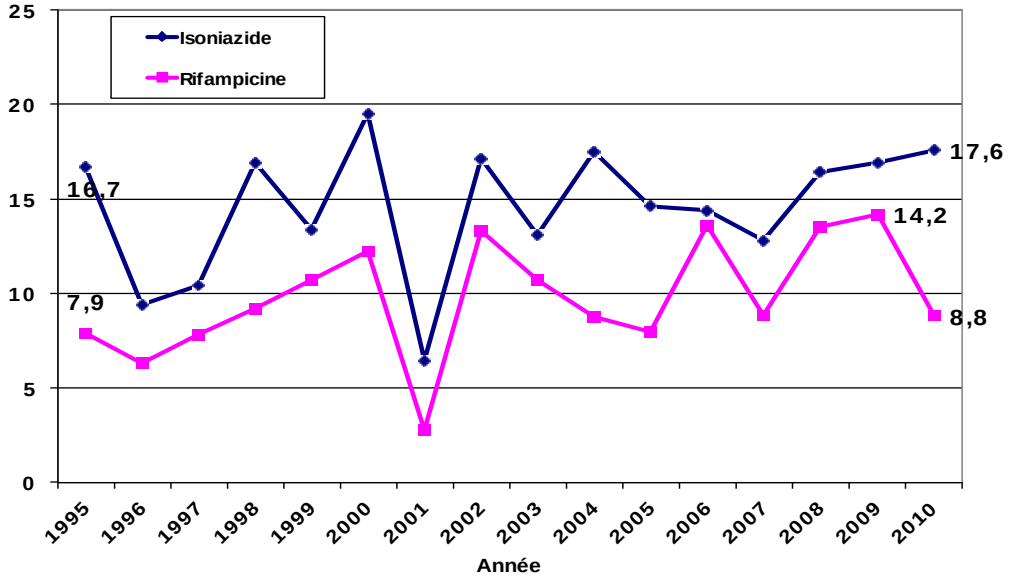


Figure 7 : Résistance à l'isoniazide et la rifampicine chez les cas déjà traités (résistance « secondaire »). Réseau Azay-Mycobactéries 1995-2010

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

Au cours de l'année 2011, le CNR-MyRMA a mené un travail **sur l'exhaustivité du réseau de laboratoires correspondant du CNR-MyRMA**. Pour cela, la liste des laboratoires paticipant au réseau du CNR-MyRMA a été comparée à celle établie dans le cadre d'une enquête menée en collaboration avec l'AFSSAPS lors du contrôle annuel de qualité 2009 envoyé à tous les laboratoires de bactériologie de France. Cette enquête avait permis de recenser, parmi l'ensemble des laboratoires participants au contrôle annuel de qualité, ceux qui déclaraient cultiver les mycobactéries et ceux qui déclaraient faire aussi l'identification et les tests de sensibilité.

En comparant les deux listes, 15 laboratoires ayant déclaré faire l'ensemble des étapes du diagnostic de la tuberculose (microscopie, culture, identification et tests de sensibilité) et 54 laboratoires ayant déclaré faire uniquement la microscopie et la culture et transmettre ensuite les souches à d'autres laboratoires pour identification et tests de sensibilité étaient dans la liste de l'AFSSAPS mais ne faisaient pas partie du réseau du CNR-MyRMA.
Parmi les 15 laboratoires déclarant faire l'ensemble des étapes du diagnostic de la tuberculose, le CNR-MyRMA en a exclu deux (un installé en fait à l'étranger et un installé dans un TOM) et en connaissait en fait 5 autres sous un identifiant différent de celui enregistré dans les listes de l'AFSSAPS. **Les 8 laboratoires restants** ont fait l'objet d'une enquête retrospective concernant l'année 2009 : 4 avaient diagnostiqué, en 2009, 56 cas de tuberculose à culture positive dont un cas MDR et 4 n'avaient diagnostiqué aucun cas. Ce cas MDR était en fait connu du CNR car la souche lui avait été adressée. Il faut noter que parmi ces 8 laboratoires, 2 se sont avérés finalement ne faire ni l'identification ni les tests de sensibilité et 1 ne pas faire les tests de sensibilité.
Parmi les 54 laboratoires déclarant faire uniquement la microscopie et la culture, 1 était en fait connu du CNR-MyRMA sous un identifiant différent de celui enregistré dans les listes de l'AFSSAPS et 40 des 53 autres ont répondu à l'enquête retrospective concernant l'année 2009 : 4 ne faisaient plus les analyses de mycobactériologie et **36 continuaient à en faire**, dont 23 n'avaient diagnostiqué aucun cas et 13 avaient diagnostiqué au total 44 cas à culture positive dont aucun cas MDR.

Ces 44 « nouveaux » laboratoires (8+36) ont été inclus dans l'enquête de 2010 sur les cas MDR pour en améliorer l'exhaustivité et 40 d'entre eux ont répondu. Ceux-ci représentent 13% des 305 laboratoires participant actuellement au réseau du CNR-MyRMA, avaient diagnostiqué au total 100 cas de tuberculose en 2009, cas qui ont été ajoutés à ceux mentionnés dans le rapport de l'an dernier (soit

2,2% du total des cas colligés cette année là) et 83 cas en 2010 (1,9% du total des cas colligés cette année là).

Les résultats de cette enquête d'exhaustivité montrent la bonne couverture du réseau du CNR-MyRMA, avec près de 98% du total des cas colligés en 2009 et 2010 ayant été collectés avant intégration des « nouveaux » laboratoires.

En 2011, le CNR-MyRMA a recueilli, à travers son réseau, des données concernant les cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2010. Comme chaque année, les données ne sont pas tout à fait complètes au moment de rédiger le rapport d'activité (89% de réponse au questionnaire). Les données colligées à ce jour concernent 4315 cas de tuberculose à culture positive.
La région Ile-de-France a diagnostiqué près de la moitié des cas documentés de 2010 (45%) et la région Rhône-Alpes 13%. Chacune des autres régions représentent de 0,3 % (Corse) à 5% (Provence-Côte d'azur) du total des cas.
Comme les années précédentes, **un peu plus de la moitié des cas (53%) de tuberculose documentés en 2010 était concentrée dans les 26 laboratoires dont l'activité est la plus importante (**Figure 8**):**
- 19 laboratoires de CHU (10 d'Ile de France et 9 d'autres régions), un seul ne participant plus au réseau AZAY-Mycobactéries
- 4 hôpitaux généraux d'Ile-de-France et 1 de Cayenne
- 2 gros laboratoires privés.

Malgré la place prépondérante de gros laboratoires, un petit nombre de cas MDR sont identifiés chaque année dans des laboratoires diagnostiquant peu de cas de tuberculose ce qui justifie le gros travail d'exhaustivité mené par le CNR-MyRMA pour intégrer dans le réseau tous les laboratoires du territoire national qui pratiquent la mycobactériologie.

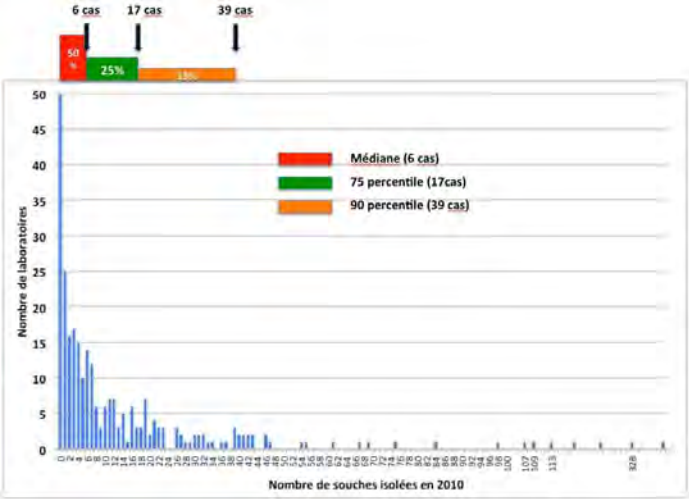


Figure 8 : Distribution des laboratoires du réseau du CNR-MyRMA en fonction du nombre de cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2010

Nombre et proportion de cas de tuberculose à bacilles multirésistants

Le nombre de **cas de tuberculose à bacilles multirésistants** diagnostiqués en France par les 274 laboratoires ayant envoyé leurs données à ce jour était de **48 en 2010**, ce qui représente une proportion de **1,1 ± 0,3%** des 4315 cas colligés (**Tableau 24**).
Parmi ces 48 cas MDR, 5 (10,4%) concernaient des patients déjà identifiés les années précédentes (cas à rechutes) et 43 des patients identifiés pour la 1ère fois en 2010, dont 41 en métropole et 2 dans les DOM.
Le pourcentage de cas MDR (1,1%) calculé sur les 4315 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par l'ensemble des laboratoires français qui pratiquent la mycobactériologie (réseau CNR-MyRMA) est un peu, mais non significativement, inférieur à celui calculé sur les 1473 cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués par les 37 laboratoires universitaires du réseau Azay-Mycobactéries (1,6 ± 0,6%, en cumulant les cas de résistance 1aire et 2aire). Cette légère différence peut être expliquée par le caractère spécialisé des services de pneumologie et d'infectiologie des CHU.

Bien que les données 2010 concernant quelques laboratoires du réseau CNR-MyRMA n'aient pas encore été rassemblées à ce jour malgré de nombreuses relances, il est peu probable que le nombre total de cas multirésistants diagnostiqués en France en 2010 augmente avec les réponses de ces derniers laboratoires car tous les cas correspondants aux souches MDR reçues par le CNR-MyRMA pour confirmation et antibiogramme complémentaire (cf. plus haut « activités d'expertise ») ont déjà été inclus dans l'analyse. La proportion définitive des cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en 2010 pourrait en revanche être très légèrement inférieure à 1,1% après intégration au dénominateur (total des cas de tuberculose à culture positive) des données des derniers laboratoires qui ne concerneront très probablement que des cas de tuberculose non MDR.

Calculée pour chacune des régions de France (**Tableau 23**), la proportion de cas multirésistants rapportée au total des cas de tuberculose bactériologiquement prouvés était en 2010 comprise entre 0 et 4,6%.

Tableau 23 : Distribution régionale des cas de tuberculose à culture positive et des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués en 2010 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	**Total cas**	**Cas MDR**	
		N	**%**
Alsace	77	2	2,6
Aquitaine	176	1	0,6
Auvergne	24	0	0
Bourgogne	53	1	1,9
Bretagne	175	0	0
Centre	69	0	0
Champagne Ardennes	42	0	0
Corse	11	1	(9,1)*
Franche-Comté	35	0	0
Ile de France	1986	24	1,2
Languedoc-Roussillon	91	2	2,2
Limousin	22	0	0
Lorraine	70	0	0
Midi-Pyrénées	85	0	0
Nord-Pas de Calais	179	1	0,6
Normandie Basse	65	3	4,6
Normandie Haute	69	1	1,4
Provence ACA	217	4	1,8
Pays de Loire	110	0	0
Picardie	44	1	2,3
Poitou-Charentes	57	0	0
Rhône-Alpes	549	5	0,9
Départements d'outre-mer	108	2	1,9
Total	**4315**	**48**	**1,1**

* dénominateur très petit

Caractéristiques des cas de tuberculose à bacilles multirésistants

Les caractéristiques des 41 cas de tuberculose MDR diagnostiqués pour la première fois en 2010 en métropole sont les suivantes :
- 61% sont des hommes
- un seul (2,5%) est né en France, et 40 (97,5%) à l'étranger
- parmi ceux nés à l'étranger, 12 sont nés en Afrique sub-saharienne, 3 au Maghreb, 15 en Europe de l'Est, 7 en Asie, et 3 en Europe de l'ouest
- l'âge médian est de 33 ans (15% de 15 à 24 ans et 44% de 25 à 34 ans),
- 10% sont séropositifs pour le VIH, 85% sont séronégatifs et 5% de statut VIH inconnu
- 88% des cas ont une atteinte pulmonaire de leur tuberculose,
- 51% n'ont jamais été traités (MDR « primaire »),
- 49% des cas ont été diagnostiqués en Ile-de-France, dont 27 % à Paris, et 12 % dans la région Rhône-Alpes.

Laboratoires ayant identifié les cas de tuberculose MDR de 2010

La **Figure 8** montre que les cas de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2010 sont dispersés dans de très nombreux laboratoires (au plus 4 cas MDR dans un même laboratoire), même dans des laboratoires qui diagnostiquent peu de cas de tuberculose, ce qui impose d'inclure tous les laboratoires qui pratiquent la mycobactériologie pour pouvoir assurer une surveillance exhaustive des cas MDR.

En effet, les 15 laboratoires qui ont diagnostiqué plus de 50 cas de tuberculose en 2010 (total=1779 cas, 41 % des cas de l'année) ont identifié 21 cas MDR (45 % des cas de l'année). Dix-sept cas MDR ont été diagnostiqués dans les 43 laboratoires ayant diagnostiqué entre 20 et 49 cas de tuberculose et 10 cas MDR ont été identifiés par les 215 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 20 cas, dont 6 par les 169 laboratoires ayant diagnostiqué moins de 10 cas.

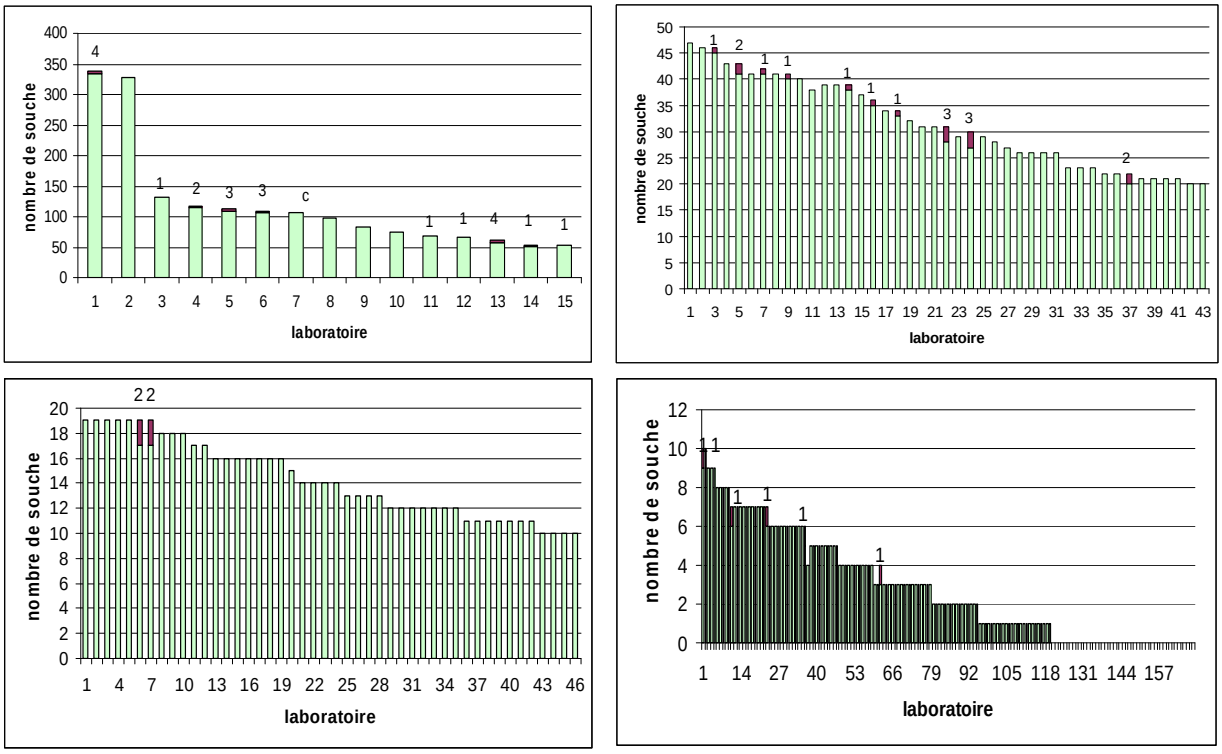


Figure 8 : Distribution des cas de tuberculose MDR diagnostiqués en 2010 selon le nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués dans les laboratoires.

de haut en bas : : les 15 laboratoires ayant diagnostiqué ≥ 50 cas (totalisent 21 cas MDR), les 43 laboratoires ayant diagnostiqué de 20 à 49 cas (totalisent 17 cas MDR), les 46 laboratoires ayant diagnostiqué de 10 à 19 cas (totalisent 4 cas MDR) et les 169 laboratoires ayant diagnostiqué <10 cas (totalisent 6 cas MDR)

En abscisse : les laboratoires classés par ordre décroissant de nombre total de cas de tuberculose diagnostiqués. En ordonnée : nombre total de cas de tuberculose diagnostiqué. Les chiffres au dessus des colonnes et les parties des colonnes colorées en rouge indiquent le nombre de cas MDR diagnostiqués dans le laboratoire.

Tendances évolutives 1992-2010

Le pourcentage de cas multirésistants de 2010 est identique à celui de 2009 et reste supérieur à 1% comme c'est le cas depuis 2002 (à l'exception de 2007). Durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (Tableau 24), le pourcentage de cas MDR parmi l'ensemble des cas de tuberculose à culture positive diagnostiqués en France est passé de 0,4-0,7% entre 1993 et 1998 à 0,9% en 1999-2001 et entre 1,1 et 1,4 % depuis 2002.

Tableau 24 : Nombre de cas de tuberculose à bacilles multirésistants, et proportion parmi le nombre total de cas de tuberculose à culture positive (réseau CNR-MyRMA 1992-2010)

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**	4494	**1,1**	[0,9-1,5]
2010*	**48**	4315	**1,1**	[0,8-1,4]

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

La distribution régionale des cas MDR identifiés par le CNR-MyRMA est restée remarquablement constante durant les années 2006-2010 (Tableau 25), **le nombre annuel de cas restant autour de 25-30 en Ile de France, de 5-6 en Rhône Alpes, de 2-4 en Provence-Côte d'azur et de 0 à 2 dans les autres régions.** Les cas MDR se répartissent d'une manière à peu près égale entre Paris, la région Ile de France en dehors de Paris, et les régions autres que la région Ile de France (Figure 9).

Tableau 25 : Distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants diagnostiqués de 2006 à 2010 par les laboratoires du réseau du CNR-MyRMA

Région	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL
Alsace	2	0	2	1	2	7
Aquitaine	3	0	1	1	1	6
Auvergne	0	0	0	0	0	0
Bourgogne	0	0	0	0	1	1
Bretagne	1	1	2	3	0	7
Centre	0	0	1	0	0	1
Champagne Ardennes	1	0	0	0	0	1
Corse	0	0	3	2	1	6
Franche-Comté	0	0	0	0	0	0
Ile de France	35	28	31	29	24	147
Languedoc-Roussillon	0	1	2	0	2	5
Limousin	0	0	0	0	0	0
Lorraine	2	2	0	0	0	4
Midi-Pyrénées	0	1	0	1	0	2
Nord-Pas de Calais	2	1	1	1	1	6
Normandie Basse	0	1	0	0	3	4
Normandie Haute	2	3	0	0	1	6
Provence ACA	4	1	2	2	4	13
Pays de Loire	2	0	2	2	0	6
Picardie	0	0	1	0	1	2
Poitou-Charentes	1	0	1	1	0	3
Rhône-Alpes	3	5	7	5	5	25
Dép. d'outre-mer	2	0	1	0	2	5
Total	**60**	**44**	**57**	**48**	**48**	**257**

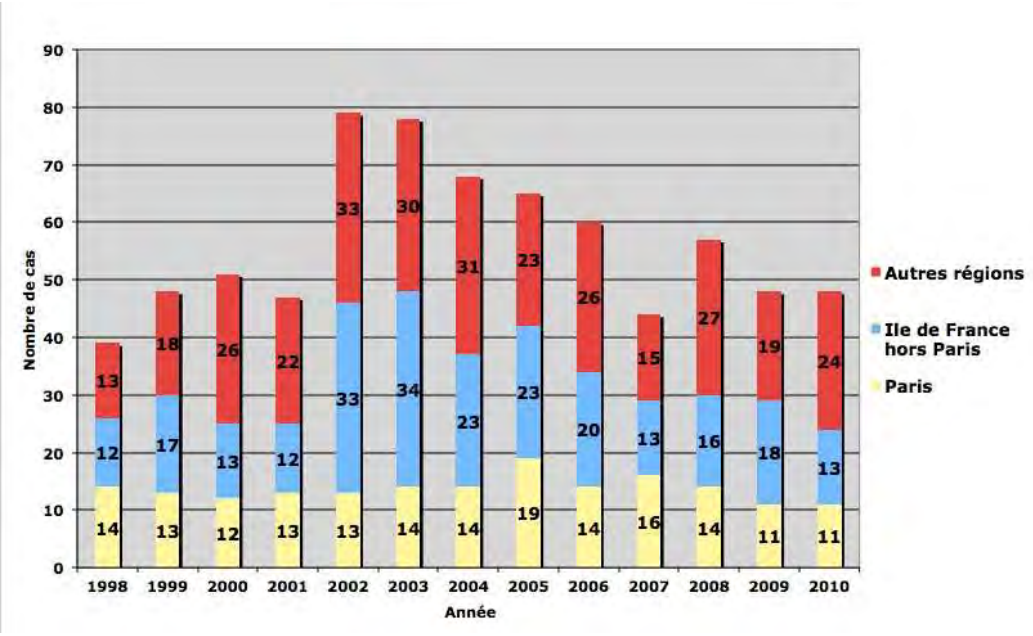


Figure 9 : Evolution de la distribution régionale des cas de tuberculose à bacilles multirésistants selon la région du laboratoire signalant le cas : Paris, Ile de France, autres régions, 1998-2010

Les caractéristiques des cas de tuberculose MDR se sont beaucoup modifiées durant les 19 années de la surveillance menée par le CNR-MyRMA (**Tableau 26**). Il faut noter une **diminution** constante des proportions représentées par les **hommes** (74 à 57%), par **les patients avec antécédents de traitement** (72 à 32%**),** par les **patients séropositifs pour le VIH** (19 à 11%) et par les **patients nés**

en France (48 à 10%). **L'augmentation de la proportion de patients nés à l'étranger (de 52 à 84%) concerne ceux nés en Europe (Europe de l'est et ex-URSS) et en Afrique sub-saharienne.**

Tableau 26 : Principales caractéristiques des cas MDR recensés à travers le réseau de laboratoires du CNR-MyRMA de 2006 à 2010

Caractéristiques	Période			
	1992-1995	**1996-2000**	**2001-2005**	**2006-2010**
N total de cas recensés, dont :	186	192	339	257
- déjà connus CNR-MyRMA*	35 (19%)	38 (20%)	42 (12%)	22 (8%)
- recensés pour la 1ère fois	151 (81%)	154 (80%)	297 (87%)	237 (91%)
Parmi les cas signalés pour la 1ère fois :				
Age médian	39 (16-87)	37 (18-88)	31 (1-95)	32 (1-92)
Sexe masculin	74%	65%	61%	57%
Antécédents de traitement	72%	55%	39%	32%
Atteinte pulmonaire	92%	94%	90%	86%
Séropositif pour le VIH	19%	19%	17%	11%
Né à l'étranger, dont :	52%	62%	79%	84%
- Europe	3%	10%	13%	34%
- Maghreb	15%	17%	17%	10%
- Afrique sub-saharienne	20%	23%	35%	41%
- Autres	14%	12%	14%	15%
Examen microscopique (+)	56%	63%	62%	52%
Résistance à l'éthambutol	34%	30%	32%	46%
Résistance à la streptomycine	55%	56%	63%	71%

* aucune information n'a pu être recueillie pour certains malades

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

Le CNR-MyRMA a réalisé tous les 5 ans depuis 1990 (1990, 1995 et 2000) une enquête sur la méningite tuberculeuse à culture positive tous âges confondus. Une nouvelle enquête a été menée rétrospectivement sur les cas diagnostiqués en 2006 et en 2007, au moment des modifications de l'obligation vaccinale en France. A ce jour, après élimination des doubles déclarations, **le CNR-MyRMA a recensé 40 cas de tuberculose méningée à culture positive en 2006 et 28 cas en 2007** (total 68 cas). Des informations ont pu être réunies pour 39 des 40 cas de 2006 et tous les cas de 2007.

L'analyse des caractéristiques des 68 cas montre que l'âge moyen est de 48 ans, 54% sont des femmes, que 50% des patients sont nés en France, et 10% sont séropositifs pour le VIH. Parmi les 7 séropositifs pour le VIH, 6 sont nés à l'étranger.
Parmi les 68 cas, **3 concernaient des enfants de moins de 5 ans : 2 en 2006 et 1 en 2007**. Ces 3 patient sont nés en France dont un dans un département d'outre mer et pour lequel de nombreuses informations sont manquantes. Les deux enfants de métropole ne semblent pas avoir été vaccinés par le BCG et ont été traités pendant un an au total.

Les données concernant les cas de 2007 ont été croisées avec celles concernant les 85 cas recensés par l'InVS cette même année dans le cadre de la notification obligatoire de la tuberculose pour permettre une analyse de capture-recapture, comme nous avions fait pour les cas de 2000. A ce jour, peu de cas communs ont été identifiés avec certitude en raison de l'anonymisation des données de la notification obligatoire au moment de la constitution du fichier de l'InVS.
L'accord de la CNIL a été obtenu en 2010 pour lever l'anonymat et retourner aux données nominatives disponibles au niveau des Agences régionales de Santé (ARS, ex-DDASS). Le long travail qui consiste à croiser une à une les fiches de notification obligatoire avec celles du CNR-MyRMA a commencé (cf. projet).

Parce que le nombre de cas de méningite tuberculeuse chez les enfants de 5 ans et moins constitue un des indicateurs proposés par l'International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) pour juger de la possibilité d'arrêt de la vaccination par le BCG, il a été décidé de recueillir cet indicateur chaque année depuis 2000. Pour cela, le CNR-MyRMA a entrepris une **enquête rétrospective concernant les cas à culture positive diagnostiqués chez les enfants de ≤ 5 ans** à travers son réseau.

Le **Tableau 27** présente l'état actuel des données recueillies au CNR-MyRMA. Il **ne semble pas y avoir de tendance à la hausse du nombre de cas** (**0 à 3 cas par an)** mais le recueil retrospectif d'information auprès des cliniciens pour 2010 est n'est pas achevé.

Tableau 27 : Nombre de cas de méningite à culture positive diagnostiqués chez des enfants de moins de 5 ans par les laboratoires du réseau CNR-MyRMA de 2000 à 2010

Année	N cas
2000	1
2001	0
2002	2
2003	0
2004	1
2005	1
2006	2
2007	1
2008	3
2009	1
2020	En cours

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

Les données réunies par le réseau Azay-Mycobactéries sur la résistance primaire et secondaire du bacille tuberculeux sont envoyées 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.
Depuis 2008, le CNR-MyRMA utilise en routine la technique MIRU-VNTR 24 loci pour le génotypage de *M.tuberculosis*. En 2009, nous avons donc pu intégrer le groupe de travail Européen MIRU-VNTR et participer à la mise en place du projet « Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in Europe », conjointement coordonné par le European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) et le National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Pays-Bas). L'objectif du projet est d'établir une action concertée de surveillance moléculaire des souches MDR circulant en Europe basée sur la technique MIRU-VNTR, de définir les conditions de standardisation de la technique afin d'en augmenter la reproductibilité, et de créer une base de données permettant l'échange des résultats. Au total, 30 pays participent au projet. Dans le cadre de ce programme, le CNR-MyRMA a également participé aux deux premiers contrôles de qualité européen de génotypage MIRU-VNTR (cf. supra).

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

En 2011, le CNR-MyRMA a été sollicité pour réaliser, en complément d'enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain, le génotypage (empreintes digitales génomiques) de 118 souches de *M.tuberculosis* non MDR et 64 souches MDR (total : 182 souches).

Le contexte épidémiologique des demandes de génotypage de *M.tuberculosis* complex peut être regroupé de la manière suivante :

- suspicion 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 DDASS et les Services de lutte antituberculeuse (SLAT),
- suspicion de rechutes (comparaison de plusieurs souches d'un même patient),
- suspicion de contamination de laboratoire,
- étude systématique des souches des cas de tuberculose à bacilles multirésistants, étude qui permet de participer au programme Euro-TB.

Complément bactériologique des enquêtes épidémiologiques « autour d'un cas »

En 2011, 73 souches ont été génotypées dans cette indication dont 1 analysée à la fois pour suspicion de transmission dans un établissement de soin entre 2 malades et entre 1 malade et 1 soignant.

22 situations de suspicion de transmission en collectivité (65 cas) (**Tableau 28)** :
Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas dans 17 situations et, au total, pour 44 des 65 cas. Les 17 situations comportaient chacune de 2 à 5 cas bactériologiquement reliés :
- 4 fois au sein de familles (4 fois 2 cas liés)
- 3 fois au sein d'une école (1 cas relié à 4 cas liés de 2010 ; 2 et 3 cas liés)
- 1 fois au sein de 2 foyers d'accueil du SAMU social (3 cas liés)
- 9 fois dans un contexte amical et de travail (4 fois 2 cas liés, 2 fois 3 cas liés, 2 fois 4 cas liés et 1 fois 5 cas liés).

4 situations de suspicion de transmission nosocomiale (8 cas) (**Tableau 28)** :
Le génotypage a permis de confirmer la relation entre les cas pour 2 des 4 situations (au total pour 4 des 8 cas) : avec à chaque fois 2 cas liés :
- 2 cas liés chez des malades immunodéprimés (greffés pulmonaires / mucoviscidose) des Hospices civils de Lyon. Ces 2 cas n'ont cependant pas été reliés à d'autres épisodes dans ce même service totalisant 5 cas en 2010, et ils constituent donc un 3ème évènement distinct de transmission
- 2 cas liés dans une situation de transmission malade→soignant à l'hôpital Necker.

Tableau 29 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* complex reçues au CNR-MyrMA en 2011, classés selon le contexte épidémiologique

Contexte	N cas suspects	N cas reliés bactériologiquement
Entreprise	2	2
	2	0
Famille	2	2
	2	2
	2	2
	2	2
Ecole d'ingénieur	1	1 (relié aux 4 cas de 2010)
Ecole-quartier	4	3
Ecole	2	2
	2	0
Communautaire (amis)	5	5
	4	4
	7	4
	5	3
	3	3
	2	2
	2	2
	2	2
	2	0
	2	0
Foyer de travailleurs migrants	5	0
Samu social (2 sites)	5	3
Malade-->soignant (Necker)	2	2
	2	0
Malade-->malade (Lyon sud)	2	2
	2	0
Total	73	48

Tendances évolutives 2006-2011

Comme le montre le **Tableau 29**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage de 2006 à 2011, en complément des enquêtes épidémiologiques menées sur le terrain par les CLAT et CCLIN :
- 6 à 17 épisodes confirmés de cas groupés en collectivité par an, soit 74 épisodes en 6 ans totalisant 198 cas (2 à 10 cas par épisode).
- 1 à 5 épisodes confirmés de cas groupés en milieu de soins, soit 19 épisodes en 6 ans totalisant 46 cas (2 à 7 cas par épisode).

Tableau 29 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques en collectivité et en milieu de soin : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2011 (nombre d'enquêtes, de cas suspects et de cas confirmés après génotypage).

	Collectivités et familles	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
Total	**107 enquêtes (total : 288 cas suspects) 74 épisodes confirmés : total 198 cas, 2 à 5 cas/épisode**	**34 enquêtes (total 100 cas suspects) 19 épisodes confirmés : total 46 cas, 2 cas/épisode**

Suspicions de rechute

En 2011, le CNR-MyrMA a reçu les souches de 6 patients suspects de rechute de tuberculose pour génotypage. Dans 3 cas la rechute a été confirmée (souches identiques).

Suspicion de contamination de laboratoire

Nous avons reçu 40 souches (dont 2 souches déjà comptabilisées ci-dessus dans le cadre des enquêtes autour d'un cas) correspondant à 15 épisodes de suspicion de contamination de laboratoire. Pour 9 de ces 15 épisodes, le génotypage a confirmé la contamination de laboratoire (souches non distinguables). Ces 9 épisodes totalisaient 25 souches, par groupes de 2 souches (5 groupes), de 3 souches (2 groupes), de 4 souches (1 groupe) et 5 souches (1 groupe).

Tendances évolutives 2006-2011

Comme le montre le **Tableau 31**, le CNR-MyRMA a identifié par génotypage de 2006 à 2011 :
- 0 à 5 cas confirmés de rechute par an, soit 12 cas en 6 ans.
- 5 à 19 épisodes confirmés de contamination de laboratoire par an soit 62 épisodes en 6 ans, totalisant 177 cas (2 à 8 cas par épisodes).

Tableau 30 : Résultats du génotypage des souches de *M.tuberculosis* dans le cadre des suspicions de rechutes de tuberculose et de suspicions de contaminations de laboratoire : études menées par le CNR-MyRMA de 2006 à 2011

	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
Total	**14 suspicions** **12 confirmations**	**92 enquêtes (total : 40 souches)** **62 épisodes confirmés :** **total 177 cas, 2 à 5 cas/épisode**

Souches multirésistantes

Nous avons en 2011 analysé 67 souches MDR par la technique du MIRU-VNTR 24 loci (les 3 souches supplémentaires par rapport à celles signalées dans le chapitre « tests de sensibilité » sont des souches connues pour lesquelles les antibiogrammes n'ont pas été refaits). L'analyse des résultats révèle l'existence de 8 clusters de souches pour un total de 24 souches (36%) partageant des codes MIRU 24 identiques. La majorité de ces souches (n=14, 58%) sont rattachés à la lignée Beijing. Les autres clusters sont rattachés aux lignées Ghana (2 souches), Delhi/CAS (2 souches), « nt » rattaché à Haarlem (2 souches), « nt » rattaché à URAL (2 souches), et LAM (2 souches) **(Tableau 31).**

Clusters rattachés à la lignée Beijing :
Cluster 2 : 5 souches
L'identité des codes MIRU est probablement liée à l'origine géographique commune des patients (Arménie et Tchétchénie). En effet le phénotype et/ou le génotype de résistance n'était pas le même pour ces souches ce qui n'est pas en faveur d'une transmission récente en France.
En 2010, 5 souches appartenant au cluster 2 ont été identifiées mais il n'y avait pas d'arguments en faveur d'une transmission récente en France.

Cluster 5 : 7 souches dont 3 sont reliées par l'enquête de terrain, et pour lesquelles le lien épidémiologique est évident. Les 7 patients sont originaires de Tchétchénie, Arménie, Georgie et Russie. En 2010, une seule souche appartenant à ce cluster a été identifiée. Parmi les souches non familiales, le phénotype et/ou le génotype de résistance n'était pas le même pour ces souches ce qui n'est pas en faveur d'une transmission récente en France.

Cluster 11 : 2 souches. Un patient est originaire de Mongolie, l'autre est né en France. En 2010, 4 souches appartenant à ce cluster ont été identifiées. Hormi les deux souches issues du même patient en 2010 et 2011 le phénotype et/ou le génotype de résistance n'était pas le même pour ces souches ce qui n'est pas en faveur d'une transmission récente en France.

On note qu'une souche Beijing isolée en 2011 partage un code MIRU identique avec une souche isolée en 2010. Le phénotype et/ou le génotype de résistance n'était pas le même pour ces souches ce qui n'est pas en faveur d'une transmission récente en France.

Cluster de souches rattachées à la lignée Ghana : 2 souches
Le phénotype et/ou le génotype de résistance n'était pas le même pour ces souches ce qui n'est pas en faveur d'une transmission récente en France.

Cluster de souches rattachées à la lignée Delhi/CAS :
Les deux souches correspondent à une transmission d'un patient à un personnel soignant à l'hôpital de Gonesse et qui a fait l'objet d'une déclaration comme maladie professionnelle.

Cluster de souches « non typables» mais proche de la la lignée Haarlem :
Les deux souches correspondent à une transmission en Algérie au sein d'une meme famillle. Une troisième souche issue de cette famille devrait venir s'ajouter à ce cluster.

Cluster de souches « non typables» mais proche de la la lignée URAL :
Ces 2 souches correspondent possiblement à une transmission entre un patient adulte et un enfant mais nous n'avons pas eu de confirmation formelle.

Clusters de souches rattachées à la lignée LAM :
On note qu'une troisième souche, isolée en 2010, se rattache à ce cluster. Une des deux souches présente un lien épidémiologique avec le cas de 2010 mais la durée de contact semble avoir été très courte (<1h). Le second cas de 2011 est probablement lié aussi au cas de 2010 compte tenu de la proximité géographique mais le lien épidémiologique n'a pas pu être établi.

La **répartition des lignées des souches MDR reçues en 2011 selon le pays de naissance des patients (Tableau 31)** montre la nette prédominance des souches isolées de patients nés en Europe Centrale et Europe de l'Est (n=25, 37%) : Roumanie (n=6), Moldavie (n=1), Russie (n=7), Tchétchénie (n=4), Georgie (n=4), Arménie (n=3). On note également une proportion élevée de souches isolées de patients originaires de pays d'Afrique (n=14) et d'Afrique du Nord (n=4). Huit patients étaient originaires de France. Seul 1 patient était originaire de Chine, et un autre de Mongolie.

Analyse des données 2006-2011 cumulées, tendances évolutives

La nette prédominance des souches appartenant à la lignée « Beijing » observée en 2010 (au total, 19 souches Beijing pour 45 souches MDR analysées, soit 42%), semble s'atténuer en 2011 (au total, 23 souches Beijing, soit 34%).

Tableau 31 : Evolution de 2006 à 2011 du nombre de souches MDR rattachées à une lignée donnée (en jaune, lignées appartenant à la superfamille East African Indian, et en bleu à la superfamille Euro-American)

Lignée	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Groupe PGG1							
EAI	2	1	0	0	0	0	**3**
CAS-DELHI	0	0	0	1	0	3	**4**
Beijing	11	9	15	17	19	23	**94**
West African 2	1	1	0	0	0	0	**2**
West African 1	0	0	0	0	0	1	**1**
Canettii	1	0	0	0	0	0	**1**
Groupe PGG2							
Haarlem	5	0	2	2	2	3	**14**
LAM	5	7	3	3	4	8	**30**
URAL	4	0	2	1	0	1	**8**
TUR (Ural)	1	0	0	1	0	0	**2**
Cameroon	2	2	3	1	3	1	**12**
Ghana (T1)	4	1	5	6	2	3	**21**
T1-T2-T3 et « nt »	19	14	18	19	12	19	**101**
Divers							
S	2	2	3	1	3	3	**14**
NEW-1	0	0	0	0	0	1	**1**
Bovis	0	0	0	0	0	1	**1**
Total	**57**	**37**	**51**	**52**	**45**	**67**	**303**

Le **Tableau** 32 résume les cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement parmi les 305 souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011, identifiés grâce au génotypage systématique. Au total, 15 épisodes regroupant 33 cas ont été identifiés depuis 2006. Tous ces cas reliés étaient en rapport avec des environnements familiaux ou de milieu de travail « clos et étroit » (bar).

Tableau 32 : Résultats du génotypage systématique des souches de *M.tuberculosis* multirésistantes (MDR) reçues au CNR-MyRMA de 2006 à 2011 : cas reliés bactériologiquement et épidémiologiquement

	N	Cas reliés*(contexte, pays de naissance)
2006	53	1 épisode de 2 cas (famille, Roumanie)
2007	38	1 épisode de 4 cas (famille + voisins, Portugal) 1 épisode de 2 cas (famille, Cameroun)
2008	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)**
2009	51	1 épisode de 2 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Côte d'Ivoire)
2010	45	1 épisode de 1 cas (famille + milieu travail, Corse)** 1 épisode de 2 cas (famille, Tibet) 1 épisode de 2 cas (famille, Mongolie) 1 épisode de 2 cas (famille, Viet-nam)
2011	67	1 épisode de 3 cas (famille, Arménie) 1 épidose de 2 cas (malade vers soignant, France) 1 épisode de 3 cas (famille, Algérie) 1 épisode de 2 cas possible (famille, Roumanie) 1 épisode de 2 cas possibles (contact occasionnel, France)
Total	**305**	**15 épisodes regroupant 33 cas**

* sur la base des empreintes digitales génomiques (méthodes : RFLP ou MIRU 24 loci, mutations conférant la résistance).
** en fait, 1 même épisode de 5 cas (famille et milieu de travail clos et étroit) étalés, sur 3 ans.

4. Alertes

4.1. Alertes et enquêtes menées avec les autorités sanitaires

En 2011, le CNR MyRMA a participé avec les autorités sanitaires à 4 enquêtes ponctuelles, dont 2 sur des cas de tuberculose et 2 sur des cas d'infections à mycobactéries atypiques liées aux soins.
Les enquêtes ponctuelles sont décrites brièvement ci-dessous pour les cas de tuberculose et résumées avec la synthèse 2006-2011 pour les infections à mycobactéries atypiques.

4.2. Alertes et enquêtes 2011 sur des cas de tuberculose

Rapport 2011
- Participation à une réunion téléphonique organisée par la DGS pour la gestion du dépistage dans une école d'ingénieurs d'Ivry-sur-Seine faisant suite à 9 cas de tuberculose depuis 2009.
- Participation à une réunion à la direction générale de l'alimentation sur la lutte contre la tuberculose bovine.
- Suite de l'épidémie de tuberculoses nosocomiales à bacilles sensibles en pneumologie survenue en 2009 et 2010 dans les hospices civils de Lyon : typage des souches confirmant la transmission à des patients greffés pulmonaires (cf. § génotypage) et participation aux conférences téléphoniques organisées par la DGS et le CCLIN Sud-Est.
- Signalement à l'InVS en juin 2011 de la confirmation de l'augmentation du nombre de cas de TB MDR (confirmation du signalement de décembre 2010).

4.3. Alertes et enquêtes 2011 sur des cas d'infection à mycobactérie atypique, bilan 2006-2011

- Réponse à une demande de conseils techniques de l'InVS sur de possibles endocardites à *M. chelonae* dues à des valves possiblement contaminées.
- Signalement à l'InVS de deux cas d'infection du site opératoire à *M. magaritense* survenus à quelques mois d'intervalle au CH d'Hagueneau. Le génotypage a prouvé l'identitié des deux souches en cause. L'enquête est toujours en cours.

Tableau 33 : Bilan retrospectif 2001-2011 des cas documentés d'infections à mycobactéries atypiques liées aux soins

Geste	Chirurgical	Non chirurgical
Thérapeutique	**14 cas** *4 M. xenopi, 1 M. intracellulare* *5 M. fortuitum, 1 M. goodii* *1 M. wolinskyi, 2 M. mageritense*	**5 cas** *3 M. chelonae, 2 M. avium*
Esthétique	**7 cas** *3 M. chelonae, 4 M. abscessus*	**40 cas** *40 M. chelonae,* *2 M. frederiksbergense* (n.b. 2 cas d'infection à 2 espèces ≠)
Total	**19 cas**	**45 cas**

A partir des données ainsi réunies, nous avons dressé un bilan détaillé pour la mandature 2006-2011 des infections pour lesquelles nous avons apporté notre expertise bactériologique (travail sur les souches) et participé à des enquêtes ponctuelles (**Tableaux 33 et 34**) :

- Les 6 cas survenus après des actes chirurgicaux à visée thérapeutique étaient des infections du site opératoire (prothèse ilio-fémorale, implant cochléaire) à *M.fortuitum* en 2006, 2 cas d'infection à *M.xenopi* après arthroscopies en 2010 et 2 cas d'infection de matériel orthopédique à *M. mageritense* en 2011.
- Les 3 cas survenus en 2008, 2009 et 2010 après des actes thérapeutiques non chirurgicaux étaient des infections à *M.chelonae* avec atteinte cutanée (3 cas) et osteo-articulaire (2 cas) chez des patients hémodialysés.
- Le cas de chirurgie dite esthétique de 2010 correspond à une infection cutanée à *M.fortuitum* sur prothèse mammaire.
- Les cas succédant à un geste esthétique sont des infections à *M.chelonae ou M.frederiksbergense* survenus dans un contexte de mésothérapie (2 épidémies, l'une en 2007 et l'autre en 2009), de cryothérapie (1 épidémie en 2008) ou de scléroses de varices (1 épidémie en 2010).

Tableau 34 : Bilan 2006-2011 des infections à mycobactéries atypiques liées aux soins connues du CNR-MyRMA (entre parenthèses : cas documentés microbiologiquement)

Cas d'infection	2006	2007	2008	2009	2010	2011
cas liés à un geste chirurgical thérapeutique	2 (2)				2 (2)	2 (2)
cas liés à un geste thérapeutique non chirurgical			1 (1)	1 (1)	1 (1)	
cas liés à un geste chirurgical esthétique					1 (1)	
cas liés à un geste esthétique non chirurgical		16 (14)	8 (1)	7 (2)	1 (1)	
Nb de cas totaux	**2 (2)**	**16 (14)**	**9 (2)**	**8 (3)**	**5 (5)**	

5. Activités d'information, de formation et de conseil

5.1. Information

De 2006 à 2011, le site internet **http://cnrmyctb.free.fr** a été régulièrement mis à jour pour :
- la fiche d'information à fournir au CNR-MyRMA en cas de demande d'expertise bactériologique (identification, tests de sensibilité aux antibiotiques, génotypage…),
- les 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,
- les résultats annuels de la surveillance de la tuberculose multirésistante et de la résistance primaire et secondaire,
- les nouvelles publications du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des rapports d'activité du CNR-MyRMA,
- la mise en ligne des diapositives des formations organisées ou co-organisées par le CNR-MyRMA.

5.2. Formation

Accueil de stagiaires

En 2011, le CNR-MyRMA a accueilli les stagiaires suivants :

A la Pitié :
- deux stages de 8 semaines de Master 1 : Marine Vallet (master Biologie-Santé – UPEC), Diane Amy de la Breteque (master infectiologie-immunologie, Paris 5)
- trois stages de 6 mois de master 2 : Hélène Ferrand (master 2IMVI, Microbiologie, parcours Bactériologie Moléculaire et Médicale, Paris 5, 6,7), Aurélie Bouige (master 2IMVI, Microbiologie, parcours Bactériologie Moléculaire et Médicale, Paris 5, 6,7), Aurélie Fillion (Master Médicaments et autres produits de santé, mention Biolobie cellulaire, microbiologie et innovations thérapeutiques).
- 1 stage de deux jours dans le cadre du DIU tuberculose : Maude Clement

n.b. le nombre de stagiaires techniques à la Pitié a été réduit du fait d'une longue période de travaux pour l'installation d'un autoclave à double entrée dans le P3.

A Lariboisière :
- 1 stage d'une semaine de Josiane Djieugoue, technicienne dans le laboratoire de mycobactériologie du Centre Pasteur du Cameroun (Yaoundé)

Enseignement sur les mycobactéries et la tuberculose

Master M1 Santé «Microbiologie Médicale et Moléculaire », Universités Paris 6 et Paris 7
Master M1 « Santé Internationale et Pathologie Tropicale », Paris 6
Master M1 mention « Sciences technologie santé », UE Immunologie, Paris 12
Master M2 « Médicaments et autres produits de santé, écologie microbienne pathogénie des microorganismes et anti-infectieux », Paris 11
Master M2 « Microbiologie », Paris 6

DU Antibiotiques et Antibiothérapie, Université Paris 7
DIU Dermatologie infectieuse et tropicale, Université Paris 6,
DIU Antibiologie, Université Tours-Poitiers
DIU Antibiologie, Université Nice Sophia-Antipolis
DIU Stratégie thérapeutique en Pathologie Infectieuse, Université Paris 5 et 7
DIU Chimiothérapie des infections nosocomiales, Université Paris 11 et 12
DIU médecine tropicale – santé internationale
DIU Pathologies Infectieuses de la femme enceinte, du fœtus et du nouveau né, Université Paris 11
DIU « tuberculose », Université Pierre et Marie Curie, Université Libre de Strasbourg
DES Biologie Médicale, Université de Paris
DESC Maladies Infectieuses et Tropicales

Co-organisation avec l'InVS et DGS de la journée du 24 mars 2011

- Définition du programme
- Présentation faite par N. Veziris : rappels sur le bacille et les outils disponibles. Journée nationale d'information sur la tuberculose organisée par la Direction Générale de la Santé, l'Institut de veille sanitaire et le Centre national de référence des mycobactéries – Paris, 2011

5.3. Activités de conseil

Conseils thérapeutiques pour la prise en charge des infections à mycobactéries résistantes

Sur les 69 patients atteints de tuberculose à bacilles multirésistants identifiés en 2011, 52 ont fait l'objet de conseils thérapeutiques et de prise en charge par le CNR-MyRMA.
Parmi ces 52 patients, 35 ont fait l'objet d'une analyse approfondie du dossier médical et bactériologique au sein du « Groupe Thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes» mis en place en 2003 par Nicolas Veziris, pneumologue et bactériologiste du CNR-MyRMA. Les 17 autres nouveaux cas MDR de 2011, plus simples ou pris en charge par des équipes plus expérimentées, ont fait l'objet de conseils thérapeutiques par relation directe entre Nicolas Veziris et les cliniciens en charge des malades.

Onze réunions du « Groupe Thérapeutique » ont été organisées en 2011 :
- un total de 79 dossiers ont été discutés durant ces réunions : 35 cas de tuberculose MDR de 2011, 1 dossier de sujet contact de cas de l'année 2009, 40 dossiers de tuberculose MDR des années précédentes (analyse de l'évolution sous traitement), 3 cas de tuberculose compliquée.
- Selon leur complexité, les dossiers ont été examinés lors de 1 à 7 réunions (médiane = 2).

En 2011, les participants réguliers aux réunions du « Groupe Thérapeutique » étaient :
- l'équipe du CNR-MyRMA,
- 2 praticiens du Centre Médical de Bligny (Mathilde Jachym, Nathalie Methivier),
- 1 pédiatre de l'hôpital trousseau (Katarina Chadelat),
- 2 pneumologues (Bertrand Dautzenberg Pitié-Salpêtrière, Claire Andrejak Amiens),
- 1 membre du SAMU social de Paris (Benedicte Rivoire)

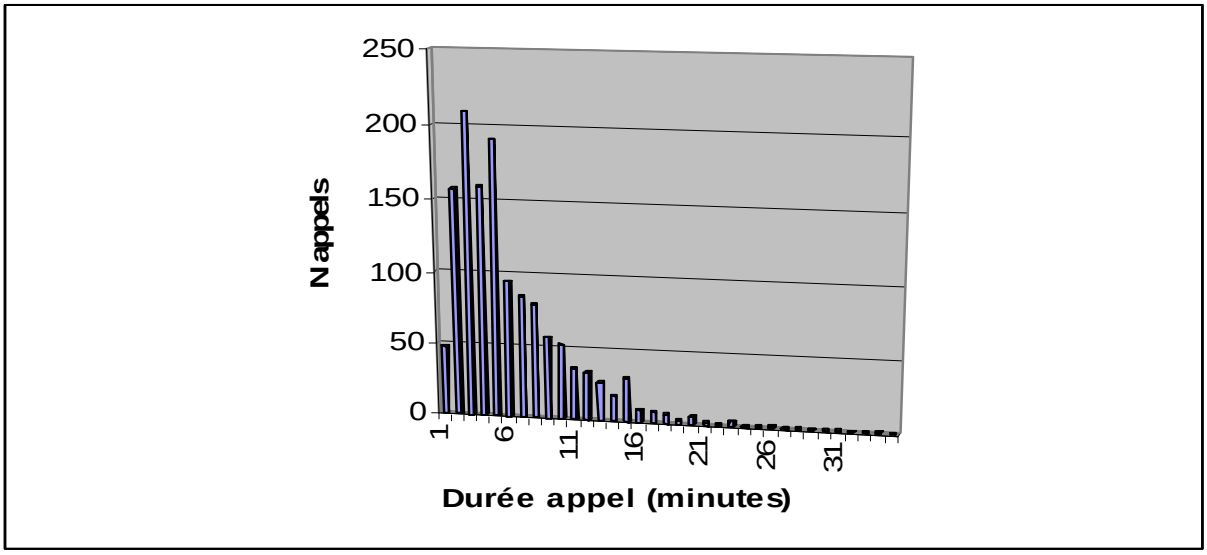
L'activité du « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries résistantes» a continué à augmenter en 2011 comme le montre le **Tableau 35**.

Tableau 35 : Activités de conseil assurées par le « Groupe thérapeutique des infections à mycobactéries difficiles à traiter » du CNR-MyrMA de 2004 à 2011

	N réunions de travail	N dossiers examinés	Types de dossiers
2006	5	11	- 2 cas XDR 2006 - 9 cas MDR 2006 (1 grossesse)
2007	5	13	- 2 cas XDR 2007 - 8 cas MDR 2007 (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 non MDR compliquées - 1 prophylaxie contacts MDR - 1 mycobactériose
2011	11	70	- 27 cas MDR 2011 - 40 cas MDR 2009-10 (suivi) - 3 cas tuberculose non MDR compliquées

Appels téléphoniques et e-mails pour conseils

Les appels téléphoniques et e-mails reçus au CNR-MyRMA pour demande de conseils ont été systématiquement comptabilisés sur support informatique.
Durant l'année 2011 il y a eu 1344 appels ou e-mails d'une durée médiane de 1 à 100 minutes.



Les motifs des demande de conseils sont listés ci-dessous (plusieurs motifs peuvent être abordés durant un même appel) :

Motif de la demande de conseil	N appels
conseils techniques	140
problème diagnostique	364
Demande de conseils sur les résultats	145
traitement tuberculose MDR	347
traitement mycobactériose	281
traitement tuberculose compliquée non MDR	157
Total	**1434**

La durée totale de ces appels et ou des réponses aux mails a été de 8583 minutes soit 143 heures. Extrapolée sur l'année cette durée représente **un mois d'équivalent temps plein de médecin.**

Conseil et expertises auprès des autorités sanitaires nationales et européennes

Autorités sanitaires nationales

- Vincent Jarlier, Emmanuelle Cambau et Nicolas Veziris ont participé en 2011 à la finalisation des travaux de plusieurs groupes de travail du plan national Tuberculose du Ministère de la santé : (a) Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma, (b) Enquête autour d'un cas de tuberculose, (c) Recommandations de dépistage et de prise en charge des Infections Tuberculeuses Latentes.

Autorités sanitaires internationales

- Vincent Jarlier, Emmanuelle Cambau ont participé au travail du réseau de laboratoires nationaux de référence « Mycobactéries-Tuberculose » de la communauté européenne (ERLN-TB) créé sous l'égide de l'ECDC : 2ème workshop janvier 2011 à Londres.

- Le manuel de techniques « Tuberculosis handbook » pour lequel Vincent Jarlier et Emmanuelle Cambau ont participé à la rédaction de 3 chapitres a été publié par l'ECDC en 2011.

- Emmanuelle Cambau a participé à la 4ème réunion du réseau OMS « Surveillance de la résistance dans la lèpre » (Hyderabad, août 2011). Elle était chairman de cette réunion faisant le bilan de la 3eme année. Elle y a fait deux présentations orales.

7. Publications et communications 2011

7.1. Publications nationales

1. N. VEZIRIS, AUBRY A., ROBERT J., CAMBAU E., JARLIER V., TRUFFOT-PERNOT C. Chapître «Mycobactéries ». Dans "l'Antibiogramme, 3e edition, Ed ESKA. 2011.
2. C. TRUFFOT-PERNOT, VEZIRIS N. Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives. Revue des Maladies Respiratoires, 2011.
3. N. VEZIRIS, F. ANTOUN, Gestion des tuberculoses multirésistantes. Revue des Maladies Respiratoires, 2011.
4. LERAT I, TRUFFOT C, VEZIRIS N. Infections à Mycobacterium abscessus : épidémiologie, aspects cliniques et traitement. Journal des Anti-infectieux (2011) 13, 49-55.
5. L. Marsollier, A. Aubry, E. Carbonnelle, S. Canaan, E. Cambau, J-L. Herrmann. Les Mycobactérioses cutanées dues à *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* et autres mycobactéries non tuberculeuses, dans l'"Encyclopédie Médico-chirurgicale", edition,. 2011
6. Prevotat A, Bonne S, Veziris N, Senneville E, Yazdanpanah Y, Legout L. Mycobacterium abscessus pulmonary infection treated with tigecyclin-amikacin and cefoxitin in a diabetic patient. Med Mal Infect. 2011 Aug;41(8):446-8.
7. Couderc C, Carbonne A, Thiolet JM, Brossier F, Savey A, Bernet C, Ortmans C, Lecadet-Morin C, Coudière I, Aggoune M, Astagneau P, Coignard B, Cambau E. [Non-tuberculous mycobacterial infections related to esthetic care in France, 2001-2010.] Med Mal Infect. 2011, 41(7):379-83.
8. F. Brossier. Mécanismes d'action et de résistance de l'isoniazide, un antituberculeux de première ligne. Journal des Anti-infectieux, 13(4) :217-227. December 2011.
9. Rapport d'activité 2009-10 de l'ONERBA / Annual Report 2009-10 (Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques). Vivactis Plus 2011. 188 pages ISBN 978-2-916641-53-9 (http://www.onerba.org)
10. B. CRIBIER, AUBRY A., CAUMES E., CAMBAU E., JARLIER V., CHOSIDOW O. Histopathological study of *Mycobacterium marinum* infection. Ann Dermatol Venereol. 2011 Jan ; 138(1) : 17-22.
11. E. Cambau. Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma ou diagnostic indirect de l'infection tuberculeuse. La lettre de l'UFR,(Septembre 2011) rubrique « Innovation médicale & scientifique », Université Paris Diderot, UFR de médecine

7.2. Publications internationales

1. Mohamed Ashraf Ali, Sylvaine Bastian, Rusli Ismai, Tan Soo Choo, Sadath Ali, Alexandra Aubry, Suresh Pandian, Pankaj Saraswat, Abhimanyu Singh and Ramakant Gaur. Discovery of novel methanone derivatives acting as antimycobacterial agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2011, Dec;26(6):890-4
2. Pantel A, Petrella S, Matrat S, Brossier F, Bastian S, Reitter D, Jarlier V, Mayer C, Aubry A. DNA gyrase inhibition assays are necessary to demonstrate fluoroquinolone resistance secondary to *gyrB* mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Oct;55(10):4524-9
3. S. Bastian, VEZIRIS N., ROUX A.L., BROSSIER F., GAILLARD J.L., JARLIER V., CAMBAU E. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by *erm(41)* and *rrl* sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81.

4. M. TOCHON, BOSDURE E., SALLES M., BELONCLE C., CHADELAT K., DAGORNE M., GAUDELUS J., LOSI S., RENOUX M.C., VEZIRIS N., DUBUS J.C. Management of young children in contact with an adult with drug-resistant tuberculosis, France, 2004-2008. Int J Tuberc Lung Dis. 2011 Mar;15(3):326-30.
5. F. BROSSIER, VEZIRIS N., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., SOUGAKOFF W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jan;55(1):355-60.
6. N. VEZIRIS, IBRAHIM M., LOUNIS N., ANDRIES K., JARLIER V. Sterilizing Activity of Second-Line Regimens Containing TMC207 in a Murine Model of Tuberculosis. PLoS ONE 2011; 6(3): e17556.
7. E. MACHERAS, ROUX A.L., BASTIAN S., S.C.LEAO, PALACI M., SIVADON-TARDY V., GUTIERREZ C., RICHTER E., RUSCH-GERDES S., PFYFFER G., BODMER T., CAMBAU E., GAILLARD J.L., HEYM B. Multilocus sequence analysis and *rpoB* sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb ; 49(2) : 491-9.
8. S. PETRELLA, GELUS-ZIENTAL N., MAUDRY A., LAURANS C., BOUDJELLOUL R., SOUGAKOFF W. Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e15785.
9. A. SADATH, AUBRY A., SURESH PANDIAN PANKAJ SARASWAT ABHIMANYU SINGH AND RAMAKANT GAUR. ASHRAF ALI M., BASTIAN S., ISMAI R., SOO CHOO T. Discovery of novel methanone derivatives acting as antimycobacterial agents. J Enz Inhib Med Chem., 2011, 1-5, Early Online.
10. E. CAMBAU, AUBRY A. *Mycobacterium marinum*. In "Tuberculosis and mycobacterial infections", Ed. D. Schlossberg, 2011, ASM Press, Washington DC.
11. Bouakaze C, Keyser C, Gonzalez A, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, Jaulhac B, Ludes B. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3292-9.
12. Schneider P, Monsel G, Veziris N, Roujeau JC, Bricaire F, Caumes E. Successful treatment of nodular lymphangitis due to Mycobacterium chelonae in two immunosuppressed patients. Dermatol Online J. 2011 Mar 15;17(3):8.
13. Veziris N, Truffot C, Mainardi JL, Jarlier V. Activity of carbapenems combined with clavulanate against murine tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Jun;55(6):2597-600.
14. SOUGAKOFF W. Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect. 2011 Jun;17(6):800-5.
15. BOUAKAZE C, KEYSER C, GONZALEZ A, SOUGAKOFF W, VEZIRIS N, DABERNAT H, JAULHAC B, LUDES B. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based single nucleotide polymorphism genotyping assay using iPLEX gold technology for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species and lineages. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9):3292-9.
16. DE BEER JL, KREMER K, KÖDMÖN C, SUPPLY P, VAN SOOLINGEN D; THE GLOBAL NETWORK FOR THE MOLECULAR SURVEILLANCE OF TUBERCULOSIS 2009. First Worldwide Proficiency Study on Variable-Number Tandem-Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):662-669.
17. Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., Rocher, V., Goncalves, A., and Lucas, F.S. Mycobacterium behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from Escherichia coli and Enterococci. Environnemental Science and Technology (2011) **; 45**: 5380-5386.
18. M. Fauville-Dufaux, V. Jarlier, D. van Soolingen, S. Hoffner. Biosafety in the clinical laboratory diagnosis of tuberculosis. In "Technical report: Mastering the basis of Tuberculosis control, development of a habdbook on TB diagnostic methods". European Centre for Disease Prevention and Control C 2011.
19. D. van Soolingen, V. Jarlier, F. Drobniewski. Information for physicians: the laboratory diagnosis of tuberculosis – First steps
20. In "Technical report: Mastering the basis of Tuberculosis control, development of a habdbook on TB diagnostic methods". European Centre for Disease Prevention and Control C 2011
21. E. Cambau, S. Rusch-Gerdes. First- and second- line drug susceptibility testing fro Mycobacterium tuberculosis complex. In "Technical report: Mastering the basis of Tuberculosis control, development of a habdbook on TB diagnostic methods". European Centre for Disease Prevention and Control C 2011

7.3. Communications nationales

1. A. Aubry, Bouige A., Barbosa F., Durand ML, Combes A., Chastre J., Jarlier V., Trouillet JL. Comparaison de l'effet de différents soins de bouche sur la charge bactérienne au niveau de la flore oropharyngée et de la trachée chez des malades ventilés en réanimation SRLF. 2011
2. F. Hernandez, F. Lemaitre, S. Jaureguiberry, S. Emilie M. Méchain, B. Fautrel, C. Fernandez, E. Caumes, E. Fourniols, A. Aubry pour le groupe PIOS (Pitié Infections Osseuses). Pharmacocinétique/Pharmacodynamie (PK/PD) des Fluoroquinolones (FQ) chez des patients souffrant d'Infections Ostéo-Articulaires (IOA). 12èmes Journées Nationales d'Infectiologie. 2011 (ce poster a reçu le prix du meilleur poster d'Infectiologie général).
3. Alix Pantel, Stéphanie Petrella, Hélène Ferrand, Aurélie Bouige, Nicolas Veziris, Claudine Mayer, Alexandra Aubry. Mutations compensatoires restaurant la sensibilité aux quinolones dans l'ADN gyrase de souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis.* Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale. 2011
4. T. Boissenot, F. Lemaitre, S. Emilie, A. Aubry, S. Jauréguiberry, E. Fourniols, B. Fautrel, E. Caumes, C. Fernandez, Groupe Pitié Infection Osseuse (pios). Suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de la rifampicine dans les infections ostéo-articulaires : un quart de patients sous-exposés. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Communication orale. 2011
5. S. Gillard, A. Aubry, S. Bastian, V. Jarlier, *N. Veziris.* DESCRIPTION CLINICO-BACTÉRIOLOGIQUE DES INFECTIONS À *MYCOBACTERIUM SIMIAE.* Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Poster. 2011
6. N. Lemaitre, G. Delcroix, S. Armand, G. Millot, P. Bodzongo, A. Aubry, R. Courcol, W. Sougakoff. Épidémiologie moléculaire de la résistance aux antituberculeux des souches de mycobactéries du complexe *tuberculosis* (MCT) isolées au Congo. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Poster. 2011
7. Brossier F, Cambau E, Tessier E, Jarlier V, Sougakoff W. Les mutants résistants de *Mycobacterium tuberculosis* sélectionnés *in vitro* ne reflètent pas les mécanismes de résistance à l'éthionamide et à l'isoniazide *in vivo*. 2ème rencontre du MycoClub (Réseau Francophone de Recherche en Mycobactériologie), Tours, 26-27 septembre 2011. *Communication affichée.*
8. Brossier F, Gerard E, Millot G, Jarlier V, Sougakoff W. Comparaison des résultats de typage obtenus pour des isolats de *Mycobacterium tuberculosis* par REP-PCR (Diversilab), RFLP-IS*6110*, spoligotypage et MIRU-VNTR 24-loci. 12èmes Journées de Mycobactériologie de Langue Française, Reims, 13-14 octobre 2011. *Communication orale.*
9. F. Brossier, D. Amy De La Breteque, M. Vallet, N. Veziris, S. Bastian, V. Jarlier, W. Sougakoff. Analyse moléculaire de l'opéron *embCAB* impliqué dans la résistance à l'éthambutol dans les isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* en France. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2011
10. M.A. Cosson, J.B. Bertrand, C. Martin, N. Veziris, C. Picard, C. Goulvestre, S. Coignard, J.P. Benoit, S. Silvera, M.R. Moro, C. Poyart, P.C. Morand. Kinetics of interferon-gamma release response to pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection and central role of direct diagnostic methods. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2011
11. L. Legout, N. Ettahar, M. Massoungo, N. Veziris, F. Ajana, E. Beltrand, Y. Yazdanpanah, E. Senneville. Arthrite destructrice du poignet à *Mycobacterium arupense* chez un patient immunocompétent. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. 2011
12. C. Wichlacz, S. Roussel, M. Dibon, L. Esteves, N. Veziris. Etude du risque de contamination croisée de lames colorées à l'auramine par la technique de trempage. 12èmes journées de Mycobactériologie de Langue Française. Reims 2011
13. V. Meyssonnier, N. Veziris, S. Bastian, J. Texier-Maugein, V. Jarlier, J. Robert pour le groupe AZAY-Mycobactéries. Augmentation de la résistance primaire aux antibiotiques de première ligne chez les malades tuberculeux les plus jeunes et nés en France. Journées de Mycobactériologie de Langue Française. Reims 13-14 octobre 2011.
14. N. Simmonney. L. Raskine, E. Cambau. Réalisation du test Quantiferon en clinique hospitalière. 12èmes journées de Mycobactériologie de Langue Française. Reims 2011.
15. E. Cambau. Présentation d'un colorateur automatique de Ziehl-Neelsen, 12èmes journées de Mycobactériologie de Langue Française. Reims 2011

7.4. Communications internationales

1. F. Hélène, Pantel Alix, Bouige Aurélie, Jarlier Vincent, Veziris Nicolas, Claudine Mayer, Aubry Alexandra. From XDR to MDR: first description of compensatory GyrA mutations restoring FQ susceptibility in a clinical *M. tuberculosis* strain. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, poster. 2011
2. Stéphanie Petrella, Nicolas Veziris, Stéphanie Matrat, Alix Pantel, Claudine Mayer, Alexandra Aubry. Resistance to Fluoroquinolones in *Mycobacterium Tuberculosis*: What Have we Learn from Biochemical Studies of DNA Gyrase Mutant Enzymes and from Murine Model? Advances in DNA topoisomerases and chromosome dynamics, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, poster. 2011
3. Antibiotic Susceptibility Pattern of *Mycobacterium simiae.* S. Gillard, S. Bastian,V. Jarlier, N. Veziris. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, poster. 2011

7.5. Conférences sur invitations nationales

Emmanuelle CAMBAU

- Congrès de la Société Française de Médecine Interne (Paris, 2011) Maison de la Chimie, Nouveaux outils diagnostiques de la tuberculose
- XIIèmes Journées de Mycobactériologie de Langue Française. Point sur les études du groupe « AZAY mycobactéries » (Reims, 2011), Juste prescription en Mycobactériologie

Nicolas VEZIRIS

- Diagnostic et identification des mycobactéries tuberculeuses : la biologie moléculaire au service de la bactériologie. Société de Pneumologie d'Ile-de-France. 2011
- Tuberculose : rappels sur le bacille et les outils disponibles. Journée nationale d'information sur la tuberculose organisée par la Direction Générale de la Santé, l'Institut de veille sanitaire et le Centre national de référence des mycobactéries – Paris, 2011
- Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales. CHU Dijon. 2011
- Tuberculose et VIH - Nouveautés et perspectives thérapeutiques et diagnostiques- Institut Pasteur de Paris 2011
- Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose. Hôpital Européen Georges Pompidou. 2011
- Diagnostic biologique de la tuberculose. Entretiens de Bichat 2011
- Apport des modèles animaux dans l'évaluation de l'activité des antituberculeux. 12èmes journées de Mycobactériologie de Langue Française. Reims 2011
- Tuberculose : actualités 2011. Service de Médecine Interne. Hotel-Dieu, Paris. 2011
- Epidémiologie de la résistance, modèles animaux pour l'évaluation des antituberculeux, TMC207. Sanofi, Toulouse. 2011
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants : état des lieux et nouveaux traitements. Service de Microbiologie. Necker, Paris. 2011
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Bichat. Paris. 2011
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. Symposium Janssen, Biarritz 2011
- Tuberculose multirésistante : mycobactériologie et aspects cliniques. Société de Pneumologie de l'Ouest. Poitiers. 2011
- Tuberculose à bacilles multirésistants et ultrarésistants. Journée Tuberculose. CHU Amiens. 2011
- Diagnostic rapide de *M. tuberculosis* sensible et résistant à la Rifampicine Xpert MTB-RIF et projet STIC RIFAST-TB. Service de Maladies Infectieuses et Tropicales. Pitié-Salpêtrière. Paris. 2011

Wladimir SOUGAKOFF

- *Mycobacterium tuberculosis*, « Variabilité génétique bactérienne, virale ou parasitaire, et migration des populations », Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse. Paris. Symposium. 2011

7.6. Conférences sur invitations internationales

Emmanuelle CAMBAU

- 21st ECCMID/27th ICC (Italy, May 2011) : Workshop Resistance to anti-tuberculous. Conference: Susceptibility testing of *M. tuberculosis* strains
- 21st ECCMID/27th ICC (Italy, May 2011) : Official symposium Surveillance of resistance in *M.tuberculosis* and potential impact of epidemiological cut-off values. Conference: The critical concentration is important
- Being prepared to detect for resistance to second line drugs: new fluroquinolones, clarithromycin, minocycline and TMC207. Meeting on Sentinel Surveillance for Drug Resistance in Leprosy
- *22-23 August 2011, Hyderabad, India*
- Current developments in search for new anti-leprosy. Meeting on Sentinel Surveillance for Drug Resistance in Leprosy. *22-23 August 2011, Hyderabad, India*

Alexandra AUBRY

- Quinolone for therapy of pathogenic mycobacteria,"Quinolones: from bench to bedside" ESCMID postgraduate course, 2011

Annexe

Liste nominative des personnels participants aux activités du laboratoire coordinateur et du laboratoire associés précisant fonction, ETP, qualification, Statut, site et organisme payeur

Nom	Prénom	Fonction	ETP	Qualification	Statut	Site	Organisme payeur
Jarlier	Vincent	Directeur CNR	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Cambau	Emmanuelle	Responsable laboratoire associé	0,25	Médecin biologiste	PU-PH	Lariboisière	AP-HP
Veziris	Nicolas	Microbiologiste Pneumologue	0,5	Médecin	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Bernard	Christine	Microbiologiste	1	Pharmacien biologiste	PH	Pitié	**INVS**
Raskine	Laurent	Microbiologiste	0,25	Médecin biologiste	PH	Lariboisière	AP-HP
Aubry	Alexandra	Microbiologiste	0,1	Médecin biologiste	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Brossier	Florence	Microbiologiste	0,1	Pharmacien biologiste	PH	Pitié	AP-HP
Sougakofff	Wladimir	Microbiologiste (Biol. moléculaire)	0,25	Scientifique	MCU-PH	Pitié	AP-HP
Robert	Jérôme	Epidémiologiste	0,25	Médecin	PU-PH	Pitié	AP-HP
Simonney	Nancy	Immunologiste	0,25	Médecin	Attachée	Lariboisière	AP-HP
Rigoreau	Martine	Technicienne	1	Technicienne	Techn.	Pitié	AP-HP
Wichlacz	Claudine	Technicienne	1	Technicienne	Techn.	Pitié	AP-HP
Millot	Gérald	Technicien	0,5	Technicien	Techn.	Pitié	AP-HP
Rasaova	Niriana	Technicienne	1	Technicienne	Techn.	Pitié	**INVS**
Levittas	Marine	Technicienne	1	Technicienne	Techn.	Pitié	**INVS**

Charlier	Véronique	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Brisilliat Gardet	Christine	Technicienne	0,25	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
En cours de recrutement		Technicienne	1	Technicienne	Tech	Lariboisière	AP-HP
Catalano	Francesca	Secrétaire	0,25	Secrétaire		Pitié	AP-HP